



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 26 920 T2** 2006.06.29

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 246 919 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 26 920.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/31307**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 967 798.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/049851**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.12.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **12.07.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.10.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **24.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.06.2006**

(51) Int Cl.⁸: **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)

(73) Patentinhaber:

Imclone Systems, Inc., New York, N.Y., US; The Regents of the University of California, Oakland, Calif., US

(74) Vertreter:

GRUND Intellectual Property Group, 80802 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

COLUCCI, M. Gabriella, I-20122 Napoli, IT; CHRISPEELS, J., Maarten, La Jolla, US; MOORE, G., Jeffrey, Massachusetts, US

(54) Bezeichnung: **Konservierungsfaktoren von Vorläuferzellen und damit verbundene Verfahren und Produkte**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Anmeldung ist eine Continuation-in-part-Anmeldung der US-Seriennummer 08/881,189, eingereicht am 24. Juni 1997.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG**Gebiet der Erfindung**

[0002] Die Erfindung betrifft die Konservierung von Vorläuferzellen. Insbesondere betrifft die Erfindung die Konservierung von Vorläuferzellen in vivo, beispielsweise von hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Zusammenfassung des Stands der Technik

[0003] Die große Vielzahl von funktionell und phänotypisch unterschiedlichen Arten von Zellen in einem multizellulären eukaryontischen Organismus ist teilweise auf die Proliferation und Differenzierung von seltenen und sich meistens im Ruhestadium befindenden Populationen von Vorläuferzellen zurückzuführen. Zum Beispiel beinhaltet die Hämatopoese den Entstehungsprozess von unterschiedlichen Blutzellen aus solchen Vorläuferzellen, die im Knochenmark von Erwachsenen anzutreffen sind für eine ausgeglichene Versorgung. Die Entwicklung von anderen Zellarten hängt auch von der Entstehung von den differenzierten Zellen aus solchen Vorläuferzellen ab.

[0004] Vorläuferzellen werden durch Signale aktiviert, wie z.B. durch Zell-Zell-Kontakt oder lösliche Regulatoren, um Tochterzellen zu erzeugen, die identisch mit den Elternzellen sind (d.h. Selbsterneuerung der Elternzellen) und/oder Tochterzellen zu erzeugen, die differenzierter sind als die Elternzellen und dadurch einen irreversiblen Prozess zu beginnen, der mit der Entstehung von differenzierten, funktionellen Zellen endet. In dem Hämatopoeseprozess ist die Differenzierung an die Proliferation gekoppelt, da eine Vorläuferzelle zu mehreren differenzierten Tochterzellen führt, die stufenweise dafür bestimmt sind, nur einen Blutzelltyp zu erzeugen. Die enorme Aktivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, die erforderlich ist, um das tägliche Bedürfnis des Körpers an Hunderte Milliarden von neuen reifen Blutzellen zu decken, wird durch wirksame lösliche Regulatoren gesteuert (z.B. Koloniestimulierende Faktoren und Cytokine), die auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen und deren differenzierteren Tochterzellen wirken.

[0005] Obwohl Vorläuferzellen letztendlich zu viele reife Zellen des Körpers hervorbringen, kommen sie nur sehr selten vor. Je primitiver (d.h. undifferenzierter) die Vorläuferzelle ist, desto seltener kommt typischerweise die Vorläuferzelle vor. Zum Beispiel kommen die gegenwärtig als am meisten primitiv angesehenen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die als hämatopoetische Stammzellen bezeichnet werden, nur mit einer Häufigkeit von ungefähr 1 zu 10 000 bis ungefähr 1 zu 100 000 unter den Zellen des Knochenmarks vor. Hämatopoetische Stammzellen haben die Fähigkeit mehr als 10¹³ reife Blutzellen von sämtlichen Linien zu bilden, einschließlich anderen Vorläuferzellen, die, da sie differenzierter als hämatopoetische Stammzellen sind, selbst fähig sind, mehrere unterschiedliche Arten von reifen Blutzellen hervorzubringen.

[0006] Hämatopoetische Stammzellen sind für die Aufrechterhaltung der Blutzellproduktion über die gesamte Lebenszeit eines Tieres verantwortlich. Die kleine Population von hämatopoetischen Stammzellen reicht aus, um alle reifen Blutzellen in einem gesunden Individuum zu bilden; jedoch leiden einige kranke Individuen daran, dass ihnen eine ausreichende Anzahl von Vorläuferzellen und/oder reifen Blutzellen fehlt. Zum Beispiel leiden Krebspatienten, die chemotherapeutische oder strahlentherapeutische Behandlungen in Anspruch nehmen, um die sich schnell teilenden Krebszellen abzutöten, auch an der Depletion von weißen Blutzellen und Blutplättchen und dadurch sind diese Patienten lebensbedrohlichen opportunistischen Infektionen und Blutungsvorfällen ausgesetzt. Tatsächlich ist diese hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität der Dosis-limitierende Faktor für die meisten dieser chemotherapeutischen und strahlentherapeutischen Agenzien.

[0007] Viele Krebspatienten werden routinemäßig mit Cytokinen behandelt, einschließlich G-CSF, GM-CSF, SCF, Erythropoietin und IL-11, um die Wiederherstellung der Hämatopoese nach einer Chemotherapie zu beschleunigen (Moore, M. A., Blood 78: 1-19, 1991). Jedoch führen diese Cytokine zu einer irreversiblen Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen, einschließlich hämatopoetischen Stammzellen in stärker differenzierte Tochterzellen. Daher wird ein besserer Schutz von hämatopoetischen Vorläuferzellen während einer Chemotherapie benötigt. Die Fachleute auf dem Gebiet haben versucht, Cytokine in Mäusen zu verwenden, um Vorläuferzellen gegenüber der Toxizität einer Chemotherapie zu schützen (Neta et al., J. Immunol. 136: 2483-2485, 1986; Neta et al., J. Immunol. 140: 108-111, 1988; Neta et al., J. Exp. Med. 173: 1177-1182,

1991; de Haan et al., Blood 87: 4581–4588, 1996; Lyman and Jacobsen, Blood 91: 1101–1134, 1998; Dalmay et al., Bone Marrow Transplant. 12: 551–563, 1993; Grzegorzewski et al., J. Exp. Med. 180: 1046–1057, 1994; Grzegorzewski et al., Blood 94: 1066a (Abstr.) 1999). Marshall et al. (Euro. J. Cancer 34: 1023–1029, 1998) und Gilmore et al. (Exp. Hematol. 27: 195–202, 1999) beschreiben die Verwendung eines Chemokins, MIP1- α , als Chemoprotektant in klinischen Versuchen, das eine Vorläuferzellproliferation inhibieren soll. Marshall (Marshall, A., Nat. Biotechnol. 16: 129, 1999) beschreibt die Verwendung von MIP1-1, einem Chemokin, von dem behauptet wird, dass es in klinischen Versuchen eine Vorläuferzellproliferation als Chemoprotektant inhibiert.

[0008] Es gibt bei der Verwendung von Chemokinen, Cytokinen und anderen Immunregulatoren als Chemoprotektanten während der chemotherapeutischen oder strahlentherapeutischen Behandlung von einem Krebspatienten mehrere Nachteile. Diese Nachteile umfassen die Produktionskosten und Toxizität für den Patienten.

[0009] Daher besteht ein Bedarf an verbesserten Reagenzien, die nicht-toxisch und billig in ihrer Herstellung sind, um sie für eine Konservierung von Vorläuferzellen zu verwenden.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die Erfindung betrifft die Verwendung einer therapeutischen wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die ein FRIL-Protein enthält, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 6 umfasst, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Zustands, der durch eine hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität bei einer strahlentherapeutischen oder einer chemotherapeutischen Behandlung oder einer Kombination von einer strahlentherapeutischen oder einer chemotherapeutischen Behandlung charakterisiert ist, wobei die therapeutisch wirksame Menge der Zusammensetzung die hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität der therapeutischen Behandlung in dem Patienten lindert oder reduziert, und wobei das Arzneimittel vor der strahlentherapeutischen oder chemotherapeutischen Behandlung verabreicht wird, wobei das Arzneimittel ungefähr 5 Tage bis ungefähr 2 Stunden vor der therapeutischen Behandlung verabreicht wird und täglich verabreicht wird. Das Mitglied der FRIL-Familie stammt von der Leguminose Phaseolus vulgaris.

[0011] Die Erfindung stellt ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül bereit, das für eine Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie von Vorläuferzell-Konservierungsfaktoren kodiert, die die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 6 für die beanspruchte Verwendung umfassen.

[0012] Die Erfindung stellt eine pharmazeutische Zusammensetzung für die beanspruchte Verwendung bereit, die eine im Wesentlichen reine Zusammensetzung des oben genannten Vorläuferzell-Konservierungsfaktors der FRIL-Familie und einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

[0013] Die Erfindung betrifft die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der Formulierung an einen Patienten, der an einem Zustand leidet, bei dem die hämatopoetischen Vorläuferzellen des Patienten depletiert sind und wobei die pharmazeutische Formulierung den Zustand in dem Patienten lindert oder vermindert.

[0014] Die Erfindung betrifft die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der Formulierung an einen Patienten vor der Behandlung des Patienten mit einer therapeutischen Behandlung mit einer hämatopoetischen Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität, welche die hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität der therapeutischen Behandlung in dem Patienten lindert und/oder vermindert. In bestimmten Ausführungsformen ist der Patient ein Mensch oder ein Haustier. In einigen Ausführungsformen hat der Patient Krebs. In einigen Ausführungsformen ist die therapeutische Behandlung eine strahlentherapeutische oder eine chemotherapeutische Behandlung, einschließlich und ohne Beschränkung von Cytarabin (Ara-C), Doxorubicin (Dox) oder 5-Fluoruracil (5-FU) oder eine Kombination einer strahlentherapeutischen und einer chemotherapeutischen Behandlung.

[0015] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Konservierung von Vorläuferzellen in vivo bereit, das die Verabreichung einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie für eine wirksame Zeitdauer an einem Patienten umfasst, wobei die Vorläuferzellen in dem Patienten in den Ruhezustand versetzt werden. Vorzugsweise ist der Patient ein Mensch oder ein Haustier.

[0016] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung ist der Patient ein Krebspatient. Die wirksame Menge der Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie wird vor der Behandlung des Patienten mit einer therapeutischen Behandlung mit einer hämatopoetischen Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität verabreicht,

wobei das Arzneimittel ungefähr 5 Tage bis ungefähr 2 Stunden vor der therapeutischen Behandlung verabreicht wird und täglich verabreicht wird. In einigen Ausführungsformen ist die therapeutische Behandlung eine strahlentherapeutische oder eine chemotherapeutische Behandlung, einschließlich aber ohne Beschränkung von Cytarabin (Ara-C), Doxorubicin (Dox) oder 5-Fluoruracil (5-FU) oder einer Kombination einer strahlentherapeutischen und einer chemotherapeutischen Behandlung.

[0017] Gemäß der Erfindung können die Zusammensetzungen eines Mitglieds der FRIL-Familie als therapeutische Agenzien verwendet werden, um Vorläuferzellen in Patienten, z.B. Krebspatienten, die eine Chemotherapie erhalten und an einem Zustand leiden, der deren Vorläuferzellen beeinträchtigt, zu konservieren. Zum Beispiel können die Zusammensetzungen eines Mitglieds der FRIL-Familie gemäß Anspruch 1 mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger (z.B. physiologische sterile Salinelösung) über eine beliebige Verabreichungsrouten an einen Krebspatienten, der eine Chemotherapie erhält, verabreicht werden, um so zu versuchen, die Vorläuferzellen-depletierende Wirkungen der chemotherapeutischen Behandlung zu vermindern, so dass der Patient eine höhere Dosis der chemotherapeutischen Behandlung empfangen kann und sich Idealerweise vom Krebs erholen kann. Pharmazeutisch verträgliche Träger und deren Formulierungen sind bekannt und allgemein beschrieben, z.B. in Remington's Pharmaceutical Sciences (18. Ausgabe, Herausgeber A. Genaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990).

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] Die Figuren fallen nicht in den Umfang der Ansprüche und dienen lediglich zur Veranschaulichung.

[0019] [Fig. 1](#) ist eine Karte eines Klonierungsvektors pCR2.1-DLA, der durch Ligation einer cDNA gemäß der Erfindung in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 hergestellt wurde.

[0020] [Fig. 2](#) zeigt einen direkten Vergleich der Aminosäuresequenz des oberen Strangs der β -Untereinheit (SEQ ID NO: 11) und des oberen Strangs der α -Untereinheit (SEQ ID NO: 12) des Mannose-Lectins, das von Gowda et al. (J. Biol. Chem. 269: 18789–18793, 1994) beschrieben wurde und die abgeleitete Aminosäuresequenz von D1-FRIL einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, das durch eine repräsentative, jedoch nicht darauf beschränkte Nukleinsäure der Erfindung kodiert wird.

[0021] [Fig. 3](#) ist eine Karte eines Klonierungsvektors pCR2.1-DLA(D), der durch Ligation einer mutierten cDNA in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 hergestellt wurde.

[0022] [Fig. 4](#) ist eine Karte eines Klonierungsvektors pBS-SpDLA, der durch Ligation eines rekombinanten Fragments in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pBluescript SK+ hergestellt wurde.

[0023] [Fig. 5](#) ist eine Karte eines Klonierungsvektors pCR2.1-SpM1(D), der durch Ligation eines mutierten rekombinanten Klons in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 hergestellt wurde.

[0024] [Fig. 6](#) ist eine Karte eines rekombinanten Expressionsvektors pBIN-VicPro, der durch Subklonierung des Vicilin-Promotors hergestellt wurde, der von dem pCW66-Vektor in die EcoRI/ClaI-Stelle des binären Pflanzenvektors pBIN19 zur Agrobacterium-vermittelten Transformation erhalten wurde.

[0025] [Fig. 7](#) ist eine Karte eines rekombinanten Expressionsvektors pBINVicPro-SpDLA, der durch Ligation eines rekombinanten Fragments in die EcoRI/SacI-Stelle des pBINVicPro-Vektors hergestellt wurde.

[0026] [Fig. 8](#) ist eine Karte eines rekombinanten Expressionsvektors pBINVicPro-SpDLA(D), der durch Ligation eines mutierten rekombinanten Klons in die EcoRI-Stelle des pBINVicPro-Vektors hergestellt wurde.

[0027] [Fig. 9](#) ist eine Karte eines rekombinanten Expressionsvektors pGEX4T-1-DLA, der durch Ligation eines Wildtyp-cDNA-Klons in die EcoRI/SalI-Stelle des E. coli-Expressionsvektors pGEX4T-1 hergestellt wurde.

[0028] [Fig. 10](#) ist eine Karte eines rekombinanten Expressionsvektors pGEX4T-1-DLA(D), der durch Ligation eines mutierten cDNA-Klons in die EcoRI/XhoI-Stelle des E. coli-Expressionsvektors pGEX4T-1 hergestellt wurde.

[0029] [Fig. 11](#) ist eine Darstellung eines Elektrophoretogramms von einem Southern Blot von Gesamtproteinextrakten von E. coli-Zellen, die mit den rekombinanten Expressionsvektoren pGEX4T-1-DLA und

pGEX4T-1-DLA(D) transformiert worden sind.

[0030] [Fig. 12](#) ist eine Darstellung eines Elektrophoretogramms von einem Western Blot von gereinigten GST-Fusionsproteinen mit und ohne Spaltung durch Thrombin.

[0031] [Fig. 13A](#) ist eine Darstellung einer Kurve, die zeigt, dass ein Rohextrakt einer E. coli-Kultur, die exprimiertes D1-FRIL enthält, ein repräsentatives, jedoch nicht darauf beschränktes Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung spezifisch hFLT3-3T3-Zellen stimuliert; [Fig. 13B](#) ist eine Kurve, die zeigt, dass derselbe Extrakt nicht nicht-transfizierte 3T3-Zellen stimuliert.

[0032] [Fig. 14A](#) ist eine Darstellung eines Histogramms, das zeigt, dass gereinigtes D1-FRIL, ein repräsentatives, jedoch nicht darauf beschränktes Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung mononukleare Zellen von Nabelschnurblut in einer Dosis-abhängigen Weise konserviert.

[0033] [Fig. 14B](#) ist eine Darstellung eines Histogramms, das zeigt, dass gereinigtes D1-FRIL, ein repräsentatives, jedoch nicht darauf beschränktes Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, hämatopoetische Vorläufer in einer Dosis-abhängigen Weise konserviert.

[0034] [Fig. 15A](#) ist eine Darstellung einer Fotografie von Kolonien, die von mononuklearen Zellen von menschlichem Nabelschnurblut abgeleitet sind, die in 40 ng/ml D1-FRIL einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, für drei Wochen kultiviert wurden und dann in Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium ausplattiert wurden.

[0035] [Fig. 15B](#) ist eine Darstellung einer Fotografie von Kolonien, die von mononuklearen Zellen von humanem Nabelschnurblut abgeleitet sind, die in 40 ng/ml D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, für vier Wochen kultiviert wurden und dann in Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium ausplattiert wurden.

[0036] [Fig. 16](#) ist eine schematische Darstellung, die die serielle Ausplattierung von Vorläuferzellen, die in D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, kultiviert wurden oder D1-FRIL + recFL (d.h. rekombinanter FLT3-Ligand) zeigt. Die mononuklearen Zellen von humanem Nabelschnurblut wurden zuerst in einer Suspension mit 40 ng/ml D1-FRIL von 40 ng/ml D1-FRIL + 40 ng/ml recFL (ausgefüllte schwarze Box) kultiviert. Die Zellen wurden dann geerntet und ihre Vorläuferaktivität bestimmt, indem sie in Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium für sechs Wochen ausplattiert wurden (mittlere gestrichelte Box). Die Zellen wurden dann von dem Kolonie-Assay geerntet und wiederum in Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium für weitere vier Wochen ausplattiert (gestrichelte Box ganz rechts). Die Vorläuferhäufigkeiten wurden für die Zellen nach drei Wochen in der Suspensionskultur in D1-FRIL oder D1-FRIL + recFL und nach weiteren sechs Wochen in Methylcellulosekultur (ohne D1-FRIL und/oder recFL) bestimmt.

[0037] [Fig. 17](#) ist eine Darstellung einer Fotografie von Kolonien, die von humanen nuklearen Zellen von Nabelschnurblut abgeleitet sind, die anfangs in 40 ng/ml D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, für drei Wochen kultiviert wurden und dann in Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium für sechs Wochen ausplattiert wurden, und anschließend wieder in Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium für weitere vier Wochen ausplattiert wurden.

[0038] [Fig. 18](#) ist eine Darstellung eines Balkendiagramms, das zeigt, dass ein repräsentatives, jedoch nicht darauf beschränktes Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, D1-FRIL, das durch eine repräsentative, jedoch nicht darauf beschränkte Nukleinsäure der Erfindung kodiert wird, ausreicht, um Vorläuferzellen ex vivo zu konservieren, wohingegen ein Cytokin-Cocktail nicht in der Lage ist, solche Zellen zu konservieren.

[0039] [Fig. 19A](#) und [Fig. 19B](#) sind Darstellungen von Liniendiagrammen, welche die biologische Spezifität von Rezeptor-transfizierten 3T3-Zellen zeigt. [Fig. 19A](#) zeigt, dass rhM-CSF spezifisch Fms-3T3 (gefüllte Kreise), nicht jedoch mFlt3/Fms 3T3 (offene Kreise) oder Eltern-3T3-Zellen (gefüllte Quadrate) in einem biologischen Screening-Assay in einer Dosis-abhängigen Weise stimuliert. [Fig. 19B](#) zeigt, dass PHA-LCM (reziproke Verdünnung) mFlt3/Fms 3T3 (gefüllte Kreise) und Stk 3T3 (offene Kreise) stimulierten, nicht jedoch nicht-transfizierte Eltern-3T3-Zellen (gefüllte Quadrate).

[0040] [Fig. 20A](#) bis [Fig. 20D](#) sind Darstellungen von den detektierten biologischen Aktivitäten von PHA-LCM, die durch Ionenaustausch-Chromatographie fraktioniert worden sind. [Fig. 20A](#) zeigt die Anzahl von lebenden Nabelschnurblutzellen, die mikroskopisch ermittelt wurden. [Fig. 20B](#) zeigt die Stimulation von mFlt3/Fms

3T3-Zellen durch Anionenaustauschsäulenfraktionierung. [Fig. 20C](#) zeigt die Stimulation von Stk 3T3-Zellen durch Anionenaustauschsäulenfraktionierung. [Fig. 20D](#) zeigt die Stimulation von Fms 3T3-Zellen durch Anionenaustauschsäulenfraktionierung.

[0041] [Fig. 21A](#) und [Fig. 21B](#) sind Darstellungen von Liniendiagrammen, welche die Co-Faktoren zeigen, die in dem Flt3 3T3-Assay während der Aufreinigung von Pv-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, erforderlich sind. [Fig. 21A](#) zeigt die Plateau-Stimulation von Flt3 3T3-Zellen, die während der Aufreinigung von 10-fach konzentriertem Roh-PHA-LCM (gefüllte Kreise) über partiell gereinigtes (offene Kreise) und hochgereinigtes (gefüllte Quadrate) abnahm. Die Mediumkontrolle ist als offene Quadrate gezeigt. [Fig. 21B](#) zeigt, dass die verringerte Plateaustimulation von Flt3 3T3-Zellen (gefüllte Kreise) durch den Zusatz von suboptimalen Konzentrationen (1:200) von Roh-PHA-LCM (gefüllte Quadrate) wiederhergestellt wurde. Die entsprechenden Medienkontrollen sind als offene Symbole gezeigt.

[0042] [Fig. 22A](#) bis [Fig. 22D](#) sind Darstellungen einer Reihe von Durchflusscytometrie-Histogrammen, welche die Re-Analyse der CD34-Expression von Nabelschnurblut CD34⁺-Zellen nach zwei Wochen in Suspensionskultur mit gepoolten Fraktionen aus einer AQS-Affinitätssäule zeigen. Die CD34-Expression wurde durch Durchflusscytometrie mit den AQS-Affinitätssäulenfraktionen 1 bis 5 ([Fig. 22A](#)), Fraktionen 6 bis 10 ([Fig. 22B](#)), Fraktionen 11 bis 15 ([Fig. 22C](#)) und Fraktionen 16 bis 20 ([Fig. 22D](#)) erneut analysiert. Fluoreszenzintensität ist in den [Fig. 22A](#) bis [Fig. 22D](#) auf der Abszisse und die Häufigkeit der Ereignisse auf der Ordinate angegeben.

[0043] [Fig. 23](#) ist eine Darstellung eines Liniendiagramms, das die IL1-abhängige Antwort von mFlt3/Fms 3T3-Zellen auf FRIL zeigt, das aus kommerziellen Extrakten der roten Bohne isoliert worden ist. mFlt3/Fms 3T3-Zellen antworteten auf FRIL in der Gegenwart von rhIL1 (gefüllte Kreise), nicht jedoch in der Abwesenheit von IL1 (gefüllte Quadrate). Die entsprechenden Medienkontrollen sind als offene Symbole gezeigt.

[0044] [Fig. 24A](#) ist eine Karte eines Klonierungsvektors pCR2.1-Pv-FRIL, der durch Ligation einer erfindungsgemäßen cDNA in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 hergestellt wurde.

[0045] [Fig. 24B](#) zeigt einen direkten Aminosäuresequenzvergleich von Pv-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, mit DLL, dem Mannose-Bindungslectin von Gowda et al., und dem PHA-Lectin, PHA-E.

[0046] [Fig. 25](#) ist eine Karte eines Klonierungsvektors pCR2.1-SpPv-FRIL, der durch Ligation einer erfindungsgemäßen cDNA in die XhoI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 hergestellt wurde.

[0047] [Fig. 26](#) ist eine Karte eines Klonierungsvektors pM-SpPv-FRIL, der durch Ligation einer erfindungsgemäßen cDNA in die BglII/XhoI-Stellen des Klonierungsvektors SpPv-FRIL hergestellt wurde.

[0048] [Fig. 27A](#) bis [Fig. 27B](#) sind Darstellungen von Liniendiagrammen, welche die Gesamtzellzahl und Vorläuferzellspiegel in der Gegenwart von D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, oder von Cytokinen zeigen. Angereicherte CB CD34⁺-Zellen wurden für 3, 6, 10 oder 13 Tage in der Gegenwart von D1-FRIL (gefüllte Symbole) oder Cytokine (offene Symbole) kultiviert. Die Kolonien wurden dann am Tag 14 ausgewertet und die Vorläuferzellspiegel wurden auf der Basis der Gesamtzellzahl berechnet. Die gezeigten Werte stellen den Durchschnitt \pm SEM der Daten von bis zu 10 Experimenten dar. [Fig. 27A](#) zeigt die Gesamtzellzahl über die Zeit. [Fig. 27B](#) zeigt die Vorläuferzellspiegel in den Kulturen über die Zeit.

[0049] [Fig. 28A](#) bis [Fig. 28D](#) sind Darstellungen von Linien- und Balkendiagrammen, die die Gesamtzellzahl und Vorläuferzellspiegel zuerst in der Gegenwart von D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, und dann in der Gegenwart von Cytokinen zeigen. [Fig. 28A](#) zeigt die Gesamtzahl von Zellen, die mit D1-FRIL für insgesamt 10 Tage (gefüllte Symbole) oder für 6 Tage gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (offene Symbole) kultiviert wurden. [Fig. 28B](#) zeigt die Vorläuferzellspiegel von Zellen, die mit D1-FRIL für die gesamten 10 Tage (gefüllte Symbole) oder für 6 Tage gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (offene Symbole) kultiviert wurden. [Fig. 28C](#) zeigt die Gesamtzahl von Zellen, die mit D1-FRIL für 13 Tage (gefüllte Symbole) oder für 10 Tage gefolgt von 3 Tagen einer Cytokin-Stimulation (offene Symbole) kultiviert wurden. [Fig. 28D](#) zeigt die Vorläuferzellspiegel in Zellen, die mit D1-FRIL für 13 Tage (gefüllte Symbole) oder für 10 Tage gefolgt von 3 Tagen einer Cytokin-Stimulation (offene Symbole) kultiviert wurden.

[0050] **Fig. 29A bis 29D** sind Darstellungen von repräsentativen Southern Blot-Analysen, welche die quantitative Analyse von SRC nach ex vivo-Kultivierungen mit D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, oder Cytokinen und nach einer Transplantation in Mäusen zeigt. **Fig. 29A** ist eine Darstellung eines repräsentativen Southern Blots, der die humane DNA in Knochenmark von Mäusen zeigt, die mit Zellen transplantiert worden sind, die mit D1-FRIL für 6 Tage (Bahn 1), D1-FRIL für 10 Tage (Bahn 2) oder mit D1-FRIL für 6 Tage gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (Bahn 3) kultiviert wurden. **Fig. 29B** ist eine Darstellung eines repräsentativen Southern Blots, der humane DNA in Knochenmark von Mäusen zeigt, die mit Zellen transplantiert worden sind, die mit D1-FRIL für 10 Tage (Bahnen 1 bis 2) oder mit D1-FRIL für 6 Tage gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (Bahnen 3 bis 4) kultiviert wurden. **Fig. 29C** ist eine Darstellung eines repräsentativen Southern Blots, der humane DNA im Knochenmark von Mäusen zeigt, die mit den ursprünglichen Zellen vor dem Aussetzen (Bahn 1) oder mit Zellen, die mit D1-FRIL für 13 Tage (Bahn 2) kultiviert wurden, transplantiert worden sind. **Fig. 29D** ist eine Darstellung eines repräsentativen Southern Blots, der humane DNA im Knochenmark von Mäusen zeigt, die mit Zellen transplantiert worden sind, die mit FRIL für 10 Tage (Bahn 1), D1-FRIL für 6 Tage gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (Bahn 2), D1-FRIL für 13 Tage (Bahn 3) oder mit D1-FRIL für 10 Tage gefolgt von 3 Tagen einer Cytokin-Stimulation (Bahn 4) kultiviert wurden.

[0051] **Fig. 29E** ist eine Darstellung einer Southern Blot-Analyse, welche die Detektion von 0%, 0,1%, 1% und 10% humaner DNA pro Murine-DNA zeigt.

[0052] **Fig. 30** ist eine Darstellung eines Überlebensschaubildes, das den Transplantationsgrad von humanen Zellen im Knochenmark von Mäusen, die mit CD34⁺-Zellen transplantiert worden sind, die entweder in D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung für 10 Tage (linker Abschnitt) oder in der Gegenwart von D1-FRIL für 6 Tage gefolgt einer Kultivierung in der Gegenwart von Cytokinen für 4 Tage kultiviert wurden.

[0053] **Fig. 31** ist eine Darstellung einer repräsentativen Southern Blot-Analyse, welche den Transplantationsgrad von humanen Zellen im Knochenmark von NOD/SCID B2M^{null} zeigt, das mit CD34⁺CD38^{+/low}-Zellen transplantiert worden ist, die in der Gegenwart von D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, kultiviert wurden. Die sortierten Zellen (2×10^5 Anfangszellen/Behandlung) wurden in der Gegenwart von D1-FRIL für 6 Tage gefolgt von weiteren 4 Tagen einer Cytokin-Aussetzung oder mit D1-FRIL alleine für 10 Tage kultiviert. Nach 10 Tagen wurden $3,6 \times 10^5$ Zellen, die aus der Cytokin-Kultur geerntet wurden, geteilt und in 3 Mäusen (Bahn 1 bis 3) transplantiert, während $3,5 \times 10^4$ Zellen, die aus der Kultur mit D1-FRIL allein geerntet wurden, in eine Maus transplantiert wurden (Bahn 4). DNA wurde aus dem Knochenmark der transplantierten Mäuse geerntet und einer Southern Blot-Analyse mit einer radioaktiv-markierten α -Satellitensonde, die für humanes Chromosom 17 spezifisch ist (p17H8), unterzogen. Es ist ein repräsentatives Experiment von 4 gezeigt.

[0054] **Fig. 32** ist eine Darstellung eines Balkendiagramms, das den durchschnittlichen Anstieg der Transplantationsgrade zeigt, die von CD34⁺CD38^{-/low}-Zellen erhalten wurden, die mit D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, für 6 Tage und mit Cytokinen für 4 Tage (rechter Balken) zum Vergleich für 10 Tage mit D1-FRIL allein (linker Balken) kultiviert wurden. Die Daten stellen Durchschnittswerte \pm SE von 4 Experimenten dar.

[0055] **Fig. 33A bis Fig. 33F** sind Darstellungen eines Balkendiagramms (**Fig. 33A**) und repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme (**Fig. 33B bis Fig. 33F**), welche die Multiliniendifferenzierung von SRC, die mit D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, kultiviert wurden, im Knochenmark von transplantierten Mäusen zeigen. **Fig. 33A** zeigt die Anzahl der Kolonien pro 2×10^5 Zellen, wobei die Zellen, die als behandelt gekennzeichnet sind, vor der Transplantation in Mäusen von dem murinen Knochenmark gewonnen wurden und in halbfesten Medien, die selektiv für humane Kolonien sind, ausgesetzt wurden. Die Vorläuferspiegel wurden basierend auf der Gesamtzahl von humanen Zellen (2×10^5 Zellen) in dem Knochenmark von transplantierten Mäusen berechnet. Die gezeigten Werte stellen die Durchschnittswerte \pm SEM der Daten von 3 Experimenten, 9 Mäusen/Behandlung dar. **Fig. 33B** zeigt eine repräsentative Durchflusszytometrie-Analyse, welche die nicht-spezifische Markierung zeigt, bei der Maus-IgG als isotypische Kontrolle verwendet wurde. **Fig. 33C** und **Fig. 33D** zeigen repräsentative Durchflusszytometrie-Analysen und Knochenmarkszellen von Mäusen, die mit CD34⁺-Zellen (**Fig. 33C**) oder CD34⁺CD38^{-/low}-Zellen (**Fig. 33D**), die mit D1-FRIL für 10 Tage prä-kultiviert wurden, transplantiert worden sind, wobei die geernteten Knochenmarkszellen mit antihumanem CD45 und antihumanem CD19 gefärbt wurden. **Fig. 33E** und **Fig. 33F** zeigen repräsentative Durchflusszytometrie-Analysen von Knochenmarkszellen von Mäusen, die mit CD34⁺-Zellen (**Fig. 33E**) oder CD34⁺CD38^{-/low}-Zellen (**Fig. 33F**), die mit D1-FRIL für

10 Tage präkultiviert wurden, transplantiert worden sind, wobei die geernteten Knochenmarkszellen anschließend mit SCF + IL-15 für 10 Tage kultiviert wurden und dann mit spezifischen humanen monoklonalen Anti-CD45 und Anti-CD56 gefärbt wurden.

[0056] [Fig. 34A](#) bis [Fig. 34B](#) sind Darstellungen von Balkendiagrammen, welche die Wachstumswirkung von D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, auf CD34⁺-Zellen und den Vorläuferzellen zeigt, im Vergleich zu dem Flt3-Liganden und Cytokin-Kombinationen. (+) bezeichnet eine Co-Kultur von Faktoren für die gesamten 10 Tage, während (->) den Austausch des ersten Faktors nach 6 Tagen mit Cytokinen bezeichnet, wie unter der x-Achse angegeben. [Fig. 34A](#) zeigt die Gesamtzellzahl. [Fig. 34B](#) zeigt den Prozentsatz von CFU-GEMM von den Gesamtkolonien. Die gezeigten Werte entsprechen 2×10^5 ausgesetzten Zellen und stellen den Durchschnittswert \pm SEM der Daten von 5 Experimenten dar.

[0057] [Fig. 35A](#) bis [Fig. 35G](#) sind Darstellungen von Durchflusscytometrie-Histogrammen, welche die Zellzyklusanalysen von CD34⁺-Zellen, die mit D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung oder verschiedenen Cytokinen oder Kombinationen davon kultiviert wurden, zeigen. Der DNA-Gehalt wurde durch Durchflusscytometrie mit einer Propidium-Iodid-Färbung bestimmt. Angereicherte CD34⁺-Zellen wurden für 3 Tage ohne Behandlung ([Fig. 35A](#)), D1-FRIL ([Fig. 35B](#)), Flt3-L ([Fig. 35C](#)), D1-FRIL + Flt3-L ([Fig. 35D](#)), SCF + G-CSF + IL-3 + IL-6 (SG36) ([Fig. 35E](#)), SG36 + D1-FRIL ([Fig. 35F](#)) und SG36 + Flt3-L ([Fig. 35G](#)) kultiviert.

[0058] [Fig. 36A](#) bis [Fig. 36C](#) sind Darstellungen von Liniendiagrammen, welche die Dosisantwort von CB-mnc-Chemotherapieagenzien in der Gegenwart und Abwesenheit von D1-FRIL, einem repräsentativen, nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung zeigen. Chemotherapeutische Agenzien wurden über einen 5-Log-Dosisbereich mit CB-MNC (2×10^5 Zellen/0,1 ml) in AIMV (Life Technologies), das Agar-SCM (StemCell Technologies) enthält, untersucht. Lebende Zellen wurden nach 5 Tagen Kultivierung durch XTT bestimmt. Gefüllte Quadrate bezeichnen Chemotherapie-Arzneimittel ohne D1-FRIL; gefüllte Dreiecke bezeichnen Kulturen, die D1-FRIL mit 10 ng/ml in allen Vertiefungen enthalten und offene Kreise bezeichnen D1-FRIL mit 100 ng/ml in allen Vertiefungen. [Fig. 36A](#) zeigt die Dosisantwort gegen Ara-C; [Fig. 36B](#) zeigt die Dosisantwort gegen Doxorubicin; und [Fig. 36C](#) zeigt die Dosisantwort gegen 5-FU.

[0059] [Fig. 37](#) ist eine Darstellung einer Fotografie von gereinigtem D1-FRIL, einem repräsentativen, jedoch nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung, das durch SDS-PAGE-Analyse aufgetrennt wurde. Es erschienen fünf konkrete Banden, welchen den α - und β -Untereinheiten entsprechen, wobei jede von ihnen einer aminoterminalen Sequenzierung unterzogen wurde. Die Aminosäuresequenzen der fünf Banden entsprechen den gezeigten.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0060] Die Erfindung betrifft die Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die ein FRIL-Protein enthält, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 6 umfasst, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Zustands, der durch eine hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität bei einer strahlentherapeutischen oder einer chemotherapeutischen Behandlung oder einer Kombination von einer strahlentherapeutischen oder einer chemotherapeutischen Behandlung charakterisiert ist, wobei die therapeutische wirksame Menge der Zusammensetzung die hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität der therapeutischen Behandlung in dem Patienten lindert oder reduziert, und wobei das Arzneimittel vor der strahlentherapeutischen oder chemotherapeutischen Behandlung verabreicht wird, wobei das Arzneimittel ungefähr 5 Tage bis ungefähr 2 Stunden vor der therapeutischen Behandlung verabreicht wird und täglich verabreicht wird. Das Mitglied der FRIL-Familie stammt von der Leguminose *Phaseolus vulgaris*.

[0061] Die Erfindung beschreibt eine im Wesentlichen reine Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie von Konservierungsfaktoren für Vorläuferzellen, welche die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 6 für die beanspruchte Verwendung umfassen. Der Ausdruck "FRIL-Familie von Konservierungsfaktoren für Vorläuferzellen" wird verwendet, um eine Familie von Lectinen zu bezeichnen, wobei jedes Mitglieds-molekül der FRIL-Familie an normal glykosylierten FLT3-Rezeptor bindet, wobei jedes Mitglieds-molekül der FRIL-Familie Vorläuferzellen konserviert, und wobei ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie, das aus einer Hyazinthenbohne (d.h. *Dolichos lab lab*) isoliert wird, eine Aminosäuresequenz aufweist, welche die folgenden acht Aminosäurereste umfasst: TNNVLQXT (SEQ ID NO: 24). Mit "Mitglied der FRIL-Familie" oder "Mitglieds-molekül der FRIL-Familie" sind ein oder mehrere Moleküle der FRIL-Familie von Konservierungsfaktoren für Vorläuferzellen gemeint.

[0062] Sowohl die Aminosäuresequenzidentität als auch die Nukleinsäuresequenzidentität zwischen den beiden Proteinen oder den beiden Nukleinsäuremolekülen kann anhand von Standardverfahren gemessen werden. Zum Beispiel können zum Vergleich einer ersten Aminosäuresequenz mit einer zweiten Aminosäuresequenz oder einer ersten Nukleinsäuresequenz mit einer zweiten Nukleinsäuresequenz zum Zwecke der Bestimmung der prozentualen Identität zwischen den beiden Sequenzen die Sequenzen so aneinander angelagert werden, dass die Anzahl von identischen Aminosäure- oder Nukleinsäureresten maximiert wird. Die Sequenzen von Proteinen, die mindestens eine Aminosäuresequenzidentität von 50% aufweisen oder die Sequenzen von Nukleinsäuren, die mindestens eine Nukleinsäureidentität von 45% aufweisen, können gewöhnlicherweise mit dem bloßen Auge aneinander angelagert werden. Wenn dies mit dem bloßen Auge nicht mehr möglich sein sollte, können die Proteine oder Nukleinsäuren mittels den FASTA-Verfahren gemäß Pearson und Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444–2448, 1988) oder, vorzugsweise, eines der Verfahren, die von George, D. G. et al. in *Macromolecular Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, Seiten 127–149, Alan R. Liss, Inc. (1988), beschrieben wurden, aneinander angelagert werden, z.B. anhand der Formel 4 auf Seite 137 unter Verwendung eines Match-Score von 1, einem Mismatch-Score von 9 und einer Gap Penalty von –1. Mit diesem Verfahren kann der Prozentsatz der Sequenzidentität zwischen den ersten und den zweiten Aminosäuresequenzen oder zwischen den ersten und zweiten Nukleinsäuren bestimmt werden.

[0063] Andere Verfahren zur Bestimmung der Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenzidentität sind in Feng und Doolittle (Journal of Molecular Evolution 25: 351–360, 1987) und Higgins und Sharp (CABIOS 5: 151–153, 1989) beschrieben.

[0064] Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenzidentität zwischen zwei Proteinen oder Nukleinsäuren besteht darin, dass eine Sequenzanalysen-Software mit den hier genannten Vorgabeparametern verwendet wird. Es existieren verschiedene Softwarepakete, einschließlich dem Sequenzanalysesoftwarepaket von der Genetics Computer Group (University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI) und den verschiedenen BLAST-Programmen des National Center for Biotechnology (National Library of Medicine, Bethesda, MD).

[0065] Soweit nichts anderes angegeben ist, wird der Prozentsatz der Aminosäuresequenzidentität oder der Prozentsatz der Nukleinsäuresequenzidentität unter Verwendung des BLAST-Grundprogramms des National Center for Biotechnology (National Library of Medicine, Bethesda, MD) unter Verwendung der darin definierten Vorgabeeinstellungen bestimmt.

[0066] Eine weitere Möglichkeit, die prozentuale Identität von zwei Nukleinsäuresequenzen zu testen, besteht darin, ob diese unter normalen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren. Daher sind von der Erfindung auch Proteine umfasst, die von Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, die unter hochstringenten Bedingungen an eine Sequenz hybridisieren, die komplementär ist zu SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 und/oder SEQ ID NO: 7. Der Ausdruck "stringente Bedingungen", wie hier verwendet, entspricht den Ausdrücken "hochstringente Bedingungen" und "hohe Stringenz". Diese Ausdrücke werden auf dem Gebiet austauschbar verwendet.

[0067] Stringente Bedingungen sind verschiedenartig ausgestaltet. In einer Ausgestaltung werden die stringenten Bedingungen so gewählt, dass sie ungefähr 50°C niedriger sind als der thermale Schmelzpunkt (T_m) für eine spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und pH. Der T_m ist die Temperatur (bei definierter Ionenstärke und pH), bei der 50% der Zielsequenz an eine perfekt übereinstimmende Sequenz hybridisiert. Typische stringente Bedingungen sind solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,02 M bei pH 7 und die Temperatur mindestens ungefähr 60°C beträgt. "Stringente Bedingungen", die auf eine prozentuale Identität (z.B. Homologie) oder wesentliche Ähnlichkeit im Hybridisierungszusammenhang verweisen, können kombinierte Bedingungen von Salz, Temperatur, organischen Lösungsmitteln oder anderen Parametern sein, die üblicherweise dafür bekannt sind, dass sie Hybridisierungsreaktionen kontrollieren. Die Kombination von Parametern ist wichtiger als der Wert eines einzelnen Parameters. Wenn sich unvollständig komplementäre Sequenzen gegenseitig unter hochstringenten Bedingungen erkennen, dann hybridisieren diese Sequenzen unter hochstringenten Bedingungen (siehe US-Patent Nr. 5,786,210; Wetmur und Davidson, J. Mol. Biol. 31, 349–370, 1968). Die Kontrolle der Hybridisierungsbedingungen und die Beziehung zwischen den Hybridisierungsbedingungen und dem Grad der Homologie sind für den Fachmann bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989). Weitere Beispiele für stringente Bedingungen können in Goeddel et al., US-Patent Nr. 5,789,550, gefunden werden.

[0068] In einem nicht beschränkenden Beispiel können "stringente Bedingungen" auf vielfältige Weise aus-

gestaltet sein, wie z.B. einer Übernacht-Inkubation bei 42°C in einer Lösung, die 20% Formamid, 5 × SSC (150 mM, NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5 × Denhardt-Lösung, 10% Dextranulfat und 20 µg/ml denaturierte, gescherte Spermien-DNA von Lachs umfasst. Alternativ sind die stringenten Bedingungen durch einen Hybridisierungspuffer, der 30% Formamid in 5 × SSPE (0,18 M NaCl, 0,01 M NaPO₄, pH 7,7, 0,0001 M EDTA) umfasst, bei einer Temperatur von 42°C und einem anschließenden Waschen bei 42°C mit 0,2 × SSPE charakterisiert. Vorzugsweise beinhalten stringente Bedingungen die Verwendung eines Hybridisierungspuffers, der 50% Formamid in 5 × SSPE bei einer Temperatur von 42°C und das Waschen bei derselben Temperatur mit 0,2 × SSPE umfasst.

[0069] Wie hier verwendet, bezeichnet "Konservierung von Vorläuferzellen" die Fähigkeit eines Mitgliedmoleküls der FRIL-Familie (oder einer Mutanten davon oder einem Fusionsprotein, das ein Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie oder eine Mutante davon umfasst), das Vorläuferzellen in einem undifferenzierten Stadium zurückgehalten (d.h. konserviert) werden, was bei Verwendung der unten beschriebenen Assays bestimmt werden kann (z.B. dem SCID-Maus-Rekonstitutionszellassay und dem auf Methylcellulose oder anderem halbfesten Medium basierenden hämatopoetischen Vorläuferzell-Assay). Gemäß der Erfindung bezeichnet "Vorläuferzelle" eine normale somatische Zelle, die die Fähigkeit besitzt, vollständig differenzierte, funktionelle Nachkommen durch Differenzierung und Proliferation zu erzeugen. Vorläuferzellen umfassen Vorläufer von einem beliebigen Gewebe- oder Organsystem, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Blut, Mesenchym, Embryo, Nerven, Muskel, Haut, Darm, Knochen, Niere, Leber, Pankreas, Thymus, Gehirn und dergleichen. Vorläuferzellen werden von "differenzierten Zellen" unterschieden, wobei die letzteren als solche Zellen definiert sind, die die Fähigkeit zur Proliferation, d.h. zur Selbstreplikation, haben oder nicht haben, die aber nicht in der Lage sind, eine weitere Differenzierung in einen anderen Zelltyp unter normalen physiologischen Bedingungen durchzumachen. Darüber hinaus werden Vorläuferzellen weiter von abnormalen Zellen, wie die hier definierten neoplastischen Zellen, unterschieden. Zum Beispiel proliferieren (selbstreplizieren) Leukämiezellen, sie differenzieren jedoch im Allgemeinen nicht weiter, obwohl sie unreif oder undifferenziert erscheinen.

[0070] Vorläuferzellen umfassen all die Zellen in einer Differenzierungs- und Proliferationslinie, die sich vor den am meisten differenzierten oder vollständig ausgereiften Zellen befinden. Daher umfassen z.B. Vorläuferzellen die Hautvorläuferzellen in dem ausgereiften Individuum. Die Hautvorläuferzelle ist zur Differenzierung in einem einzigen Zelltyp fähig, ist selbst aber nicht vollständig ausgereift oder vollständig differenziert.

[0071] Unter "Hämatopoese" versteht man die Entwicklung von reifen, funktionellen Blutzellen. Die Vorläuferzellen, die zu reifen, funktionellen Blutzellen führen, werden als hämatopoetische Vorläuferzellen bezeichnet. Die primitivste, undifferenzierte hämatopoetische Vorläuferzelle wird als hämatopoetische Stammzelle bezeichnet. Hämatopoetische Stammzellen verbleiben typischerweise im Knochenmark, zumeist in einem Ruhezustand, und können identische Tochterzellen über einen Prozess, der als "Selbsterneuerung" bezeichnet wird, bilden.

[0072] Die Herstellung von einigen reifen, funktionellen Blutzellen ist auf die Proliferation und Differenzierung von "unipotenten Vorläuferzellen", d.h. solchen Vorläuferzellen, die die Fähigkeit haben, nur eine Blutzellart zu bilden, zurückzuführen. Bei der Bildung von roten Blutzellen (Erythrocyten) besitzt ein unipotenter Vorläufer, der als "CFU-E" (colony forming unit-erythroid; Kolonie-bildender Einheitserythroid) die Fähigkeit 2 bis 32 reife Nachkommenzellen zu bilden. Es sind verschiedene andere hämatopoetische Vorläufer charakterisiert worden. Zum Beispiel umfassen hämatopoetische Vorläuferzellen solche Zellen, die zu aufeinanderfolgenden Differenzierungs- und Proliferationszyklen fähig sind, um so bis zu 8 unterschiedliche reife hämatopoetische Zelllinien hervorzubringen.

[0073] Ungebundene Vorläuferzellen, wie hämatopoetische Stammzellen, können als "totipotent" bezeichnet werden, d.h. sie sind zur Bildung von allen Arten von reifen Zellen notwendig und ausreichend. Vorläuferzellen, die die Fähigkeit haben, alle Zelllinien zu bilden, aber sich nicht selbst erneuern können, werden als "pluripotent" bezeichnet. Zellen, die einige aber nicht alle Blutlinien bilden können und sich nicht selbst erneuern können, werden als "multipotent" bezeichnet.

[0074] Vorläuferzellen können anhand der mRNA-Spiegel von Genen, die entweder spezifisch Vorläuferzellen regulieren oder als Marker für die Zugehörigkeit einer Linie dienen, definiert werden. Zum Beispiel umfassen Gene, die in primitiven humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen induziert werden, solche Gene, die für die gemeinsamen beta-Untereinheiten der Rezeptoren von IL3, IL5 und/oder Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), die als allgemeine beta-Kette bezeichnet werden (McClanahan et al., Blood 81: 3903–2915, 1993); CD34-Gene; und/oder die Rezeptoren für Kit (Turner et al., Blood 88: 3383–3390, 1996), FLT1, FLT4 (Galland et al., Oncogene 8: 3233–1240, 1993), FLK1 (Broxmeyer et al., Int. J. Hematol.

62: 303–215, 1995) und FLT3 (Lyman und Jacobsen, Blood 91: 3101–1134, 1998) kodieren. Diese Gene für Zwischenvorläufer umfassen die c-Fms-, G-CSF-Rezeptor- und/oder CD34-Gene; und das IL-7-Rezeptorgen, einem Gen, das zur B-Lymphopoese induziert wird.

[0075] Populationen von primitiven Vorläufern der Maus umfassen Rezeptoren für Interleukin-1 alpha (IL-1 α), IL-3, IL-6, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und/oder FLK1-1 (dem Maushomolog von dem menschlichen KDR, der an VEGF bindet; Broxmeyer, oben), aber dem die Rezeptoren für den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF) fehlt. Zellen in dieser Population von Zwischenvorläuferzellen umfassen Rezeptoren für GM-CSF, G-CSF, IL-6 und/oder IL-1 α .

[0076] Gemäß der Erfindung werden die Ausdrücke "binden", "bindet" oder "gebunden" austauschbar verwendet, um ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie der Erfindung zu bezeichnen, das an einen normal glykosylierten FLT3-Rezeptor mit einer Affinität bindet, die höher ist als die Affinität, mit der der FLT3-Ligand an den FLT3-Rezeptor bindet. Vorzugsweise bindet ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie an einen normal glykosylierten FLT3-Rezeptor mit einer Affinität, die mindestens so hoch ist wie die Affinität, mit der ein Antikörper an dessen spezifischen Liganden bindet. Bevorzugter ist es, dass ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie der Erfindung an einen normal glykosylierten FLT3-Rezeptor mit einer Affinität bindet, die höher ist als die Affinität, mit der ein Antikörper an dessen spezifischen Liganden bindet. Es ist bevorzugter, dass ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie der Erfindung an einen normal glykosylierten FLT3-Rezeptor mit einer Dissoziationskonstanten (K_D) von mindestens 10^{-7} M, bevorzugter 10^{-8} M, noch bevorzugter 10^{-9} M und am bevorzugtesten mit mindestens 10^{-10} M bindet und vorzugsweise bindet ein Mitglied der FRIL-Familie der Erfindung an einen normal glykosylierten FLT3-Rezeptor mit einer Dissoziationskonstanten (K_D) von mindestens 10^{-11} M. Standardverfahren zur Bestimmung der Bindung und der Bindungsaffinität sind bekannt.

[0077] Gemäß der Erfindung ist mit "normal glykosylierter FLT3-Rezeptor" ein FLT3-Rezeptor gemeint, der ein Glykosylierungsmuster von einer FLT3-Zelle besitzt, der durch eine normale Zelle glykosyliert wurde. Mit "normaler Zelle", wie hier gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet, ist eine Zelle gemeint, die nicht neoplastisch ist. Wie hier verwendet, ist mit "neoplastische Zelle" eine Zelle gemeint, die eine aberrante Proliferation, insbesondere eine erhöhte Proliferation aufweist und nicht durch solche Faktoren, wie einer Zell-Zell-Kontakthemmung und löslichen Regulatoren (z.B. Cytokinen oder Hormonen) reguliert wird, und die den FLT3-Rezeptor abnormal glykosyliert, so dass das Glykosylierungsmuster des FLT3-Rezeptors auf den neoplastischen Zellen abnormal ist, so dass der FLT3-Rezeptor auf der neoplastischen Zelle nicht durch ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie gebunden wird.

[0078] Gemäß der Erfindung ist mit "im Wesentlichen rein" ein Molekül gemeint, z.B. eine Nukleinsäure oder Protein (z.B. ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie) oder eine Zusammensetzung von einem Molekül, das weniger andere organische Moleküle aufweist (z.B. Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Proteine und Lipide), die normalerweise in einem unreinen Molekül anzutreffen sind und das im Wesentlichen keine während des Aufreinigungsprozesses verwendete Stoffe aufweist. Zum Beispiel wird ein Protein oder ein Nukleinsäuremolekül als im Wesentlichen rein bezeichnet, wenn es mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 75%, bevorzugter mindestens 85%, noch bevorzugter mindestens 90% und optimalerweise mindestens 95% rein ist, d.h. frei von anderen organischen Molekülen, mit denen es normalerweise anzutreffen ist und frei von Stoffen, die während des Aufreinigungsprozesses verwendet werden. Verfahren zur Aufreinigung von Proteinen sind auf dem Gebiet bekannt und umfassen ohne Beschränkung HPLC, SDS-PAGE, Immunpräzipitation, rekombinante Proteinherstellung, Affinitätschromatographie unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, Ionenaustausch-, Größenausschluss-, und hydrophobe Interaktionschromatographie oder eine Kombination beliebiger dieser Verfahren. Diese und andere geeignete Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Marston, "The purification of eukaryotic proteins expressed in *E. coli*", in DNA Cloning, Glover D. M., Herausgeber, Band III, IRL Press Ltd., Oxford, 1987; Marston und Hartley, "Solubilization of protein aggregates", Seiten 266–267 in Guide to Protein Purification, Deutscher MP, Herausgeber, Academic Press, San Diego, 1990; Laemmli, U. K., Nature 227: 680–685, 1970. Ein Mitglied der FRIL-Familie kann auch aufgereinigt werden, indem es an Mannose bindet, die an einen Festträger gekoppelt sein kann (z.B. Sepharose-Beads).

[0079] Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren sind auf dem Gebiet bekannt und umfassen ohne Beschränkung Guanidin-HCl-Extraktion, Polymerasenkettenreaktion, CsCl-Gradientenfractionierung, Phenol: Chloroform-Extraktion, Ethanol-Präzipitation und rekombinante Standard-DNA-Verfahren. Standardverfahren zur Aufreinigung sowohl von Proteinen als auch von Nukleinsäuremolekülen werden bereitgestellt beispielsweise von Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1994; Sambrook et al., supra.

[0080] Ein Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie kann von einer natürlichen Quelle durch auf dem Gebiet bekannte Verfahren aufgereinigt werden. Zum Beispiel ist die Aufreinigung von D1-FRIL aus *Dolichos lab lab* unten im Beispiel 1 beschrieben. Die Aufreinigung von Pv-FRIL von *Phaseolus vulgaris* ist unten in Beispiel 5 beschrieben. Die Aufreinigung von YamFRIL aus *Sphenostylis stenocarpa* ist unten in Beispiel 22 beschrieben. Solche Verfahren umfassen z.B. solche, die von Moore in der PCT-Anmeldung PCT/US97/22486 und von Gowda et al., oben, beschrieben wurden. Eine geeignete natürliche Quelle, aus der ein Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie aufgereinigt werden kann, umfasst Pflanzen, insbesondere Leguminosenpflanzen. Leguminosen wie die Gartenerbse oder die Gartenbohne sind Pflanzen ("hülsenfruchtartige Pflanzen") von einer Familie (Leguminosae) von zweikeimblättrigen Kräutern, Sträuchern und Bäumen, die auf deren Wurzeln Knötchen (stickstofffixierende Bakterien) tragen. Diese Pflanzen sind üblicherweise mit deren Samen assoziiert (z.B. die Gartenerbse oder die Gartenbohne).

[0081] Insbesondere kann ein Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie von Mitgliedern des Tribus Phaseoleae aufgereinigt werden. Zum Beispiel kann ein Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie von *Dolichos lab lab* aufgereinigt werden (z.B. Hyazinthenbohnen, die auch mit anderen üblichen Namen überall in der Welt bekannt sind). Alternativ kann ein Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie von einer Vielfalt der üblichen Bohne (*Phaseolus vulgaris*; z.B. rote Bohnen und weiße Bohnen), von der Yambohne (*Sphenostylis stenocarpa*) oder von *Vigna sinensis*, die als Augenbohne bekannt ist, aufgereinigt werden.

[0082] Wie in den Beispielen unten gezeigt, ist eine Aufreinigung eines Mitgliedsmoleküls der FRIL-Familie von einer Leguminose schnell und billig und ergibt eine große Menge von im Wesentlichen reinen Lectin. Ein natives Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie kann leicht von Leguminosen aufgereinigt werden, z.B. von Hyazinthenbohnen (Pestizid-frei) mittels Mannose-Affinitätschromatographie oder Ovalbumin-Affinitätschromatographie und ist um mehr als das 100%-fache billiger als rekombinante Cytokine herzustellen. Vorzugsweise ist ein Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie ein Mannose/Glukose-spezifisches Leguminosen-Lectin. Mit "Lectin" ist ein Protein gemeint, das Zuckerreste mit hoher Affinität bindet.

[0083] Wie in dem Beispiel unten gezeigt, besitzen Mitgliedsmoleküle der FRIL-Familie und Zusammensetzungen von Mitgliedsmolekülen der FRIL-Familie viele Möglichkeiten als Reagenzien, um die Vorläuferzellen-depletierende Aktivität eines Therapeutikums (z.B. eines Chemotherapeutikums) entweder zu lindern oder die Symptome eines Zustandes, bei dem die Vorläuferzellen des Patienten depletiert sind, abzuschwächen. Zum Beispiel haben Mitglieder der FRIL-Familie einzigartige Eigenschaften und stellen die ersten löslichen Regulatoren dar, von denen berichtet wurde, dass sie hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen für längere Zeiträume in ihrem Ruhezustand konservieren, selbst in der Gegenwart von wirksamen Stimulatoren der Proliferation und Differenzierung. Darüber hinaus kann dies einen wirksameren Schutz von Stammzellen und Vorläufern ermöglichen, da Mäuse sehr hohe Spiegel von Zusammensetzungen von Mitgliedern der FRIL-Familie tolerieren, um dadurch deren Rekrutierung während aggressiven Dosisintensivierungskuren, die eine höhere Häufigkeit und Dosierungsspiegel der Chemotherapie zum Ziel haben, zu verhindern. Während die biologische Aktivität von D1-FRIL denen von Cytokin ähnlich ist (ng/ml-Bereich), was in dem Beispiel unten gezeigt ist, tolerierten Mäuse eine bis zu 1000-fach höhere Menge an D1-FRIL als Cytokine.

[0084] Zusätzlich können ein oder mehrere Mitglieder der FRIL-Familie die Verabreichung eines großen Bereichs von Zellzyklus-aktiven Chemotherapierzneimitteln mit höherer Häufigkeit und höheren Dosen ermöglichen, indem hämatopoetische Stammzellen und andere Vorläuferzellen in einem Ruhezustand gehalten werden. Daher kann die Verabreichung einer Zusammensetzung von einem oder mehreren Mitgliedern der FRIL-Familie eine aggressivere Dosisintensivierungsschemotherapien für einen Breitenbereich von Chemotherapierzneimitteln bereitstellen. Die Verabreichung einer Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie stellt auch ein größeres Reservoir an Vorläuferzellen bereit, die schnell auf stimulatorische Signale am Ende einer Chemotherapie reagieren könnten.

[0085] Das Mitglied der FRIL-Familie, das gemäß der Erfindung verwendet wird, stammt von einer Leguminose (z.B. einer Bohnenpflanze) ab, d.h. von einer roten Bohne (*Phaseolus vulgaris*). Das erfindungsgemäße Mitglied der FRIL-Familie, das aus der roten Bohne isoliert wurde, besitzt die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 6 und wird bevorzugt durch eine Nukleinsäure kodiert, welche die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 5 besitzt.

[0086] Im Folgenden wird das Mitgliedsmolekül der FRIL-Familie beschrieben, aber nicht beansprucht. Es handelt sich um ein Fusionsprotein, das einen ersten Teil und einen zweiten Teil umfasst, wobei der erste Teil von einem zweiten Mitglied der FRIL-Familie abstammt. Mit "Fusionsprotein" ist ein Molekül gemeint, das mindestens zwei Proteine oder Polypeptidfragmente davon umfasst, die miteinander verbunden sind, wobei die

Proteine oder Polypeptidfragmente davon nicht in dem natürlich vorkommenden Organismus, aus dem die Proteine oder Polypeptidfragmente davon stammen, miteinander verbunden sind. Die zwei Proteine oder Polypeptidfragmente davon von einem Fusionsprotein können durch beliebige Mittel miteinander verbunden sein, einschließlich aber nicht beschränkt auf einen chemischen Linker, einer Peptidbindung oder einer nicht-kovalenten Bindung, wie einer Ionenbindung. Mit "Protein" oder "Polypeptid" ist eine Kette von zwei oder mehreren Aminosäureresten gemeint, die mit einer Peptidbindung miteinander verbunden sind, unabhängig von der Länge oder einer posttranslationalen Modifikation, wie Acetylierung, Glykosylierung, Lipidbildung oder Phosphorylierung.

[0087] Ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie, das ein Fusionsprotein ist, kann einen ersten Teil, der von einem Mitglied der FRIL-Familie abstammt, und einem zweiten Teil, der von einem Protein oder anderen Molekül, das nicht mit der FRIL-Familie verwandt ist, abstammt, umfassen (z.B. die schwere Kette eines Antikörpers).

[0088] Ein weiteres Mitglieds-molekül der FRIL-Familie, das ein Fusionsprotein ist, ist ein Mitglied der FRIL-Familie, das die α -Untereinheit von einem ersten Mitglied der FRIL-Familie und eine β -Untereinheit von einem zweiten Mitglied der FRIL-Familie umfasst. Ein solches Fusionsprotein kann hergestellt werden, indem z.B. eine Nukleinsäuresequenz, die für die α -Untereinheit des ersten Mitglieds der FRIL-Familie kodiert, im Leseraster mit einer Nukleinsäuresequenz, die für die β -Untereinheit des zweiten Mitglieds der FRIL-Familie kodiert, miteinander verbunden wird. Die Nukleinsäure, die für ein solches Fusionsprotein kodiert, kann manipuliert werden, um eine Enzym-spezifische Spaltungsstelle zwischen dem Teil, der für die α -Untereinheit des ersten Mitglieds der FRIL-Familie kodiert und dem Teil, der für die β -Untereinheit des zweiten Mitglieds der FRIL-Familie kodiert, zu kodieren.

[0089] Wo ein Mitglied der FRIL-Familie ein Fusionsprotein ist, wird die Identität des Fusionsproteins als ein Mitglied der FRIL-Familie anhand der Sequenzidentität zwischen dem abgeleiteten Teil des Mitglieds der FRIL-Familie des Fusionsproteins und einem zweiten Mitglied der FRIL-Familie bestimmt, wobei der vom Mitglied der FRIL-Familie abgeleitete Teil des Fusionsproteins und das zweite Mitglied der FRIL-Familie eine Aminosäuresequenzidentität von mindestens ungefähr 45%, bevorzugter von mindestens ungefähr 50% Identität und noch bevorzugter von mindestens ungefähr 55% Identität, noch bevorzugter mindestens ungefähr 60% Identität, noch bevorzugter mindestens ungefähr 65% Identität und noch bevorzugter mindestens ungefähr 75% Sequenzidentität, noch bevorzugter mindestens ungefähr 85% Identität und am meisten bevorzugt mindestens ungefähr 95% Identität mit der Aminosäuresequenz eines zweiten Mitglieds der FRIL-Familie aufweist.

[0090] Ein Mitglied der FRIL-Familie kann gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung auch ein rekombinantes Protein sein, das durch Expression einer rekombinanten Nukleinsäure, die für FRIL in einem geeigneten Wirt kodiert, hergestellt wurde. Daher betrifft die Erfindung in einem zweiten Aspekt ein im Wesentlichen reines Nukleinsäuremolekül, das für ein Mitglied der FRIL-Familie von Konservierungsfaktoren für Vorläuferzellen für die beanspruchte Verwendung kodiert. Beispielhafte Aufreinigungen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle aus *Dolichos lab lab* und *Phaseolus vulgaris* sind unten beschrieben. Es ist hinreichend bekannt, dass eine Familie von Nukleinsäuren dann konstruiert werden kann, wenn eine Aminosäuresequenz (Primärstruktur) bekannt ist, wobei jede Nukleinsäure eine Sequenz besitzt, die sich von den anderen durch mindestens ein Nukleotid unterscheidet, wo aber jede unterschiedliche Nukleinsäure immer noch für dasselbe Protein kodiert. Zum Beispiel kann das Gen über eine Amplifikation von genomischer DNA unter Verwendung eines Satzes von degenerierten Primern erhalten werden, die alle möglichen Sequenzen, die für das Protein kodieren, abdecken. Daher braucht eine Nukleinsäure gemäß diesem Aspekt der Erfindung keine natürlich vorkommende Sequenz besitzen, sondern nur für ein Mitglied der FRIL-Familie gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung kodieren.

[0091] Mit "rekombinante Nukleinsäure" ist eine Nukleinsäure gemeint, die für ein Mitglieds-molekül der FRIL-Familie oder einen Teil davon, der für mindestens 15 zusammenhängende Aminosäuren oder eine Mutante davon, oder ein Fusionsprotein, das das Molekül, den Teil davon oder Mutante davon umfasst, kodiert oder zur Expression eines Antisinn-Moleküls fähig ist, das spezifisch komplementär zu ihr ist oder ein Sinn-Molekül, das eine Nukleinsäuresequenzidentität zu ihr aufweist, wobei die rekombinante Nukleinsäure als lineare DNA oder RNA, kovalent geschlossene zirkuläre DNA oder RNA oder als Teil eines Chromosoms vorliegen kann, vorausgesetzt jedoch, dass es nicht der native chromosomale Lokus des Mitglieds-moleküls der FRIL-Familie ist. Bevorzugte erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäuren sind Vektoren, die einen Replikationsstartpunkt umfassen und daher zur Replikation in einem oder mehreren Zelltypen fähig sind. Bestimmte bevorzugte rekombinante Nukleinsäuren und Expressionsvektoren umfassen weiter mindestens einen Promotor

und einen passiven Terminator, um dadurch die Transkription der rekombinanten Nukleinsäure in Bakterien-, Pilz-, Pflanzen-, Insekten- oder Säugetierzellen zu ermöglichen.

[0092] Unter "Nukleinsäure" oder "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, versteht man eine Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA), einschließlich und ohne Beschränkung komplementäre DNA (cDNA), genomische DNA, RNA, hnRNA, Messenger-RNA (mRNA), DNA/RNA-Hybride oder synthetische Nukleinsäuren (z.B. ein Oligonukleotid), die Ribonukleinsäuren und/oder Desoxyribonukleinsäuren oder synthetische Varianten davon umfassen. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfasst ohne Beschränkung ein Oligonukleotid oder ein Polynukleotid. Die Nukleinsäure kann einzelsträngig oder teilweise oder vollständig doppelsträngig sein (Duplex). Duplex-Nukleinsäuren können als Homoduplex oder Heteroduplex vorliegen.

[0093] Gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung besitzt eine Nukleinsäure, die für ein Mitglied der FRIL-Familie kodiert, mindestens ungefähr eine 50%ige Nukleinsäuresequenzidentität mit einer Nukleinsäure, die für ein anderes Mitglied der FRIL-Familie kodiert, vorzugsweise mindestens ungefähr 55% Nukleinsäuresequenzidentität, bevorzugter mindestens ungefähr 60% Nukleinsäuresequenzidentität, mehr bevorzugt mindestens ungefähr 65% Nukleinsäuresequenzidentität, noch mehr bevorzugt mindestens ungefähr 75% Nukleinsäuresequenzidentität, noch mehr bevorzugt mindestens ungefähr 85% Nukleinsäuresequenzidentität und am meisten bevorzugt mindestens ungefähr 95% Nukleinsäuresequenzidentität mit einer Nukleinsäure, die für ein anderes Mitglied der FRIL-Familie kodiert. Der Prozentsatz der Nukleinsäuresequenzidentität kann, entsprechend dem ersten Aspekt der Erfindung beschrieben, bestimmt werden.

[0094] Eine rekombinante Nukleinsäure kann auch durch auf dem Gebiet bekannte Verfahren chemisch synthetisiert werden. Zum Beispiel kann eine rekombinante DNA chemisch mit den vier Nukleotiden ganz oder teilweise durch auf dem Gebiet bekannte Verfahren synthetisiert werden. Solche Verfahren schließen diejenigen ein, die von Caruthers, M. H., *Science* 230(4723): 281–285, 1985, beschrieben wurden. DNA kann auch synthetisiert werden, indem überlappende doppelsträngige Oligonukleotide hergestellt werden, die Lücken aufgefüllt werden und die Enden miteinander ligiert werden (siehe allgemein Sambrook et al., *supra*, und Glover und Hames, Hrsg., *DNA Cloning*, 2. Ausgabe, Bände 1–4, IRL Press, Oxford, 1995).

[0095] Ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, das für eine Mutante eines Mitglieds der FRIL-Familie kodiert, kann ausgehend von Wildtyp-DNA durch eine Stellengerichtete Mutagenese hergestellt werden (siehe z.B. Zoller und Smith, *Nucleic Acids Res.* 10: 6487–6500, 1982; Zoller, M. J., *Methods Enzymol.* 100: 468–500, 1983; Zoller, M. J., *DNA* 3(6): 479–488, 1984 und McPherson, M. J. Hrsg., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1991. Eine rekombinante Nukleinsäure kann durch auf dem Gebiet bekannte Verfahren amplifiziert werden. Ein geeignetes Verfahren ist das Polymerasenkettenreaktions (PCR)-Verfahren, das in Saiki et al., *Science* 239: 487, 1988, Mullis et al., US-Patent Nr. 4,683,195, und Sambrook et al. *supra*, beschrieben wurde. Es ist einfach, die Klonen in die lambda-gt10- oder lambda-gt11-Vektoren zu amplifizieren, indem lambda-gt10- oder lambda-gt11-spezifische Oligomere als Amplimere verwendet werden (erhältlich von Clontech, Palo Alto, CA). Größere synthetische Nukleinsäurestrukturen können auch hergestellt werden und besitzen spezifische und erkennbare Einsetzmöglichkeiten gemäß der Erfindung. Zum Beispiel sind Vektoren (z.B. rekombinante Expressionsvektoren) bekannt, die den Einbau von rekombinanten Nukleinsäuren von Interesse zur Klonierung und Transformation von anderen Zellen ermöglichen. Daher umfasst die Erfindung weitere Vektoren (z.B. Plasmide, Phagen und Cosmide), die eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz einschließen, insbesondere Vektoren, die das erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäuremolekül einschließen, um ein Mitglied der FRIL-Familie zu exprimieren.

[0096] Eine erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäure kann repliziert und verwendet werden, um ein Mitglied der FRIL-Familie nach einer Insertion in eine Vielzahl von Wirtszellen in einer Vielfalt von Klonierungs- und Expressionsvektoren zu exprimieren. Der Wirt kann prokaryontisch oder eukaryontisch sein. Die Nukleinsäure kann von natürlichen Quellen stammen und gegebenenfalls modifiziert sein. Die Gene können auch vollständig oder teilweise synthetisiert sein.

[0097] Klonierungsvektoren können Abschnitte von chromosomalen, nicht-chromosomalen und synthetischen DNA-Sequenzen umfassen. Einige geeignete prokaryontische Klonierungsvektoren umfassen Plasmide aus *E. coli*, wie colE1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC, pKSM und RP4. Prokaryontische Vektoren umfassen auch Derivate von Phagen-DNA, wie M13fd und anderen filamentösen einzelsträngigen DNA-Phagen.

[0098] Vektoren zur Expression von Proteinen in Bakterien, insbesondere *E. coli*, sind ebenfalls bekannt. Solche Vektoren umfassen pK233 (oder einen anderen der *tac*-Familie von Plasmiden), T7 und lambda P_L. Beispiele von Vektoren, die Fusionsproteine exprimieren, sind PATH-Vektoren, die in Dieckmann und Tzagoloff

(J. Biol. Chem. 260(3): 1513–1520, 1985) beschrieben wurden. Diese Vektoren enthalten DNA-Sequenzen, die für die Anthranilatsynthetase (TrpE) kodieren, gefolgt von einem Polylinker am Carboxyl-Terminus. Andere Expressionsvektorsysteme basieren auf beta-Galactosidase (pEX); Maltose-Bindeprotein (pMAL); Glutathion S-Transferase (pGST); (siehe z.B. Smith, D. B., Gene 67: 31–40, 1988 und Abath, F. G., Peptide Research 3(4): 167–168, 1990).

[0099] Vektoren, die zur Klonierung und Expression in Hefe verwendbar sind, sind auch verfügbar. Ein zweckmäßiges Beispiel stellt das 2 µ Circle-Plasmid dar.

[0100] Geeignete Klonierungs-/Expressionsvektoren zur Verwendung in Säugetierzellen sind ebenfalls bekannt. Solche Vektoren umfassen bekannte Derivate von SV-40, Adenovirus, Cytomegalovirus (CMV) und von Retrovirus-abgeleitete DNA-Sequenzen. Solche Vektoren ermöglichen die Isolierung und Identifikation von Proteinkodierenden Sequenzen in Prokaryonten, wenn sie mit Vektoren gekoppelt sind, die von einer Kombination von Plasmiden und Phagen-DNA abstammen, z.B. Shuttle-Vektoren.

[0101] Weitere eukaryontische Expressionsvektoren sind auf dem Gebiet bekannt (z.B. Southern und Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1: 327–341, 1982; Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1: 854–864, 1981; Kaufmann und Sharp, Mol. Cell. Biol. 159: 601–621, 1982; Kaufmann und Sharp, Mol. Cell. Biol. 159: 601–664, 1982; Scahill et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4654–4659, 1983; Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216–4220, 1980).

[0102] Die Expressionsvektoren, die in der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, enthalten mindestens eine Expressionskontrollsequenz, die operativ an das zu exprimierende rekombinante Nukleinsäuremolekül oder Fragment davon gebunden ist. Die Kontrollsequenz wird in den Vektor eingeführt, um die Expression der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäure zu kontrollieren und zu regulieren. Beispiele von verwendbaren Expressionskontrollsequenzen sind das lac-System, das trp-System, das tac-System, das trc-System, Hauptoperator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregion des fd Hüll-Proteins, die glykolytischen Promotoren von Hefe, z.B. der Promotor für die 3-Phosphoglyceratkinase, die Promotoren von der sauren Phosphatase der Hefe, z.B. Pho5, die Promotoren der alpha-Mating-Faktoren der Hefe und Promotoren, die von Polyoma, Adenovirus, Retrovirus und Affenvirus abgeleitet sind, z.B. die frühen und späten Promotoren von SV40 und andere Sequenzen, die dafür bekannt sind, dass sie die Expression von Genen von prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen und deren Viren oder Kombinationen davon kontrollieren.

[0103] Verwendbare Expressionswirte zur Expression der erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuren umfassen die üblichen bekannten prokaryontischen und eukaryontischen Zellen. Einige geeignete prokaryontische Wirte umfassen z.B. E. coli, wie E. coli SG-936, E. coli HB101, E. coli W3110, E. coli X1776, E. coli X2282, E. coli DHI und E. coli MRC1, Pseudomonas, Bacillus, wie B. subtilis und Streptomyces. Geeignete eukaryontische Zellen umfassen Hefe- und andere Pilz-, Insekten-, Tierzellen, wie COS-Zellen und CHO-Zellen, humane Zellen und Pflanzenzellen in Gewebekultur.

[0104] Unter Berücksichtigung der hier offenbarten rekombinanten Nukleinsäuresequenzen kann der Fachmann weitere rekombinante Nukleinsäuren entwickeln, die bestimmte Funktionen in verschiedenen Arten von Anwendungen haben können. Zum Beispiel kann der Fachmann Oligonukleotide oder Polynukleotide konstruieren, die als Primer in Nukleinsäureamplifikationsverfahren, wie der Polymerasenkettenreaktion (PCR), Ligasekettenreaktion (LCR), Reparaturkettenreaktion (RCR), PCR-Oligonukleotid-Ligationsassay (PCR-OLA) und dergleichen verwendet werden. Es können Oligonukleotide, die als Sonden für Hybridisierungsuntersuchungen verwendbar sind, wie z.B. einer in situ-Hybridisierung, konstruiert werden. Zahlreiche Verfahren zur Markierung solcher Sonden mit Radioisotopen, Fluoreszenzmarkierungen, Enzymen, Bindungsresten (z.B. Biotin) und dergleichen sind bekannt, so dass die Sonden für eine leichte Detektierbarkeit angepasst werden können.

[0105] Oligonukleotide können auch für andere Zwecke entworfen und hergestellt werden. Zum Beispiel ermöglicht die Erfindung dem Fachmann Antisinn-Oligonukleotide und Triplex-bildende Oligonukleotide und dergleichen zu entwerfen, um diese bei der Untersuchung von Struktur-/Funktionsbeziehungen zu verwenden. Eine homologe Rekombination kann erfolgen, indem die erfindungsgemäße Nukleinsäure zur Verwendung als Zielmittel angepasst wird.

[0106] Erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäuren, die wie oben hergestellt werden, können weiter modifiziert werden, um deren biophysikalische oder biologische Eigenschaften mittels auf dem Gebiet bekannten Techniken zu verändern. Zum Beispiel kann die rekombinante Nukleinsäure modifiziert werden, um deren Stabilität gegenüber Nukleasen zu erhöhen (z.B. "end-capping") oder um deren Lipophilität, Löslichkeit oder Bin-

dungsaffinität für komplementäre Sequenzen zu erhöhen. Verfahren zum Modifizieren von Nukleinsäuren, um spezifische Zwecke zu erreichen, sind auf dem Gebiet bekannt und z.B. beschrieben in Sambrook et al., oben. Darüber hinaus kann die erfindungsgemäße rekombinante Nukleinsäure ein oder mehrere Teile einer Nukleotidsequenz einschließen, die nicht für ein Mitglied der FRIL-Familie kodieren.

[0107] Die Erfindung stellt eine pharmazeutische Formulierung für die beanspruchte Verwendung bereit, die eine im Wesentlichen reine Zusammensetzung von einem oder mehreren Mitgliedern der FRIL-Familie von Vorläuferzell-Konservierungsfaktoren und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst. Unter "pharmazeutisch verträglicher Träger" ist ein beliebiger inerte Träger gemeint, der für das Tier, an das er verabreicht wird, nicht toxisch ist und der die therapeutischen Eigenschaften der Verbindung mit der er verabreicht wird (d.h. dem Mitglied der FRIL-Familie) beibehält. Pharmazeutisch verträgliche Träger und deren Formulierung sind wohlbekannt und allgemein beschrieben z.B. in Remington's Pharmaceutical Sciences (18. Ausgabe, Hrsg. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990). Ein beispielhafter pharmazeutisch verträglicher Träger ist physiologische Kochsalzlösung. Erfindungsgemäße pharmazeutische Formulierungen können einen beliebigen pharmazeutisch verträglichen Träger verwenden, was von dem Verabreichungsweg der Zusammensetzung abhängt.

[0108] Zusammensetzungen von Mitgliedern der FRIL-Familie können sicher und effizient als Therapeutika verwendet werden. Der Magen-Darm-Trakt von Tieren ist im ständigen Kontakt mit Lectinen, wie Mitgliedern der FRIL-Familie, die in rohem und/oder gekochtem Gemüse sowie Früchten vorhanden sind. Viele Lectine durchlaufen den Magen-Darm-Trakt biologisch unberührt (Pusztai, A., Eur. J. Clin. Nutr. 47: 691–699, 1993). Einige Lectine interagieren mit dem Darm und werden in die periphere Blutzirkulation transportiert. Zum Beispiel hat man bei einer kürzlichen Studie Erdnuss-Agglutinin (PNA) im Blut von Menschen mit Konzentrationen von 1 bis 5 µg/ml eine Stunde nach dem Verdau von 200 g rohen Erdnüssen gefunden (Wang et al., Lancet 352: 1831–1832, 1998). Antikörper gegen Nahrungslectine werden üblicherweise in Menschen bei Konzentrationen von ungefähr 1 µg/ml vorgefunden (Tchernychev und Wilchek, FEBS Lett. 397: 139–142, 1996). Diese zirkulierenden Antikörper blockieren die Kohlenhydratbindung der Lectine nicht.

[0109] Die Erfindung beschreibt die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der pharmazeutischen Formulierung an einen Patienten, der an einem Zustand leidet, bei dem die hämatopoetischen Vorläuferzellen des Patienten depletiert sind und welche den Zustand in dem Patienten lindert und/oder vermindert.

[0110] Gemäß der Erfindung ist mit "therapeutisch wirksame Menge" eine Dosierung von einer Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie oder eine pharmazeutische Formulierung gemeint, die eine Zusammensetzung von einem Mitglied der FRIL-Familie umfasst, die wirksam ist, um entweder einen Zustand, bei dem die hämatopoetischen Vorläuferzellen des Patienten depletiert sind oder eine hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität von einem Therapeutikum (z.B. einem Chemotherapeutikum) lindert und/oder verringert. Vorzugsweise erfolgt eine solche Verabreichung systemisch (z.B. durch intravenöse Injektion). Bei einer systemischen Verabreichung liegt eine therapeutisch wirksame Menge im Bereich von ungefähr 500 ng des Mitglieds der FRIL-Familie/kg Gesamtkörpergewicht und ungefähr 5 mg/kg Gesamtkörpergewicht pro Tag. Vorzugsweise liegt eine therapeutisch wirksame Menge in einem Bereich von ungefähr 500 ng/kg und 500 µg/kg Gesamtkörpergewicht des Mitglieds der FRIL-Familie pro Tag. Noch bevorzugter liegt eine therapeutisch wirksame Menge in einem Bereich von ungefähr 5 µg/kg und 50 µg/kg Gesamtkörpergewicht des Mitglieds der FRIL-Familie pro Tag. Am meisten bevorzugt liegt eine therapeutisch wirksame Menge in einer Menge vor, die ungefähr 50 µg/kg Gesamtkörpergewicht des Mitglieds der FRIL-Familie pro Tag abgibt.

[0111] Eine erfindungsgemäße Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie und eine pharmazeutische Formulierung, die eine Zusammensetzung von einem erfindungsgemäßen Mitglied der FRIL-Familie umfassen, können an Patienten, die einen Krankheitszustand haben oder eine Veranlagung haben, einen solchen zu entwickeln, bei dem die hämatopoetischen Vorläuferzellen des Patienten depletiert sind, verabreicht werden. Ein solcher Krankheitszustand kann angeboren sein. Zum Beispiel kann der Patient eine schwere kombinierte Immundefizienz oder aplastische Anämie haben.

[0112] Der Krankheitszustand kann auch durch ein Arzneimittel induziert sein. Daher lindert in bestimmten Ausführungsformen des dritten Aspekts der Erfindung die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der pharmazeutischen Formulierung an einen Patienten vor der Behandlung des Patienten mit einer therapeutischen Behandlung mit einer hämatopoetischen Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität die hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität des Therapeutikums in dem Patienten. Zum Beispiel werden Krebspatienten oft mit Strahlentherapeutika oder Chemotherapeutika behandelt, die eine hämatopoetische Vor-

läuferzellen-depletierende Aktivität besitzen. Unter "hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität" ist eine Aktivität von einer therapeutischen Behandlung gemeint, wobei die hämatopoetischen Vorläuferzellen in dem mit der therapeutischen Behandlung zu behandelnden Patienten depletiert sind, entweder indem die Vorläuferzellen abgetötet werden oder indem die Vorläuferzellen induziert werden, um eine irreversible Differenzierung durchzumachen. Nichtbeschränkend aufzufassende Beispiele der therapeutischen Behandlungen, die eine hämatopoetische Vorläuferzellen-depletierende Aktivität besitzen, sind die chemotherapeutischen Agenzien Cytarabin (Ara-C), Doxorubicin (Dox), Daunorubicin und 5-Fluoruracil (5-FU).

[0113] In bestimmten Ausführungsformen ermöglicht eine Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierung an einen Patienten vor der Behandlung des Patienten mit einer therapeutischen Behandlung mit einer hämatopoetischen Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität die Behandlung des Patienten mit einer höheren Dosis der therapeutischen Behandlung. Die höhere Dosierung der therapeutischen Behandlung kann entweder durch eine erhöhte Dosis der therapeutischen Behandlung und/oder einer erhöhten Behandlungsdauer mit der therapeutischen Behandlung vollzogen werden. Zum Beispiel wird ein Kind, bei dem eine Kinderakute myelologische Leukämie (AML) diagnostiziert wurde, typischerweise zunächst für die ersten sieben Tage mit 45 mg/m² Daunorubicin an den Tagen 1 bis 3 plus 100 mg/m² Ara-C für sieben Tage plus 100 mg/m² GTG für sieben Tage behandelt. Dasselbe Kind, das mit einer Zusammensetzung gemäß diesem Aspekt der Erfindung vorbehandelt wurde, kann in der Lage sein, eine höhere Dosierung (d.h. eine höhere Dosis und/oder verlängerte Behandlungsdauer) von einigen oder allen dieser Chemotherapeutika zu tolerieren. Ein solcher Anstieg bei der Dosierungstoleranz von einer therapeutischen Behandlung (z.B. einer chemotherapeutischen Behandlung) mit einer hämatopoetischen Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität in einem Krebspatienten ist wünschenswert, da eine höhere Dosis die Zerstörung einer größeren Anzahl von krebsartigen Zellen bewirken kann.

[0114] Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen und/oder Zusammensetzungen können durch beliebige geeignete Mittel verabreicht werden. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen und/oder Zusammensetzungen an ein Säugetier zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel, Träger oder Arzneimittelträger in einer Einheitsdosierungsform entsprechend der üblichen pharmazeutischen Praxis verabreicht werden. Eine Verabreichung kann stattfinden, bevor das Säugetier beginnt, Symptome für einen Krankheitszustand aufzuweisen, bei dem die hämatopoetischen Vorläuferzellen des Patienten depletiert sind. Beispielsweise kann die Verabreichung der pharmazeutischen Formulierungen gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung an einen Krebspatienten stattfinden, bevor der Patient eine Strahlentherapie- und/oder Chemotherapiebehandlung erhält.

[0115] Es können beliebige Verabreichungswege von einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierung und/oder Zusammensetzung verwendet werden, einschließlich und ohne Beschränkung parenterale, intravenöse, intraarteriale, subkutane, sublinguale, transdermale, topische, intrapulmonale, intramuskuläre, intraperitoneale, durch Inhalation, intranasale, Aerosol-, intrarektale, intravaginale oder durch orale Verabreichung. Erfindungsgemäße pharmazeutische Formulierungen und/oder Zusammensetzungen können als Flüssiglösungen oder Suspensionen vorkommen; für eine orale Verabreichung können Formulierungen in Form von Tabletten oder Kapseln und für intranasale Formulierungen in Form von Pulver, Nasentropfen oder Aerosolen vorkommen. Die pharmazeutischen Formulierungen und/oder Zusammensetzungen können auf die durch einen Krankheitszustand beeinträchtigte Fläche, bei dem die hämatopoetischen Vorläuferzellen depletiert sind, lokal verabreicht werden. Zum Beispiel können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen und/oder Zusammensetzungen direkt in das Knochenmark des Patienten verabreicht werden. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen und/oder Zusammensetzungen können systemisch verabreicht werden.

[0116] Gemäß der Erfindung ist der Patient ein Mensch oder ein Haustier. Mit "Haustier" ist ein Tier gemeint, das durch den Menschen häuslich gemacht wurde, einschließlich aber ohne Beschränkung einer Katze, einem Hund, einem Elefant, einem Pferd, einem Schaf, einem Rind, einem Schwein und einer Ziege. In einigen Ausführungsformen hat der Patient Krebs.

[0117] Die Behandlung kann eine strahlentherapeutische oder eine chemotherapeutische Behandlung sein, einschließlich aber ohne Beschränkung von Cytarabin (Ara-C), Doxorubicin (Dox) oder 5-Fluoruracil (5-FU) oder eine Kombination einer strahlentherapeutischen und einer chemotherapeutischen Behandlung.

[0118] Die Erfindung beschreibt die beanspruchte Verwendung zur Konservierung von Vorläuferzellen in vivo, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung eines Mitglieds der FRIL-Familie für einen therapeutisch wirksamen Zeitraum an einen Patienten, wobei die Vorläuferzellen in

dem Patienten in den Ruhezustand versetzt werden. "Mitglied der FRIL-Familie" und "Vorläuferzelle" entsprechen denen, wie zuvor für den ersten Aspekt der Erfindung beschrieben. "Therapeutisch wirksame Menge" entspricht der, wie zuvor für den dritten Aspekt der Erfindung beschrieben.

[0119] Mit "therapeutisch wirksamer Zeitraum" ist eine Behandlung für einen Zeitraum gemeint, der wirksam ist, um Vorläuferzellen zu konservieren. Bei einer an einen Patienten durchgeführten Verabreichung ist eine solche Verabreichung vorzugsweise systemisch (z.B. durch intravenöse Injektion). Wirksame Mengen und wirksame Zeiträume können unter Verwendung der hier beschriebenen Modelle und Assays bestimmt werden. Zum Beispiel beschreiben die unten stehenden Beispiele die Konservierung von Vorläuferzellen, die eine SCID-rekonstituierende Funktion besitzen. Im Sinne der Erfindung ist ein therapeutisch wirksamer Zeitraum für die Injektion einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung und/oder pharmazeutischen Formulierung eines Mitglieds der FRIL-Familie ungefähr 5 Tage bevor der Patient eine Behandlung (z.B. eine chemotherapeutische Behandlung) mit einer Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität erhält bis ungefähr 2 Stunden vor einer Behandlung in Form der therapeutischen Behandlung, wobei die therapeutisch wirksame Menge einer Zusammensetzung und/oder pharmazeutischen Formulierung des Mitglieds der FRIL-Familie täglich verabreicht wird. Im Sinne der Erfindung ist ein bevorzugter therapeutisch wirksamer Zeitraum für die Injektion eines Patienten (z.B. eines Krebspatienten) mit einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung und/oder pharmazeutischen Formulierung eines Mitglieds der FRIL-Familie ungefähr 2 Tage bevor der Patient eine Behandlung in Form einer therapeutischen Behandlung (z.B. eine chemotherapeutische Behandlung) mit einer Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität erhält bis ungefähr einen Tag vor einer Behandlung in Form der therapeutischen Behandlung, wobei die therapeutisch wirksame Menge einer Zusammensetzung und/oder pharmazeutische Formulierung von einem FRIL täglich verabreicht wird. Es soll verstanden werden, dass sich die therapeutisch wirksame Menge einer Zusammensetzung und/oder pharmazeutischen Formulierung eines Mitglieds der FRIL-Familie von der therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung und/oder pharmazeutischen Formulierung eines Mitglieds der FRIL-Familie, die der Patient vor der Durchführung der Behandlung in Form der therapeutischen Behandlung erhält, unterscheidet, wenn damit begonnen wird, dass der Patient eine Behandlung in Form einer therapeutischen Behandlung mit einer Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität erhält.

[0120] Vorzugsweise ist der Patient ein Mensch oder ein Haustier. Ein "Haustier" entspricht dem, wie es in der Erfindung beschrieben wird.

[0121] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung ist der Patient ein Krebspatient. In einigen Ausführungsformen wird die wirksame Menge der Zusammensetzung des Mitglieds der FRIL-Familie vor der Behandlung des Patienten mit einer therapeutischen Behandlung mit einer hämatopoetischen Vorläuferzellen-depletierenden Aktivität verabreicht. In einigen Ausführungsformen ist die therapeutische Behandlung eine strahlentherapeutische oder eine chemotherapeutische Behandlung, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Cytarabin (Ara-C), Doxorubicin (Dox) oder 5-Fluoruracil (5-FU) oder eine Kombination einer strahlentherapeutischen und einer chemotherapeutischen Behandlung.

[0122] Die folgenden Beispiele sollen bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung weiter veranschaulichen. Ausführungsformen in den folgenden Beispielen, die nicht in den Umfang der Patentansprüche fallen, dienen lediglich zur Veranschaulichung.

BEISPIEL 1

Aufreinigung und Klonierung eines Mitglieds der FRIL-Familie, D1-FRIL

Aufreinigung von D1-FRIL aus Dolichos lab lab

[0123] Samen der Hyazinthbohne (*Dolichos lab lab*) wurden von Stokes Seeds (Buffalo, NY) bezogen und in einem Gewächshaus wachsen gelassen. Trockene Samen wurden in einer Kaffeemühle gemahlen und das Pulver wurde in 5 Volumen 50 mM Tris/HCl, das jeweils 1 mM $MgCl_2$ und $CaCl_2$ enthielt, für 4 Stunden bei 4°C extrahiert. Bohnenkörper wurden durch Zentrifugation bei $10\,000 \times$ für 20 Minuten pelletiert. Der pH des Überstandes wurde mit Essigsäure auf einen pH von 4,0 angesäuert, gefolgt von einer zweiten Zentrifugation, um den Überstand zu klären und schließlich wurde der pH auf 8,0 mit Natriumhydroxid erneut eingestellt. Dieser Rohextrakt wurde bei -20°C gelagert.

[0124] Eine Einzelschrittaufreinigung des Mitglieds der FRIL-Familie wurde mit Hilfe einer Bindung an eine Mannose-Sepharose-Matrix (Sigma) erreicht. Das Gel (d.h. die Matrix) wurde mit dem aufgetauten Rohextrakt

für 4 bis 12 Stunden bei 4°C gefällt, vorsichtig mehrere Male mit 50 mM Tris/HCl, das jeweils 1 nM MgCl₂ und CaCl₂ enthielt, gewaschen und dann mit 20 mM α-Methyl-α-D-Mannosid eluiert. Da dieses Mitglied der FRIL-Familie von Dolichos lab lab isoliert worden ist, wird es hier als D1-FRIL bezeichnet.

RNA-Isolation und cDNA-Synthese von D1-FRIL

[0125] Gesamt-RNA wurde von halbreifen Dolichos lab lab-Samen, die bei -70°C gelagert wurden, entsprechend dem Verfahren nach Pawlowski et al., Mol. Plant Biol. Manual 5: 1–13, 1994 präpariert. Poly(A⁺)-RNA wurde von dieser Gesamt-RNA unter Verwendung des Poly A-Trakt-mRNA-Isolationssystems (Promega) gemäß den Anleitungen des Herstellers erhalten. Die reverse Transkriptase von Vogel-Myeloblastose-Virus (Promega) wurde verwendet, um cDNA aus 0,5 µg Poly(A)-RNA oder aus 3,0 µg Gesamt-RNA bei Verwendung von 1 µg Oligo(dT) unter Standardreaktionsbedingungen zu erhalten (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989).

Polymerasenkettenreaktion und cDNA-Klonierung von D1-FRIL

[0126] Basierend auf der von Gowda et al., J. Biol. Chem. 269: 18789–18793, 1994, veröffentlichten Aminosäuresequenz wurden zwei degenerierte Oligonukleotidprimer unter Einsatz der Codon-Benutzung von Phaeolus (Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12: 387–394, 1984)

MLA AA(AG)TT(TC)GA(TC)CC(AT)AA(TC)CA(AG)GA(AG)GA (SEQ ID NO:13)

MLZ TT(AT)CC(AG)TT(TC)TGCCA(AG)TCCCA (SEQ ID NO:14)

entworfen.

[0127] Ein 500+ bp-Produkt wurde aus der oben beschriebenen cDNA mit 30 Zyklen einer Polymerasenkettenreaktion (PCR) durchgeführt, wobei jeder Zyklus 40 Sekunden bei 94°C, 40 Sekunden bei 50°C, 60 Sekunden bei 72°C, gefolgt von einem Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten umfasste. Die Reaktionen wurden in 50 µl, die 30 pmol von jedem Primer, 0,2 mM Desoxyribonukleotide und 0,5 Einheiten AmpliTaq-Polymerase enthielten (Perkin Elmer Norwalk, CT), in dem entsprechenden Puffer durchgeführt.

[0128] Das 500 bp-Produkt, das durch PCR erhalten wurde, wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) kloniert und durch eine Sequenase-Didesoxykettentermination (United States Biochemicals) unter Verwendung der folgenden Primer sequenziert:

GTACCGAGCTCGGAT (SEQ ID NO:15)

TCTAGATGCATGCTCGAG (SEQ ID NO:16)

[0129] Diese Sequenz wurde als "D1-FRILa" bezeichnet, da sie sich auf das Gen bezieht, das für das oben als D1-FRIL bezeichnete Protein von Interesse kodiert.

[0130] Basierend auf der Sequenz des amplifizierten D1-FRILa-Produkts wurde ein spezifischer Primer hergestellt:

MLX GTTGGACGTCAATTCCGATGTG (SEQ ID NO:17)

[0131] Ein degenerierter Primer, der den ersten fünf Aminosäuren der von Gowda et al., J. Biol. Chem. 269: 18789–18793, 1994 veröffentlichten Sequenz entspricht, wurde ebenfalls hergestellt:

MLI GC(TC)CA(AG)TC(TC)CT(TC)TC(TC)TT (SEQ ID NO:18)

[0132] Die MLX- und MLI-Primer wurden in Kombination verwendet, um ein 480 bp-Produkt aus der oben beschriebenen hergestellten cDNA über 30 PCR-Zyklen bei denselben Bedingungen wie oben zu amplifizieren. Dieses sekundäre amplifizierte Fragment wurde wie oben in den pCR2.1-Vektor kloniert und sequenziert, und wurde als "D1-FRILb" bezeichnet.

[0133] Das 3'-Ende von D1-FRIL wurde über eine Rapidamplifikation von cDNA-Enden mittels Polymerasenkettenreaktion (RACE-PCR); siehe z.B. Frohmann "RACE: Rapid Amplification of cDNA ends", Seiten 28–38 in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ und White TJ,

Hrsg., Academic Press, San Diego, 1990) unter Verwendung des 5'/3'-RACEKIT (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) entsprechend den Anweisungen des Herstellers erhalten. In der cDNA-Synthese für das 3'-RACE wurde ein Oligo(dT)-Ankerprimer ("AP") mit dem verwendeten Kit bei einer Konzentration von 32,5 µM bereitgestellt, wobei die oben zuvor in diesem Beispiel beschriebenen Standardbedingungen verwendet wurden.

AP **GACCACGCGTATCGATGTCGAC** (SEQ ID NO:19)

[0134] Überlappende PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des AP-Ankerprimers in Kombination mit einem spezifischen Primer, der die folgende Sequenz aufwies, durchgeführt:

MLB **AAGTTAGACAGTGCAGGAAAC** (SEQ ID NO:20)

[0135] Die Amplifikationsbedingungen bestanden wiederum aus 30 Zyklen für 40 Sekunden bei 94°C, 40 Sekunden bei 55°C, 60 Sekunden bei jeweils 72°C, mit einem Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten. Es wurde ein 900+ bp-Produkt erhalten, das wie oben in pCR2.1 subkloniert und sequenziert wurde, und wurde als "D1-FRILc" (SEQ ID NO: 1) bezeichnet.

[0136] Um den cDNA-Klon mit voller Länge zu erhalten, wurde der Ankerprimer AP in Kombination mit einem spezifischen Primer, der den ersten fünf Aminosäuren entspricht, die am 5'-Terminus kodiert werden, verwendet:

MLII **GCACAGTCATTGTCATTAG** (SEQ ID NO:21)

[0137] Die cDNA mit voller Länge wurde mittels 30 PCR-Zyklen erhalten, wobei jeder Zyklus 60 Sekunden bei 94°C, 60 Sekunden bei 58°C, 90 Sekunden bei 72°C, mit einem Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten umfasste. Die Reaktion wurde in 100 µl durchgeführt, die 30 pmol von jedem Primer, 0,2 mM Desoxyribonukleotid, 1,0 Einheiten Pfu-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) enthielt. Die MLII- und AP-Primer wurden entworfen, um eine EcoRI-Stelle an jedem Ende (3' und 5') der Polynukleotid-Sequenz zu erzeugen. Die cDNA mit voller Länge wurde in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 ligiert, was das Endprodukt "pCR2.1-DLA" ergab, was schematisch in [Fig. 1](#) dargestellt ist.

Die Nukleotidsequenz von D1-FRIL

[0138] Der D1-FRILc-Klon wurde vollständig unter Verwendung des Didesoxyketten-Terminationsverfahrens sequenziert. Die bestimmte Nukleotidsequenz der cDNA mit voller Länge war wie folgt:


```

1   GCACAGTCAT TGTCATTTAG TTTCACCAAG TTTGATCCTA ACCAAGAGGA
51  TCTTATCTTC CAAGGTCATG CCACTTCTAC AAACAATGTC TTACAAGTCA
101 CCAAGTTAGA CAGTGCAGGA AACCCTGTGA 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 ATAACCTCTGT CTCTAAAAGA CTATCTGTTA CTAGTTATTA TGCTGGGAGT
601 AAACCTGCGA C'TCTCTCCTA 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 TCGATGAGT
851 CAATAATCAC AAGTACAGTG TAGTACTTGT ATGTTGTTTG TGTAAGAGTC
901 AGTTTGCTTT TAATAATAAC AAGTGCAGTT AGTACTTGT (SEQ ID NO:1)

```

[0139] Die D1-FRIL-Nukleotidsequenz ermöglichte die Bestimmung der folgenden davon abgeleiteten Aminosäuresequenz des D1-FRIL-Proteins:

```

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

```

[0140] Die natürlich vorkommende Signalsequenz des Mitglieds der FRIL-Familie, das von Dolichos lab lab (d.h. D1-FRIL) isoliert wurde, hat die folgende Sequenz:

```

MASSNLLTLA LFLVLLTHAN SA (SEQ ID NO:4)

```

[0141] Diese Sequenz ist direkt am N-Terminus der ersten Aminosäure von SEQ ID NO: 2 lokalisiert. Die Nukleinsäuresequenz des natürlich vorkommenden D1-FRIL-Proteins wird unten bereitgestellt.

```

1  ATGGCTTCCT CCAACTTACT CACCCTAGCC CTCTTCCTTG TGCTTCTCAC
51  CCACGCAAAC TCAGCCGCAC AGTCATTGTC ATTTAGTTTC ACCAAGTTTG
101 ATCCTAACCA AGAGGATCTT ATCTTCCAAG GTCATGCCAC TTCTACAAAC
151 AATGTCTTAC AAGTCACCAA GTTAGACAGT GCAGGAAACC CTGTGAGTTC
201 TAGTGCGGGA AGAGTGTAT ATCTGCACC ATTGCGCCTT TGGGAAGACT
251 CTGCGGTATT GACAAGCTTT GACACCATTA TCAACTTTGA AATCTCAACA
301 CCTTACACTT CTCGTATAGC TGATGGCTTG GCCTTCTTCA TTGCACCACC
351 TGA CTCTGTC ATCAGTTATC ATGGTGGTTT TCTTGGACTC TTTCCCAACG
401 CAAACACTCT CAACAAC TCTC TCCACCTCTG AAAACCAAAC CACCACCTAAG
451 GCTGCATCAA GCAACGTTGT TGCTGTGTGAA TTTGACACCT ATCTTAATCC
501 CGATTATGGT GATCCAAACT ACATACACAT CGGAATTGAC GTCAACTCTA
551 TTAGATCCAA GGTAAC TGCT AAGTGGGACT GGCAAAATGG GAAAATAGCC
601 ACTGCACACA TTAGCTATAA CTCTGTCTCT AAAAGACTAT CTGTTACTAG
651 TTATTATGCT GGGAGTAAAC CTGCGACTCT CTCCTATGAT ATTGAGTTAC
701 ATACAGTGCT TCCTGAATGG GTCAGAGTAG GGTTATCTGC TTCAACTGGA
751 CAAGATAAAG AAAGAAATAC CGTTCACCTCA TGGTCTTTCA CTTCAAGCTT
801 GTGGACCAAT GTGGCGAAGA AGGAGAATGA AAACAAGTAT ATTACAAGAG
851 GCGTTCTGTG ATGATATATG TGTATCAATG ATTTTCTATG TTATAAGCAT
901 GTAATGTGCG ATGAGTCAAT AATCACAAGT ACAGTGTAGT ACTTGTATGT
951 TGTTTGTGTA AGAGTCAGTT TGCTTTTAAT AATAACAAGT GCAGTTAGTA
1001 CTTGT (SEQ ID NO: 3)

```

[0142] Eine vergleichende Darstellung der abgeleiteten D1-FRIL-Aminosäuresequenz mit der bekannten Aminosäuresequenz des Mannose-Lectins, wie es von Gowda et al. (J. Biol. Chem. 269: 18789–18793, 1994) bestimmt wurde, ist in [Fig. 2](#) gezeigt. Die einzelne Sequenz, die für das D1-FRIL-Protein abgeleitet wurde, umfasst Domänen, die unmittelbar und mit hoher Homologie der α -Untereinheit (SEQ ID NO: 12) und der β -Untereinheit (SEQ ID NO: 11) des von Gowda et al. supra beschriebenen Proteins entsprechen. Wenn die β -Untereinheit des Proteins von Gowda et al. (supra) mit der N-terminalen Domäne angelagert wird und linear von der α -Untereinheit gefolgt wird, zeigt die Anordnung des Polypeptids eine Homologie zu anderen Legumino-se-Lectinen. Die abgeleitete D1-FRIL-Aminosäuresequenz umfasst jedoch zusätzliche acht Aminosäurereste (aa27–34), die nicht in der von Gowda et al., supra, beschriebenen Sequenz vorkommen. Es sind mehrere andere Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen von D1-FRIL und der von Gowda et al., supra, beschriebenen Aminosäuresequenz leicht aus [Fig. 2](#) ableitbar.

Stellenspezifische Mutagenese

[0143] Um die Funktionalität der Homologe des Proteins, das von der D1-FRIL-cDNA kodiert wird, zu bestimmen, wurde eine Mutation in dem cDNA-Klon von D1-FRIL erzeugt. Die Domänen des abgeleiteten Proteins und des Lectins der Erbse, welche die Mutationsstelle enthalten, sind unten gezeigt:

```

D1-FRIL      Y L N P D Y G . D P N Y I H I G I D V      (SEQ ID NO:22)
Erbse        F Y . N A A W D P S N R D R H I G I D V      (SEQ ID NO:25)

```

[0144] Es ist bekannt, dass der Asparaginrest (das hervorgehobene "N") in dem Lectin der Erbse bei der Bindung an dessen Saccharid-Liganden beteiligt ist. Das korrespondierende Asparagin in D1-FRIL (Position 141 der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2) wurde zu Asparaginsäure ("D") mutiert. Diese Mutation wurde der Einfachheit halber als "N141D" bezeichnet.

[0145] Um die Mutation einzuführen, wurde eine rekombinante PCR durchgeführt (siehe z.B. Higuchi, R., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky, J. J. und White T.J., Hrsg., Academic Press, San Diego, 1990). Zwei PCR-Reaktionen wurden getrennt auf der cDNA mit voller Länge unter Verwendung von zwei Primern durchgeführt, welche dieselbe Mutation enthalten und zwei Pro-

dukte mit einer überlappenden Region erzeugen:

MutI CCATAATCGGGATCAAGATAGGTG (SEQ ID NO:26)

MutII CACCTATCTTGATCCCGATTATGG (SEQ ID NO:27)

[0146] Die primären PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick-PCR-Aufreinigungskit (QIAGEN, Valencia, CA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die überlappenden primären Produkte wurden dann kombiniert und zusammen in einer einzelnen zweiten Reaktion unter Verwendung der flankierenden Primern amplifiziert.

M1 Forw AACTCAGCCGCACAGTCATTGTCA (SEQ ID NO:28)

APEcoRI GAATTCGACCACGCGTATCGATGTCGAC (SEQ ID NO:29)

[0147] Sowohl die primären als auch die sekundären PCR-Reaktionen wurden in 100 µl durchgeführt, die 50 pmol von jedem Primer, 0,4 mM Desoxyribonukleotid und 1,0 Einheiten Pfu-Polymerase (Stratagene) in dem entsprechenden Puffer enthielten. Die primäre PCR-Reaktion amplifizierte die zwei getrennten Fragmente in 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus 40 Sekunden bei 94°C, 40 Sekunden bei 50°C, 60 Sekunden bei 72°C mit einem Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten umfasste.

[0148] Die zweite PCR-Reaktion amplifizierte das rekombinante Fragment in 12 Zyklen unter Verwendung derselben Bedingungen wie oben beschrieben.

[0149] Das entstehende Fragment mit voller Länge enthielt die Mutation. Das rekombinante mutierte Produkt wurde in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 kloniert, wie es schematisch in [Fig. 3](#) dargestellt ist und wie oben beschrieben sequenziert. Dieses Plasmid wird als "pCR2.1-DLA(D)" bezeichnet.

Konstruktion von D1-FRIL-exprimierenden Pflanzenexpressionsvektoren und Nicotiana tabacum-Transformation

[0150] Eine rekombinante PCR wurde verwendet, um die 5'-Enden der D1-FRIL-Klone des Wildtyps und der Mutante zu modifizieren, um ein Signalpeptid zum Einschleusen des Proteins in das endoplasmatische Retikulum einzuführen. Entsprechend dem Verfahren von Higuchi, supra, wurden die Sequenz, die für das Signalpeptid kodiert und die cDNA-Klone mit voller Länge in zwei getrennten primären PCR-Reaktionen amplifiziert. Die Signalpeptidsequenz wurde von der Amplifikation des binären Vektors pTA4 erhalten, der die vollständige Sequenz des α-Amylase-Inhibitors beherbergt (Hoffman et al., Nucleic Acids Res. 10: 7819–7828, 1982; Moreno et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7885–7889, 1989).

[0151] Die folgenden Primer wurden zur Amplifikation der Signalpeptidsequenz verwendet:

Sigforw GAATTCATGGCTTCCTCCAAC (SEQ ID NO:30)

Sigrev TGAAGTGTGCGGCTGAGTTTGCGTGGGTG (SEQ ID NO:31)

[0152] Die Primer M1Forw (SEQ ID NO: 28) und APEcoRI (SEQ ID NO: 29), die zur Amplifikation der oben beschriebenen D1-FRIL-cDNA verwendet wurden, wurden wiederum zur Amplifikation der D1-FRIL-cDNA verwendet.

[0153] Die verwendeten Primer für die sekundären Reaktionen waren Sigforw und APEcoRI, die entworfen wurden, um EcoRI-Stellen an den 5'- und den 3'-Enden zu erzeugen. Sowohl die primären als auch die sekundären PCR-Reaktionen wurden wie oben für die Stellen-gerichtete Mutagenese diskutiert durchgeführt.

[0154] Das rekombinante SpDLA-Produkt des Wildtyps wurde in die EcoRI-Stelle des pBluescript SK⁺-Klonierungsvektors (Stratagene) kloniert, um den Vektor pBS-SpDLA zu erzeugen, wie in [Fig. 4](#) gezeigt. Die mutante SpDLA(D) wurde in dieselbe Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 kloniert, um den Vektor pCR2.1-SpM 1 zu ergeben, wie in [Fig. 5](#) gezeigt. Die Nukleotidsequenz von jedem PCR-Produkt wurde wie oben beschrieben bestimmt, um die richtige Verknüpfung des Signalpeptids sicherzustellen. Die Nukleotidsequenz von SpDLA wird durch SEQ ID NO: 22 angegeben und die abgeleitete Aminosäuresequenz wird durch SEQ ID NO: 22 angegeben.

[0155] Die Sequenzen von SEQ ID NO: 22 und SEQ ID NO: 23 sind wie folgt:

(xi) SEQUENZBEZEICHNUNG: SEQ ID NO: 3

```

atggcttcct ccaacttact caccctagcc ctcttccttg tgcttctcac ccacgcaaac 60
tcagccgcac agtcattgtc atttagtttc accaagtttg atcctaacca agaggatctt 120
atcttccaag gtcatgccac ttctacaaac aatgtcttac aagtcaccaa gtttagacagt 180
gcaggaaacc ctgtgagttc tagtgcgga agagtgttat attctgcacc attgcgcctt 240
tgggaagact ctgcggtatt gacaagcttt gacaccatta tcaactttga aatctcaaca 300
ccttacactt ctggtatagc tgatggcttg gccttcttca ttgcaccacc tgactctgtc 360
atcagttatc atgggtggtt tcttggtctc tttcccaacg caaacactct caacaactct 420
tccacctctg aaaaccaaac caccactaag gctgcacaa gcaacgttgt tgctgttgaa 480
tttgacacct atcttaatcc cgattatggt gatccaaact acatacacat cggaattgac 540
gtcaactcta ttagatccaa ggtaactgct aagtgggact ggcaaatgg gaaaatagcc 600
actgcacaca ttagctataa ctctgtctct aaaagactat ctgttactag ttattatgct 660
gggagtaaac ctgcgactct ctctatgat attgagttac atacagtgtc tcctgaatgg 720
gtcagagtag ggttatctgc ttcaactgga caagataaag aaagaaatac cgttcactca 780
tggtctttca cttcaagctt gtggaccaat gtggcgaaga aggagaatga aaacaagtat 840
attacaagag gcgttctgtg atgatatatg tgtatcaatg attttctatg ttataagcat 900
gtaatgtgcg atgagtcaat aatcacaagt acagtgtagt acttgtatgt tgtttgtgta 960
agagtcagtt tgcttttaat aataacaagt gcagttagta cttgt 1005

```

(xi) SEQUENZBEZEICHNUNG: SEQ 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 Glu
      130             135             140
Asn Gln Thr Thr Thr Lys Ala Ala Ser Ser Asn Val Val Ala Val Glu
      145             150             155             160
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 Trp
      180             185             190
Asp Trp Gln Asn Gly Lys Ile Ala Thr Ala His Ile Ser Tyr Asn Ser
      195             200             205
Val Ser Lys Arg Leu Ser Val Thr Ser Tyr Tyr Ala Gly Ser Lys Pro
      210             215             220
Ala Thr Leu Ser Tyr Asp Ile Glu Leu His Thr Val Leu Pro Glu Trp
      225             230             235             240
Val Arg Val Gly Leu Ser Ala Ser Thr Gly Gln Asp Lys Glu Arg Asn
      245             250             255
Thr Val His Ser Trp Ser Phe Thr Ser Ser Leu Trp Thr Asn Val Ala
      260             265             270
Lys Lys Glu Asn Glu Asn Lys Tyr Ile Thr Arg Gly Val Leu
      275             280             285

```

Ein Pflanzenexpressionsvektor, der für rekombinantes D1-FRIL kodiert

[0156] Es wurde ein binärer Vektor zur Samen-spezifischen Expression von D1-FRIL konstruiert. Zur Samen-Expression wurde der Vicilin-Promotor, der von pCW66 (Higgins et al., Plant Mol. Biol. 11: 683–695, 1988) erhalten wurde, in die EcoRI/KpnI-Stellen des Pflanzenexpressionsvektors pBIN19 kloniert, um pBINVicPro zu erzeugen, wie in [Fig. 6](#) veranschaulicht. Stromabwärts des Vicilin-Promotors wurde die SpDLA-cDNA-Sequenz in die EcoRI/ SacI-Stelle ligiert, was den pBINVicPro-SpDLA ergab, wie in [Fig. 7](#) veranschaulicht. Der mutierte cDNA-Klon SpDLA(D) wurde in die EcoRI-Stelle des pBINVicPro-Vektors ligiert, um pBINVicPro-SpDLA(D) zu ergeben, wie in [Fig. 8](#) veranschaulicht. Es wurden keine zusätzlichen Terminationssequenzen zugegeben, sondern man vertraute auf die Stop-Codons und die Polyadenylierungsstelle der cDNA-Klone von DLA und DLA(D). Beide Vektoren wurden in den Agrobacterium tumefaciens-Stamm LBA4404 übertragen, entsprechend dem Gefriertauverfahren, wie es von An et al., "Binary vectors", in Plant Molecular Biology Manual, Band A3, Gelvin SB, Schilperoort RA und Verma DPS, Hrsg., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Niederlande, Seiten 1–19, 1988, beschrieben wurde.

[0157] Eine Agrobacterium-vermittelte Transformation von Blattscheiben von Nicotiana tabacum wurde durchgeführt und, wie beschrieben (Horsch et al., Science 227: 1229–1231, 1985) unter Verwendung des LBA4404-beherbergenden Samen-spezifischen Expressionsvektors pBINVicPro-SpDLA untersucht ([Fig. 9](#)). Kanamycin-resistente Pflanzen (die Resistenz wird durch Transformation mit den pBIN19-basierenden Vektoren, die das Gen tragen, verliehen) wurden auf deren Fähigkeit ausgewertet, Wurzeln in zwei aufeinanderfol-

genden Vermehrungsschritten in Murashige-Skoog-Medium, das 3% Saccharose und Kanamycilsulfat (Sigma, St. Louis, MO) mit 100 mg/ml enthielt, zu bilden.

[0158] Rekombinante D1-FRIL-Fusionsproteine wurden durch die transformierten Pflanzenzellen *in vivo* geschnitten. Die transformierten Pflanzenzellen erzeugten so reifes D1-FRIL, das nach einer Aufreinigung eine molekulare Masse von 60 kDa aufwies und aus vier Untereinheiten zusammengesetzt war, zwei α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten (d.h. ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterodimer), wobei jede Untereinheit ungefähr 15 bis 18 kDa betrug.

Expression von rekombinantem D1-FRIL in *E. coli*

[0159] Wildtyp-cDNA von D1-FRIL und Mutantenklone (ohne Signalpeptide) wurden in die EcoRI/Sall- und EcoRI/XhoI-Stellen des Expressionsvektors pGEX 4T-1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) ligiert, um die Expressionskonstrukte pGEX-M1 und pGEX M1(D), die jeweils in den [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) veranschaulicht sind, zu erzeugen. Der *E. coli*-Wirtstamm BL21(D3) wurde von Novagen (Madison, WI) bezogen und mit dem oben beschriebenen Konstrukt unter Verwendung des Calciumchloridverfahrens transformiert (siehe Sambrook et al., *supra*; Gelvin und Schilperoort, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 1988; Altabella et al., *Plant Physiol* 93: 805–810, 1990; und Pueyo et al., *Planta* 196: 586–596, 1995). Die Einführung des tac-Promotors (Ptac) wurde erreicht, indem IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) (Sigma) bei einer Endkonzentration von 1,0 mM zugegeben wurde, als die Zellen eine optische Dichte von 0,4 bis 0,6 bei 600 nm erreichten. Den Kulturen wurde es ermöglicht 12 Stunden bei 37°C nach dem Zusatz von IPTG zu wachsen. Nicht-induzierte Kontrollkulturen wurden unter denselben Bedingungen gehalten. Die Zellen wurden durch Behandlung mit 4 mg/ml Lysozym in Phosphat-gepufferter Saline, die 1% TRITON® X-100 enthielt, lysiert.

[0160] Das gesamte zelluläre Protein wurde von den transformierten *E. coli*-Zellen extrahiert und auf SDS-PAGE auf einem 15%-Gel unter Verwendung eines Standardverfahrens (Sambrook et al., *supra*) analysiert. Die Zellen aus 1 ml einer *E. coli*-Kultur wurden in demselben Volumenladepuffer (50 mM Tris HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% Glycerol, 0,1% Bromphenolblau) suspendiert und gevortext. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde das Protein mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. Eine beispielhafte Auftrennung ist in [Fig. 11](#) gezeigt, wobei die Bahnen in der Tabelle 1 unten gekennzeichnet sind.

TABELLE 1

Bezug auf Figur 11

Bahn Nr.	Inhalt
1	Molekulargewichtsmarker (Bio-Rad)
2	Gesamtproteinextrakt von nicht-induzierten BL21(D3) pGEX-M1
3	Gesamtproteinextrakt von induzierten BL21(D3) pGEX-M1
4	Gesamtproteinextrakt von nicht-induzierten BL21(D3) pGEX-M1(D)
5	Gesamtproteinextrakt von induzierten BL21(D3) pGEX-M1(D)

[0161] Die Auftrennung von Proteinen in [Fig. 11](#) zeigt, dass die induzierten Zellen (Bahnen 3, 5) beide ein deutliches Polypeptid mit einer molekularen Masse von ungefähr 60 kDa (gezeigt durch Pfeil) herstellten. Die nicht-induzierten Zellen konnten keine signifikante Mengen dieses Proteins herstellen ([Fig. 11](#), Bahnen 2, 4).

Aufreinigung von rekombinanten D1-FRIL aus transformierten *E. coli*

[0162] Induzierte *E. coli*-Zellen (200 ml) wurden wie oben beschrieben nach einer 12-stündigen Induktion bei 37°C durch Zentrifugation bei 5000 g für 10 Minuten geerntet. Das Pellet wurde mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA gewaschen und in 1/10 Volumen 1% TRITON-Tensid in TBS (20 mM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zusatz von 4 mg/ml Lysozym lysiert und bei Raumtemperatur für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 5000 g wurde der Überstand, der die gesamten löslichen Proteine enthält, verworfen und das entstehende Pellet, das die Einschlusskörper umfasst und das angehäuften rekombinanten Fusionsprotein enthält, wurde mit 8 M Guanidin-HCl (Martson und Hartley, "Solubilization of Protein Aggregates" in *Guide to Protein Purification* Band 182, Herausgeber: Deutscher, M. P., Seiten 266–267, 1993) extrahiert.

[0163] Das durch Guanidin-HCl gelöste rekombinante Fusionsprotein wurde auf GST-Sepharose-Beads (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt und in 1 ml reduziertem Glutathion (Sigma) eluiert. Proben der gereinigten Fusionsproteine wurden mit Thrombin (Novagen) unter Verwendung von 5 Spaltungseinheiten/ml gereinigtem Fusionsprotein gespalten.

[0164] Für Immunoblotanalysen (Western Blot) wurden die gereinigten Proteine durch SDS-PAGE allgemein entsprechend den oben beschriebenen Verfahren aufgetrennt. Das Gel wurde in Transferpuffer äquilibriert (25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin, 20% MeOH) und auf Nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA) für eine Stunde bei 100 V unter Verwendung eines Bio-Rad-Elektrotransferapparates geblottet. Eine nicht-spezifische Bindung wurde durch Inkubation der Blots für mindestens eine Stunde in 1 × TBS (20 mM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl), das 3% Gelatine enthielt, blockiert. Nach dem Blotten folgte eine Inkubation mit einem primären Antikörper (einem polyklonalen Kaninchenserum, das gegen das N-terminale Peptid der β -Untereinheit von Phaseolus vulgaris FRIL (d.h. Pv-FRIL) gewonnen wurde, 1:100 Verdünnung, 3 Stunden wie in Beispiel 5 unten beschrieben) gefolgt von einer Inkubation mit einem sekundären Antikörper (Ziegen-Antikaninchen-IgG, das mit Meerrettich-peroxidase bei einer 1:1000-Verdünnung für eine Stunde konjugiert wurde). Die Blots wurden gewaschen und die Farbe wurde mit einem Farbentwicklungsreagens (Bio-Rad) entwickelt. Ein repräsentatives Ergebnis ist in [Fig. 12](#) gezeigt, mit den unten in Tabelle 2 gezeigten Bahnen.

TABELLE 2

Bezug auf Figur 12

Bahn Nr.	Inhalt
1	Gereinigtes Fusionsprotein M1
2	Gereinigtes Fusionsprotein M1(D)
3	Kontrolle
4	Gereinigtes Fusionsprotein M1 nach Spaltung mit Thrombin
5	Gereinigtes Fusionsprotein M1(D) nach Spaltung mit Thrombin
6	Kontrolle

[0165] Die in [Fig. 12](#) gezeigte Auftrennung zeigt, dass die beiden Formen des Fusionsproteins ähnliche molekulare Massen von ungefähr 60 kDa besitzen und dass Thrombin beide Arten des Fusionsproteins spaltet, um ein neues Polypeptid mit einer molekularen Masse von 30 kDa herzustellen.

BEISPIEL 2

Rekombinantes D1-FRIL stimuliert spezifisch die Proliferation von 3T3-Zellen, die den FLT3-Rezeptor exprimieren

[0166] D1-FRIL interagiert mit dem Säugetier FLK2/FLT3-Tyrosinkinase-Rezeptor. Ein spezifischer und quantitativer biologischer Assay, in dem NIH 3T3-Fibroblasten verwendet werden, die entweder mit einem chimären Rezeptor mit dem extrazellulären Teil des murinen FLT3-Rezeptors, der mit dem intrazellulären Teil des humanen Fms-Rezeptors kombiniert war (Dasil et al., Mol. Cell. Biol. 13(10): 6572–6585, 1993) oder mit dem humanen Rezeptor mit voller Länge (Small et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 459–463, 1994) transfiziert wurde, kann verwendet werden, um die biologische Lektin-Aktivität während einer Aufreinigung zu bestimmen. Zweifache Serienverdünnung von Lektinproben über die Reihen einer Platte mit 96 Vertiefungen ermöglichte die Bestimmung der biologischen FLT3 3T3-Aktivität über einen 1000-fachen Bereich. Es wurde festgestellt, dass sowohl der murine als auch humane FLT3-Ligand (FL) (Lyman et al., Cell 75: 1157–1167, 1993; Hannum et al., Nature 368: 643–648, 1994) oder das FRIL die FLT3-transfizierten Zellen vor einem Ableben in diesem Assay hindern konnte.

[0167] Insbesondere wurden 3T3-Zellen, die in Gewebekulturplatten kultiviert wurden (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ), von den Platten entfernt, indem die Zellen zweimal in gepufferter Hank's Saline-Lösung (HBSS; Gibco Laboratories, Grand Island, NY) gewaschen wurden. Es wurde nicht-enzymatischer Zelldissoziationspuffer (Gibco) für 15 Minuten bei Raumtemperatur dazugegeben. Die entstehenden Zellen wurden in Medium gewaschen. FLT3 3T3-Zellen wurden bei einer Endkonzentration von 3000 Zellen pro Vertiefung in einem Volumen von 100 μ l des Serum-definierten Mediums, das 10 mg/ml rhIL1- α , 10% AIMV (Gibco, Grand Island, NY) und 90% modifiziertes Dulbecco's Eagle's Medium (DMEM; Gibco) enthielt, in Platten mit 96 Vertiefungen kultiviert. Unter diesen Assay-Bedingungen sterben die Zellen nach zwei bis vier Tagen in Kul-

tur in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂, wenn nicht ein exogen dazugegebener Ligand die Zellen vor einem Ableben hindert. Jede Platte mit 96 Vertiefungen enthielt Zellen in Vertiefungen, die Kälberserum enthielten, das sämtliche 3T3-Zellen stimuliert als eine Positivkontrolle und Zellen in Vertiefungen, die lediglich Medium enthielten, als eine Negativkontrolle ("blank"). Fms-transfizierte 3T3-Zellen mit voller Länge (biologische Antwort gezeigt in Tessler et al., J. Biol. Chem., 269: 12456–12461, 1994) dienten als Rezeptor-transfizierte Kontrollzielzellen und Eltern-3T3-Zellen dienten als nicht-transfizierte Kontrollzellen. Die Proliferation und das Zellüberleben wurde durch Zusatz von XTT (inneres Salz von 2,3-bis[Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) quantifiziert (Diagnostic Chemicals Ltd., Charlottetown, Prince Edward Island, Kanada), was ein Tetraformazan-Salz ist, das durch aktiv atmende Zellen gespalten wird (Roehm et al., J. Immunol. Methods 142: 257–265, 1991). Die Proliferation und das Zellüberleben wurde spektrometrisch unter Verwendung eines kinetischen Vmax Plattenlesegerätes (Molecular Devices Corp., Mountain View, CA) quantifiziert und entweder als relative Aktivität (Einheiten/ml) oder als spezifische Aktivität (Einheiten/mg) aufgezeichnet. Eine Einheit der biologischen Aktivität wurde als die reziproke Verdünnung definiert, bei der eine halbmaximale Stimulation von Zellen nachgewiesen wurde.

[0168] Der Protein-Rohextrakt von den oben in Beispiel 1 beschriebenen E. coli-Kulturen wurde getestet, um zu bestimmen, ob rekombinant exprimiertes D1-FRIL in der Lage war, FLT3 3T3-Zellen unter Verwendung dieses Assays zu stimulieren. Die Daten von diesem Experiment sind in den [Fig. 13A](#) und [Fig. 13B](#) zusammengefasst. Insbesondere zeigt [Fig. 13A](#) ein Diagramm, das den Rohextrakt der E. coli-Kultur zeigt, die exprimiertes D1-FRIL enthielt, das spezifisch hFLT3-Zellen stimuliert; [Fig. 13B](#) ist ein Diagramm, das zeigt, dass derselbe Extrakt keine nicht-transfizierten 3T3-Zellen stimuliert. In den [Fig. 13A](#) und [Fig. 13B](#) ist die Mediumkontrolle als eine durchgehende Linie dargestellt. Die Ordinate (Absorption) zeigt die Zelllebensfähigkeit an, die durch XTT an drei Tagen gemessen wurde; die Abszisse zeigt die reziproke Verdünnung der Extraktprobe. Die klare Inhibition der Proliferation, die bei höheren Konzentrationen festgestellt wurde ([Fig. 13A](#)), ist nicht verstanden, könnte aber möglicherweise auf toxische Bestandteile in dem E. coli-Rohextrakt zurückzuführen sein oder die Konsequenzen einer Dosis-abhängigen Konservierung der 3T3-Fibroblasten sein.

BEISPIEL 3

Rekombinantes D1-FRIL konserviert mononukleare Zellen und Vorläufer in Flüssigkultur

[0169] Das rekombinante D1-FRIL-Protein konserviert funktionelle Vorläufer für mindestens 4 Wochen in einer Flüssigkultur. Die [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) und Tabelle 3 veranschaulichen die Ergebnisse von Experimenten, in denen gezeigt wird, dass rekombinantes D1-FRIL in einer Dosis-abhängigen Weise wirkt, um humane Vorläuferzellen von Nabelblut zu konservieren.

[0170] Dazu wurde Nabelschnurblut von gesunden Spendern in 100 Einheiten/ml Heparin gesammelt. Mononukleare Nabelblutzellen (CB mnc) wurden innerhalb von 4 Stunden durch Einsammeln mittels FICOLL-PLAQUE®-Auftrennung (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert und in X-VIVO 10 Medium gewaschen (BioWhittaker, Walkersville, MD). CB mnc wurde dann in Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen (Corning Inc., Corning, NY) bei einer Konzentration von 200 000 Zellen/ml in einem Volumen von 4 ml X-VIVO 10 (d.h. 800 000 Zellen insgesamt pro Vertiefung) kultiviert. D1-FRIL und/oder rekombinantes E. coli Flt3-L (recFL; BioSource International, Camarillo, CA) wurden bei einer Konzentration von 40 ng/ml zu Beginn zugegeben (ohne Zusatz als eine Kontrolle). Die Kulturen wurden in befeuchteten Kammern ohne Mediumwechsel für bis zu 29 Tage inkubiert.

[0171] Nach der Inkubation wurden die kultivierten CB mnc-Zellen durch Waschen in X-VIVO 10 geerntet (d.h. geerntete Zellen wurden pelletiert und in X-VIVO 10 resuspendiert), um das D1-FRIL und/oder recFL zu entfernen und dann wurde die Anzahl von lebenden Zellen durch Trypanblau (Sigma)-Ausschluss bestimmt. Diese Ergebnisse sind in [Fig. 14A](#) gezeigt. Die Anzahl der Vorläuferzellen und die Fähigkeit der geernteten Zellen wurden bestimmt, indem die gewaschenen Zellen dreifach in fötalem Kälberserum-freiem Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium, das IL-2, Granulozyten-Makrophagen-CSF und ein Kit-Ligand enthält, ausplattiert wurden (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada). Nach zwei Wochen wurden die entstandenen Kolonien von jeder der Dreifachvertiefungen ausgewertet und die Ergebnisse sind in [Fig. 14B](#) gezeigt. Somit zeigen die [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#), dass das rekombinante D1-FRIL mononukleare Zellen von Nabelschnurblut und Vorläuferzellen in einer Dosis-abhängigen Weise in Flüssigkultur konservierte.

[0172] Tabelle 3 zeigt die entstehenden Kolonien nach 15, 21 oder 29 Inkubationstagen, was zeigt, dass D1-FRIL nicht jedoch rec-FL, Vorläuferzellen in einer Suspensionskultur konservierte.

TABELLE 3

Tag	Medium	Myeloid*	Erythroid*	Mix*	Blast*
15	D1-FRIL	1033 ± 12	67 ± 12	7 ± 12	0
	RecFL	40 ± 69	0	0	0
	D1-FRIL + recFL	933 ± 25	167 ± 95	0	0
	Kein Zusatz	0	0	0	0
21	D1-FRIL	387 ± 83	7 ± 12	0	167 ± 64
	RecFL	0	0	0	0
	D1-FRIL + recFL	473 ± 133	53 ± 42	0	300 ± 34
	Kein Zusatz	0	0	0	0
29	D1-FRIL	0	0	0	80 ± 72
	RecFL	0	0	0	0
	D1-FRIL + recFL	0	0	0	40 ± 20
	Kein Zusatz	0	0	0	0

*Daten dargestellt als ± SD für drei Werte von dem Dreifach-Methylcellulose-Kolonie-Assay.

[0173] Das beschriebene Experiment ist ein Beispiel von vier Experimenten.

[0174] In den [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) und in Tabelle 3 bezeichnet "Blast" Kolonien, die aus primitiven, morphologisch undifferenzierten Zellen bestehen; "Mix" bezeichnet Kolonien, die aus myeloiden und erythroiden Zellen bestehen; "erythroid" bezeichnet Kolonien, die aus erythroiden Zellen bestehen und "myeloid" bezeichnet Kolonien, die aus myeloiden Zellen bestehen. In den [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#) ist die Zellzahl ([Fig. 14A](#)) oder Koloniezahl ([Fig. 14B](#)) auf der Ordinate gezeigt; die Abszisse zeigt die reziproke Verdünnung der Probe.

[0175] Wie in Tabelle 3 gezeigt, stammten Kolonien von reifen myeloiden und erythroiden Vorläufern ab, die sich aus Zellen bildeten, die für 15 Tage entweder mit FRIL oder FRIL plus recFL kultiviert wurden; 24-mal weniger reife Kolonien bildeten sich aus Zellen, die in recFL alleine kultiviert wurden; und keine Kolonien traten auf, wenn keines von beiden vorhanden war. Nach 21 Tagen in Kultur zeigt Tabelle 3, dass myeloide und erythroide Kolonien sich nur von Zellen bildeten, die D1-FRIL ausgesetzt waren. Die Häufigkeit der myeloiden Kolonien in Kulturen, die nur D1-FRIL enthielten (basierend auf der Anfangszahl von CB mnc), sank um das 2,7-fache von 1 von 774 nach 2 Wochen in Kultur auf 1 von 2067 nach 3 Wochen ab; erythroide Kolonien sanken in der Häufigkeit um das 9,6-fache von 1 von 11 940 auf 1 von 114 287 ab (siehe Tabelle 3).

[0176] Die Kolonien von diesem Assay wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert. Wie in [Fig. 15A](#) gezeigt, enthielten Kulturen am Tag 21 neben myeloiden und erythroiden Kolonien kleine Kolonien, die aus undifferenzierten Zellen bestehen. [Fig. 15B](#) zeigt, dass nur Blast-ähnliche Kolonien festgestellt wurden, wenn die Zellen in D1-FRIL für 29 Tage kultiviert wurden (siehe auch Tabelle 3).

[0177] Die Vorläuferzellkapazität der Blast-ähnlichen Kolonien wurde weiter bei Zellen untersucht, die anfangs für drei Wochen entweder in D1-FRIL, recFL ohne Zusatz oder in D1-FRIL plus recFL kultiviert wurden und dann ohne diese Regulatoren für weitere 6 Wochen in einem Methylcellulose-Kolonie-Assay. Es wurden keine Kolonien von den Zellen nachgewiesen, die für 21 Tage entweder in recFL alleine oder in der Mediumkontrolle kultiviert wurden. Es wurden lebende Zellen von den Zellen geerntet, die anfangs in D1-FRIL alleine kultiviert wurden und dann in einem Kolonie-Assay (in Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium) für weitere 4 Wochen ausplattiert wurden. Ein schematisches Diagramm von diesem Experiment ist in [Fig. 16](#) gezeigt. Wie schematisch in [Fig. 16](#) gezeigt, sank die Häufigkeit von Blast-ähnlichen Kolonien, die in D1-FRIL alleine kultiviert wurden, um das 2,1-fache vom Tag 21 bis zum Tag 29, von 1 von 4790 auf 1 von 10 000 und um das 7,5-fache in D1-FRIL plus recFL-Kulturen von 1 von 2667 auf 1 von 20 000 in den anfänglichen CB mnc-Zellkulturen ab. Folgt man dem in [Fig. 16](#) schematisch dargestellten Protokoll, wurden kleine, diffuse, Blast-ähnliche Kolonien mit einer Häufigkeit von 1 von 67 (900 Kolonien/600 000 CB mnc) ausschließlich in Schalen von Zellen nachgewiesen, die anfangs in D1-FRIL allein kultiviert wurden und in einer Häufigkeit von 1 von 132 (990 Kolonien/131 000 CB mnc) bei Zellen, die in D1-FRIL + recFL kultiviert wurden (siehe beispielhafte Kolo-

nien in [Fig. 17](#)).

BEISPIEL 4

Rekombinantes D1-FRIL wirkt direkt auf Vorläuferzellen

[0178] Zum Bestimmen, ob rekombinantes D1-FRIL direkt oder indirekt über akzessorische Zellen wirkt, um Vorläuferzellen zu konservieren, wurden mononukleare Nabelschnurblutzellen zuerst auf die Vorläufer, die das CD34-Antigen exprimieren, durch eine immunomagnetische Bead-Isolation angereichert (Dynal Corp., Lake Success, NY). 500 CD34⁺-Zellen wurden in Vertiefungen in Platten mit 96 Vertiefungen platziert, die 100 µl Serum-freies Medium (BIT9500, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) entweder in der Gegenwart von recFL (PeproTech, Princeton, NJ) oder einem Cytokin-Cocktail von rekombinantem humanen Interleukin 3 (rhIL3) + rekombinantem humanen Interleukin 6 (rhIL6) + rekombinantem humanen Interleukin 11 (rhIL11) + rhTpo-Thrombopoietin + FL (FLT3-Ligand) (BioSource International, Camarillo, CA) enthielten und für 4 Wochen ohne Mediumwechsel kultiviert. Die Anzahl von funktionellen Vorläufern aus diesen Kulturen wurde bestimmt, indem die Zellen in einem vollständigen Serum-freien Methylcellulose-Kolonie-Assay-Medium (StemCell Technologies) ausplattiert wurden. Nach zwei Wochen wurden die entstandenen Kolonien ausgewertet und die Ergebnisse sind in [Fig. 18](#) gezeigt (geschlossene Balken = rekombinantes D1-FRIL; offene Balken = Cytokin-Cocktail). Es ist klar gezeigt, dass Vorläuferzellen nur in den rekombinanten D1-FRIL-enthaltenen Kulturen konserviert wurden ([Fig. 18](#)). Daher wirkt gereinigtes rekombinantes D1-FRIL direkt auf primitive hämatopoetische Vorläufer.

BEISPIEL 5

Identifikation und Klonierung von Pv-FRIL, einem zweiten Mitglied der FRIL-Familie

FRIL-Aktivität in PHA-LCM-Medien

[0179] Es wurde ein biologischer Screening-Assay entwickelt, um neue Stimulatoren des Flt3-Rezeptors zu suchen, in dem NIH 3T3-Zellen, die mit Expressionsvektoren transfiziert waren, und cDNA des murinen und humanen Flt3 und des verwandten Fms-Rezeptors enthielten, verwendet wurden. Die mFlt3/Fms 3T3-Zelllinie ist eine 3T3-Zelllinie, die mit einer Nukleinsäure transfiziert wurde, die für ein Fusionsprotein kodiert, das aus der murinen extrazellulären Domäne des Flt3-Rezeptors besteht, die an die Transmembran- und intrazelluläre Domänen des humanen Fms (bereitgestellt von Dr. Ihor Lemischka, Princeton University, Princeton, NJ) fusioniert wurde. Die Stk 3T3-Zelllinie ist eine 3T3-Zelllinie, die mit dem humanen Flt3-Rezeptor mit voller Länge transfiziert wurde (bereitgestellt von Dr. Donald Small, Johns Hopkins University, Baltimore, MD). Die humane FMS 3T3-Zelllinie ist eine 3T3-Zelllinie, die mit dem humanen Fms-Rezeptor mit voller Länge transfiziert wurde (bereitgestellt von Dr. Charles Sherr, Saint Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN). Die Eltern-3T3-Zellen wurden von der American Type Culture Collection ("ATCC"; Manassas, VA) bezogen. Rezeptor-transfizierte Zellen enthielten Neoresistenzgene und wurden in Medium gehalten, das 750 g/ml G418 enthielt (Life Technologies, Rockville, MD).

[0180] Um eine Faktorabhängigkeit von Rezeptor-transfizierten 3T3-Zellen herzustellen, wurden die Wachstumsbedingungen eingeschränkt, um es lediglich Liganden zu ermöglichen, Zellen vor einem Ableben zu hindern. Dazu wurden 3T3-Zellen in Platten mit 96 Vertiefungen (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ), die 3000 Zellen in 100 µl in Serum-freiem Medium enthielten, das aus 10% AIMV (Life Technologies) und 90% DMEM bestand, getestet. In jedem Experiment wurden die Proben zweifach seriell über Reihen verdünnt, die mit einer 1:10-Verdünnung begann. Lebende Zellen wurden nach 3 bis 5 Tagen durch XTT (inneres Salz von 2,3-bis[Methoxy-4-nitro-5sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) quantifiziert (Sigma, St. Louis, MO) (Rohm et al., supra). Die relative Reaktivität (Einheiten/ml) und spezifische Aktivität (Einheiten/mg) werden als die reziproke Verdünnung definiert, bei der eine halbmaximale Stimulation von Zellen nachgewiesen wurde.

[0181] Die FMS 3T3-Zellen (transfiziert mit cDNA, die für den humanen Fms-Tyrosinkinase-Rezeptor kodiert) und deren Ligand, humanes M-CSF, dienten als ein Modellsystem. Eine Stammlösung aus rekombinantem humanen M-CSF mit 1 µg/ml wurde seriell verdünnt (wobei die erste Verdünnung 1:20, 50 ng/ml betrug) und wurde verwendet, um Fms 3T3-Zellen zu stimulieren. Wie in [Fig. 19A](#) gezeigt, reagierten Fms 3T3-Zellen auf M-CSF in einer Dosis-abhängigen Weise. Weder die mFlt3/Fms 3T3-Zellen noch die nicht-transfizierten 3T3 Elternzellen reagierten auf M-CSF ([Fig. 19A](#)).

[0182] Verschiedene Herkunftsquellen von konditioniertem Medium wurden auf das Vorliegen einer stimula-

torischen Flt3 3T3-Aktivität durchmustert. Die wirksamste Quelle war konditioniertes Medium, das aus humanen peripheren Blutzellen geerntet wurde, die aktiviert wurden, um hohe Spiegel und einen breiten Bereich von Cytokinen durch das mitogene Leguminosen-Lectin, Phytohemagglutinin (PHA), das von den unreinen Gartenbohnenextrakten abgeleitet wurde, zu sekretieren. Diese Quelle, die üblicherweise als PHA-Leukozyten-konditioniertes Medium (PHA-LCM) bezeichnet wird, wird als eine positive Standardkontrolle in den hämatopoetischen Kolonie-Assays seit über zwei Jahrzehnten verwendet (Sharon und Lis, Science 246: 227, 1989). Um PHA-LCM herzustellen, wurde leukopherisiertes Blut aus normalen freiwilligen Personen von North American Biologicals Inc., Miami, Florida, bezogen. Mononukleare Zellen wurden durch FICOLL-PAQUE® isoliert, in AIMV gewaschen, und bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in AIMV gewaschen, das ein Volumen von 1% Rohextrakt der Gartenbohne enthielt, der PHA von Life Technologies (Katalog Nr. 10576-015) enthielt, entweder in T150-Gefäßen (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) oder Rollerflaschen (Becton Dickinson Labware) für eine Woche kultiviert. Die Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und konditioniertes Medium wurde bei -20°C gelagert.

[0183] PHA-LCM induzierte eine Proliferation von mFlt3/Fms 3T3-Zellen und Stk 3T3 (Expression des humanen Flt3-Rezeptors) in einer nicht unterscheidbaren Weise bei ungefähr 200 Einheiten pro ml ([Fig. 19B](#)). Nicht-transfizierte 3T3-Zellen reagierten nicht auf PHA-LCM ([Fig. 19B](#)) und Fms 3T3-Zellen reagierten schwach (Daten nicht gezeigt).

Aufreinigung von Pv-FRIL aus PHA-stimulierten Leukozyten-konditionierten Medien

[0184] Jede Charge von PHA-LCM wurde in Serum-freiem Medium mit Zellen aus individuellen normalen Spendern hergestellt. Um eine Aufreinigung zu beginnen, wurde das PHA-LCM mit Flt3 3T3-Aktivität in 30 Liter-Mengen mit ungefähr 10^7 Flt3 3T3-Einheiten gepoolt. 25 l von PHA-LCM wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl diafiltriert und dann auf 2 bis 2,5 Liter durch eine tangentielle Durchfluss-Ultrafiltration auf einer Ausschlussmembran mit 10 kDa Molekulargewicht (Pellicon, Millipore, Bedford, MA) konzentriert. Eine Blue-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia Biotech, 10 cm \times 15 cm) wurde mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl äquilibriert. Um das humane Serumalbumin zu entfernen, wurde PHA-LCM auf die Säule mit 25 ml/Minute durch Pumpen aufgetragen und der Durchfluss wurde gesammelt. Die Durchflussfraktion aus Blue-Sepharose wurde einer Anionenaustausch-Chromatographie ausgesetzt, indem sie einer Q-Sepharose-FF-Säule (Pharmacia Biotech, 5 cm \times 5 cm), die mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 äquilibriert wurde, eingesetzt wurde. Die Säule wurde mit Äquilibrierungspuffer gewaschen und dann bei 12 ml/Minute mit einem kontinuierlichen Gradienten von 0 bis 0,7 M NaCl in 10 mM Tris eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt (6 ml/Fraktion) und ein Aliquot von jeder Fraktion wurde auf Flt3 3T3-Aktivität (d.h. die Fähigkeit mFlt3/fms 3T3-Zellen und/oder Stk 3T3-Zellen zu stimulieren) in Platten mit 96 Vertiefungen getestet.

[0185] Nach der Bestätigung, dass eine Fraktion eine Flt3 3T3-Aktivität besaß, wurde eine Phenyl-Sepharose-HP-Säule (Pharmacia Biotech, 1,6 cm \times 10 cm) mit 20 mM Phosphat, pH 7, 1,5 M NH_4SO_4 äquilibriert. Die gepoolte Probe aus Q-Sepharose wurde auf 1,5 M NH_4SO_4 angepasst und dann auf die Phenyl-Sepharose-Säule aufgetragen. Der Gradient wurde mit Äquilibrierungspuffer gewaschen und dann bei 1 ml/Minute mit einem Gradienten von 1,5 bis 0,1 M NH_4SO_4 in 20 mM Phosphat, pH 7 eluiert. Die Fraktionen (1 ml) wurden gesammelt und auf Flt3 3T3-Aktivität getestet. Fraktionen mit einer Flt3 3T3-Aktivität wurden gepoolt und gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100 mM NaCl dialysiert und durch Vakuumzentrifugation konzentriert.

[0186] Eine Superdex 75-Säule (Pharmacia Biotech, 1,6 cm \times 60 cm) wurde mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl äquilibriert. Die gepoolte Probe von Phenyl-Sepharose wurde auf die Superdex 75-Säule aufgetragen und dann bei 0,6 ml/Minute eluiert. Die Fraktionen (1,8 ml) wurden gesammelt und auf Flt3 3T3-Aktivität getestet. Die aktiven Fraktionen wurden gegen Tris-HCl, pH 7,2 dialysiert und durch Vakuumzentrifugation konzentriert.

[0187] Die C4-Umkehrphasensäule (4,6 mm \times 100 mm, Vydac, Hesperia, CA) wurde mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in HPLC-taugliches H_2O äquilibriert. Die gepoolte und konzentrierte Probe aus der Superdex 75-Chromatographie wurde auf die C4-Säule aufgetragen und die Säule wurde mit einem Gradienten aus 10 bis 55% Acetonitril, 0,1% TFA über 70 Minuten über 0,5 ml/Minute eluiert. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und durch Vakuumzentrifugation verdampft.

[0188] Die Analyse durch ELISA für Cytokine (IL1- α , IL1- β , IL2, IL3, IL4, IL6, GM-CSF, G-CSF und SCF) während der Aufreinigung von Pv-FRIL wurde unter Verwendung von Kits durchgeführt, die von R&D Systems (Minneapolis, MN) bezogen wurden.

Pv-FRIL-spezifisches Kaninchen-Antiserum

[0189] Während der gesamten Aufreinigung von Pv-FRIL wurde ein Neuseeland-Schneekaninchen (HRP, Denver, PA) mit PHA-LCM immunisiert, mit zunehmend gereinigten Proben, die eine Flt3 3T3-Aktivität enthalten, geboostet, und schließlich mit einem Peptid immunisiert, das Pv-FRIL AQSLSF[N, C, S]FTKFDLD (SEQ ID NOS: 32–34) entspricht, und als das AQS-Peptid bezeichnet wird, immunisiert. Die Proben wurden an das Hämocyanin der Napfschnecke (KLH, Sigma) Glutaraldehyd konjugiert. Das Kaninchen wurde mit KLH-AQS-Peptid-enthaltenden Proben immunisiert, indem entweder das vollständige Freund'sche Adjuvanz (Sigma) oder Hunter's Titermax (Vaxcel, Inc., Norcross, GA) verwendet wurde. Das Antiserum zeigte einen Titer von 1:5000 für das AQS-Peptid in einem ELISA (Daten nicht gezeigt). Da das Antiserum Reaktivitäten für andere Proteine enthielt, wurde eine weitere Anreicherung von AQS-Peptid-spezifischen Antikörpern entweder durch Depletion von kreuzreaktiven Antikörpern oder durch eine Affinitätsaufreinigung unter Verwendung eines AQS-Peptids, das kovalent an einen Agarose-Träger gebunden war (AminoLink coupling gel, Pierce), durchgeführt.

[0190] Eine Anti-AQS-Affinitätssäule wurde hergestellt, indem entweder IgG von einem Kaninchen-Antiserum mit hohem Titer durch Protein A-Affinitätschromatographie (ImmunoPure Kit, Pierce) oder Antikörper, die von der AQS-Peptidsäule isoliert wurden, aufgereinigt und dann der Antikörper an einen aktivierten Agarose-Träger (AminoLink coupling gel, Pierce) kovalent gebunden wurde.

Aktivität von gereinigtem Pv-FRIL

[0191] Um die Resultate der Pv-FRIL-Aktivität auf Rezeptor-transfizierte 3T3-Zellen mit Flt3-Rezeptor-exprimierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen in Beziehung zu bringen, wurde eine Suspensionskultur von humanen Nabelblutzellen, die an Flt3⁺-Vorläuferzellen durch eine CD34-immunomagnetische Bead-Selektion angereichert waren, an das Format einer Platte mit 96 Vertiefungen angepasst. Dazu wurde Nabelschnurblut von gesunden Spendern mit 100 Einheiten/ml Heparin gesammelt (Fujisawa Healthcare, Deerfield, IL). Mononukleare Zellen wurden durch FICOLL-PAQUE[®] (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) isoliert, in HBSS gewaschen und in Serum-definiertem Medium, entweder AIMV oder XVIVO-10 (BioWhittaker, Walkersville, MD) resuspendiert. Mononukleare Zellen wurden auf Flt3⁺-Vorläuferzellen durch eine CD34-immunomagnetische Bead-Selektion angereichert (Dynal Corporation, Lake Success, NY). CD34⁺-Zellen wurden in Platten mit 6 Vertiefungen (Becton Dickinson Labware) bei einer Konzentration von 105 Zellen in 1 ml DMEM, das 10 ng/ml rekombinantes humanes IL3 (BioSource International, Camarillo, CA) und 10% fötales Kälberserum enthielt, kultiviert. Die Anzahl von brechenden Zellen, die in den Kulturvertiefungen vorhanden waren, wurden mikroskopisch ausgewertet.

[0192] Das Kulturmedium enthielt immer IL-3, da früh wirkende Cytokine zusätzliche Co-Faktor(en) zum Überleben und Proliferation benötigen. [Fig. 20A](#) zeigt, dass Nabelschnurblutzellen auf Säulenfraktionen in zwei Regionen des aus einer Anionenaustauschsäule eluierten Materials reagierten. Die erste Aktivitätsregion entsprach der stimulatorischen Flt3 3T3-Aktivität ([Fig. 20B](#) und [Fig. 20C](#)); die zweite war mit einer Aktivität verbunden, die bei Fms 3T3-Zellen nachgewiesen wurde ([Fig. 20D](#)); keine Reaktion wurde in nicht-transfizierten 3T3-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das aktive Material, das der Flt3 3T3-Aktivität entsprach (Peak 1 in [Fig. 20A](#)) wurde weiter charakterisiert und auf verschiedenen chromatographischen Matrices aufgereinigt, einschließlich einem Kationenaustauschharz, Heparin-Sepharose, Hydroxyappatit, ConA-Sepharose, Phenyl-Sepharose und Gelfiltration (Superdex 75, Daten nicht gezeigt).

[0193] Das weiter gereinigte Pv-FRIL wurde in dem oben beschriebenen Flt3 3T3-Assay verwendet. Eine Plateau-Stimulation von Flt3 3T3-Zellen verringerte sich mit den aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritten (siehe [Fig. 21A](#)), was nahe legt, dass essentielle Co-Faktoren entfernt wurde(n). Der Zusatz von suboptimalen Spiegeln von Roh-PHA-LCM zu Pv-FRIL, das in späteren Aufreinigungsstufen erhalten wurde, stellte die Aktivität von diesem teilweise gereinigten Pv-FRIL auf maximale Plateauspiegel wieder her ([Fig. 21B](#)).

[0194] Die Analyse durch ELISA für Cytokine, die mit hämatopoetischen Vorläuferzellen (Interleukin 1- α (IL1- α), Interleukin 1- β (IL1- β), Interleukin 2 (IL2), Interleukin 3 (IL3), Interleukin 4 (IL4), Interleukin 6 (IL6), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) und Stammzellofaktor (SCF)), in Fraktionen, die Pv-FRIL enthielten, das fast bis zur Homogenität gereinigt wurde, wirken, zeigten, dass IL1- α mit Pv-FRIL bei jedem Aufreinigungsschritt zusammenblieb (Daten nicht gezeigt).

[0195] Die Flt3 3T3-Aktivität wurde durch Zusatz von neutralisierenden Antikörpern gegen IL 1 oder durch

Entfernen von IL 1 durch eine Antikörperaffinitätschromatographie verringert, aber nicht eliminiert (Daten nicht gezeigt). Jedoch hatte bei den Spiegeln (< 1 ng/ml), die in Fraktionen gefunden wurden, die gereinigtes Pv-FRIL enthielten, exogenes rekombinantes hIL-1- α , selbst keine stimulatorische Aktivität (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung legte die Möglichkeit nahe, dass IL-1- α als ein notwendiger Co-Faktor wirken kann, um eine maximale Stimulation durch Pv-FRIL zu erhalten. In nachfolgenden Experimenten wurde beim Testen von gereinigtem Pv-FRIL das Erfordernis des Co-Faktors erfüllt, indem entweder IL1- α oder PHA-LCM bei einer Konzentration die selbst keine Flt3 3T3-Zellen stimulierte, erfüllt.

[0196] Unter Verwendung dieses modifizierten Flt3 3T3-Assays mit dem Zusatz von substimulatorischen Mengen von entweder IL1- α oder PHA-LCM wurde das aktive Protein fast bis zur Homogenität in den drei unabhängigen Experimenten gereinigt. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse von einem solchen Experiment zusammen, bei dem eine 1%ige Ausbeute mit einer 80 000-fachen Aufreinigung einherging und eine Fraktion mit einer spezifischen Aktivität von 244 500 Einheiten/mg hervorbrachte.

TABELLE 4

Aufreinigungs-schritt	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität (Einheiten)	Spezifische Aktivität (u/mg)	-fache Aufreinigung	Ausbeute (%)
PHA-LCM	231 774	7 500 000	3	1	100
Blue-Sephrose-FF	1294	2 600 000		670	35
Q-Sephrose-FF	347	1 400 000	4035	1345	19
Phenyl-Sephrose-HP	14	1 200 000	85 714	28 571	16
Superdex 75	0,12	29 340	244 500	81 500	1

[0197] Pv-FRIL wurde anhand dessen Fähigkeit aufgereinigt, Flt3-exprimierende 3T3-Zellen unter Verwendung von vier unterschiedlichen chromatographischen Medien zu stimulieren. Dies ergab eine 80 000-fache Aufreinigung mit einer Ausbeute von 1%.

Gereinigtes Pv-FRIL

[0198] Eine SDS-PAGE zeigte, dass das aufgereinigte Material eine beschränkte Anzahl von Polypeptiden enthält und die molekulare Größe des aktiven Materials wurde bestimmt durch Elution des Proteins von SDS-PAGE-Gel-Stücken, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen laufen gelassen worden sind und indem die Aktivität des eluierten Materials untersucht wurde. Die Flt3 3T3-Aktivität wurde immer in einem Gel-Stück gefunden, das 14–22 kDa Polypeptide enthielt und manchmal in einem Gel-Stück, das 32–43 kDa Polypeptide enthielt (Daten nicht gezeigt).

[0199] Die Polypeptid(e) in der aktiven Fraktion, die dem 14–22 kDa-Bereich entsprachen, wurden einer aminoterminalen Sequenzierung durch Edman-Abbau unterzogen. Dazu wurde eine 18 kDa-Spezies von der C4-Umkehrphasenchromatographie durch SDS-PAGE aufgelöst, auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) geblottet und mit Ponceau S (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) gefärbt. Die 18 kDa-Bande wurde aus der PVDF-Membran ausgeschnitten und die N-terminale Sequenz wurde durch automatischen Edman-Abbau mit einem Protein-Sequenzierer, ABI-Modell 477A (PE Applied Biosystems, Foster, CA) bestimmt. Die abgeleiteten Peptidsequenzen wurden mit der SwissProt-Proteinsequenzdatenbank abgeglichen.

[0200] In jedem der drei Experimente wurde die Sequenz AQSLSFXTKDLD (SEQ ID NO: 35) von einem Polypeptid mit 18 kDa erhalten (wobei X eine unbekannte Aminosäure ist). Für das Material an der Farbstofffront (14 kDa und weniger) wurde die aminoterminal Sequenz von TDSRVVAVEFDXFP (SEQ ID NO: 36) zweimal vorgefunden. Der Aminoterminal von einem Glattmuskelprotein (SM22- α) wurde zweimal vorgefunden und der Aminoterminal von Myoglobulin wurde einmal identifiziert. Da die Sequenz, die mit AQS beginnt, die einzige in jedem Experiment identifizierte Sequenz war, schloss man, dass dieses Polypeptid für die Flt3 3T3-Aktivität verantwortlich ist.

[0201] Eine weitere Aufreinigung von Pv-FRIL wurde durch Immunoaffinitätschromatographie unter Verwendung eines oben beschriebenen Kaninchen-Antiserums erhalten, dass gegen ein synthetisches Peptid von 13 Aminosäuren erzeugt wurde, die dem N-Terminus entsprechen, der für das 18 kDa-Polypeptid erhalten wurde (hier als Anti-AQS bezeichnet). Roh-PHA-LCM wurde auf eine Kaninchen-Anti-AQS-Affinitätssäule aufgetragen und nach dem Waschen wurde gebundenes Protein unter sauren Bedingungen eluiert. Es wurden vier Pools von Fraktionen auf Aktivität in den zwei unterschiedlichen Assay-Systemen getestet. Die Flt3 3T3-Zellen reagierten schwach ($< 100 \mu\text{g/ml}$) auf die gepoolten Fraktionen (Daten nicht gezeigt). Die [Fig. 22A](#) bis [Fig. 22D](#) zeigen Ergebnisse von einem Experiment, bei dem die gepoolten Fraktionen mit Nabelschnurblutzellen in der Gegenwart von IL3 getestet wurden. Nach zwei Wochen einer Suspensionskultur wurde die Anzahl von lebenden Zellen und der Status der CD34-Expression bestimmt. Ein beispielhaftes Experiment von drei AQS-Affinitätschromatographie-Experimenten ist in den [Fig. 22A](#) bis [Fig. 22D](#) gezeigt. Zellkulturen, die mit den zwei frühen Pools von Säulenfraktionen ergänzt waren, enthielten ungefähr viermal mehr Zellen (426 000 Zellen bzw. 466 250 Zellen) als die 100 000 ausgesäten Zellen und keine nennenswerte CD34-Färbung ([Fig. 22A](#) und [Fig. 22B](#)). Der Anstieg bei der Zellzahl und der Verlust der CD34-Expression ist auf die erwarteten Wirkungen einer IL3-induzierten Proliferation und Differenzierung zurückzuführen. Im Gegensatz dazu enthielten Zellkulturen, die mit dem spät eluierenden Fraktionspool ([Fig. 22D](#)) behandelt wurden, weniger als 10 000 Zellen oder ein Zehntel Input-Zellen und eine einheitliche Population von Zellen, die CD34 exprimieren. Der spät eluierende AQS-Affinitätspool zeigte nicht die starken Wirkungen von IL3 (hohe Zellzahlen und verbrauchtes Medium), stattdessen legte die Widerstandsfähigkeit der lebenden Zellen, die CD34 exprimieren, nach zwei Wochen in Suspensionskultur nahe, dass der aktive Bestandteil CD34⁺Flt3⁺-Vorläufer konservieren könnte.

Pv-FRIL ist abgeleitet von Phaseolus vulgaris

[0202] Da PHA von Extrakten der roten Bohne stammt und da ein Mitglied der FRIL-Familie, D1-FRIL, von einer anderen Leguminose isoliert wurde, nämlich Dolichos lab lab, wurden Mannose-Bindungslectine von einem Extrakt der Gartenbohne (Phaseolus vulgaris) unter Verwendung von Standardverfahren, wie dem Verfahren nach Rudiger, H., Isolation of Plant Lectins, H.-J. Gabius und S. Gabius, Hrsg., Seiten 31–46, Berlin, 1993) isoliert. Das Gartenbohnen-Mannose-bindende Lectin besteht aus Polypeptiden mit Molekulargewichten von 18 kDa und 15 kDa und die Aminotermini dieser zwei Polypeptide begannen mit AQSLSFXFKFDPN (SEQ ID NO: 37) bzw. TDSRVVAVEDF (SEQ ID NO: 38) (wobei X eine unbekannte Aminosäure ist).

[0203] Pv-FRIL, das von Phaseolus vulgaris isoliert wurde, wurde auf die Aktivität in dem Flt3 3T3-Zellassay getestet. Wie in [Fig. 23](#) gezeigt, reagierten Flt3 3T3-Zellen in einer Dosis-abhängigen Weise auf Pv-FRIL, während nicht-transfizierte 3T3-Elternzellen dies nicht hatten.

Aufreinigung von Pv-FRIL aus Phaseolus vulgaris

[0204] Trockensamen von den roten und weißen Gartenbohnen (Phaseolus vulgaris) wurden von W. Atlee Burpee & Company, Warminster, PA, bezogen. Die Lectine wurden unter Verwendung eines Standardprotokolls eluiert. Kurz gesagt wurden Bohnen in einer haushaltsüblichen Kaffeemühle pulverisiert und zu einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM von jedem MgCl_2 und CaCl_2 für 4 Stunden bei 4°C unter konstantem Mischen zugegeben. Die Bohnenkörper wurden durch Zentrifugation bei 10 000 g für 20 Minuten pelletiert. Der pH des Überstandes wurde auf pH 4,0 mit Essigsäure und konstantem Mischen modifiziert, um kontaminierende Lagerungsproteine zu entfernen, gefolgt von einer Zentrifugation, um den Überstand zu klären und schließlich wurde der pH erneut auf 8,0 mit Natriumhydroxid vor der Lagerung bei -20°C angepasst.

[0205] Die spezifische Bindung von Pv-FRIL an Mannose ermöglichte eine einzelstufige Aufreinigung des Lectins aus dem Überstand des Bohnenextrakts. 50 μl Extrakte der roten oder weißen Gartenbohnen wurden in einem konischen Gefäß mit 1 ml Mannose inkubiert, die kovalent an Agarose-Beads (Sigma) bei 4°C mit konstantem Mischen für 4 Stunden über Nacht gebunden wurde. Die Bohnen wurden leicht durch Zentrifugation (300 g, 5 Minuten) in Lectin-Bindungspuffer gewaschen. Das Mannose-Bindungsprotein wurde von den Mannose-Beads nach dem Waschen durch Inkubation entweder durch 200 mM α -Methylmannosid (Sigma) oder 100 mM Glycin, pH 2,8, eluiert.

DNA-Isolation und PCR-Amplifikation der Pv-FRIL-kodierenden Nukleinsäure

[0206] Genomische Gesamt-DNA aus jungen Phaseolus vulgaris-Trieben wurden entsprechend dem Verfahren nach Dellaporta ("Plant DNA miniprep and microprep: Versions 2.1–2.3", Freeling, M. und V. Walbot (Hrsg.), The Maize Handbook XXVI + 759p. Springer-Verlag, New York, Inc: New York, New York, USA; Berlin, Deutschland) isoliert und bei -20°C gelagert. Basierend auf den bestimmten N-terminalen Aminosäuresequen-

zen von Pv-FRIL wurden 4 degenerierte Oligonukleotide (PVBeta1, PVBeta2, PValfa1, PValfa2) unter Verwendung der Phaseolus vulgaris-Codon-Benutzung entworfen. Die Sequenzen der Primer sind wie folgt:

PVBeta1: TTY ACY AAR TTY GAY YTN GA (SEQ ID NO:39)

PVBeta2: ATY TTY CAR GGW GAY GC (SEQ ID NO:40)

PValfa1: TTR ACR TCR ATW CCR ATR TG (SEQ ID NO:41)

PValfa2: TAR TTW GGR TCR ATR TTR GCR TT (SEQ ID NO:42)

[0207] Zwei aufeinanderfolgende Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden durchgeführt. In der ersten Reaktion wurden 10 ng genomischer Bohnen-DNA durch 30 PCR-Zyklen amplifiziert, wobei jeder Zyklus 40 Sekunden bei 94°C, 40 Sekunden bei 50°C, 60 Sekunden bei 72°C und einen Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten umfasste. Die Reaktionen wurden in 50 µl durchgeführt, die jeweils 30 pmol Primer, PVBeta1 und PValfa1, 0,2 mM Desoxyribonukleotide und 0,5 Einheiten Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer) in dem entsprechenden Puffer enthielten. Ein Mikroliter des PCR-Produktes wurde durch 30 PCR-Zyklen unter Verwendung derselben Bedingungen, wie oben beschrieben, amplifiziert. Die Reaktion wurde in 50 µl, die 30 pmol der beiden Primer, PVBeta2 und PValfa2 enthielten, unter Verwendung von 0,2 mM Desoxyribonukleotide und 0,5 Einheiten Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer) in dem entsprechenden Puffer durchgeführt. Das erhaltene 460 Basenpaar-Fragment wurde in ein T/A-Plasmid, pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und durch eine Sequenase-Didesoxy-Kettenreaktion (United States Biochemicals) sequenziert.

RNA-Isolation und cDNA-Synthese von Pv-FRIL-kodierender Nukleinsäure

[0208] Gesamt-RNA wurde von halbreifen Phaseolus vulgaris-Samen, die bei -70°C gelagert waren, entsprechend den von Pawloski et al. (Mol. Plant Biol. Manual 5: 1-13, 1994) beschriebenen Verfahren präpariert. Der 5'/3'-RACEKIT (Boehringer Mannheim) wurde verwendet, um cDNA aus 5,0 µg Gesamt-RNA entsprechend den Anleitungen des Herstellers herzustellen. In der cDNA-Synthese für die 3'-RACE war der Oligo(dT)-Ankerprimer mit einer Konzentration von 32,5 µM in den Standardbedingungen enthalten. Für das 5'-RACE wurde ein spezifischer Primer (SPV1) bei einer Konzentration von 32,5 µM verwendet. Die cDNA-Aufreinigung und die nachfolgende Nachverfolgungsreaktion wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Polymerasekettenreaktion und cDNA-Klonierung von Pv-FRIL-kodierender Nukleinsäure

[0209] Das 3'-Ende von Pv-FRIL wurde durch eine schnelle Amplifikation von cDNA-Enden mittels Polymerasekettenreaktion (RACE-PCR) unter Verwendung des 5'/3'-RACEKIT (Boehringer Mannheim) erhalten, der entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Es wurden überlappende PCR-Amplifikationen unter Verwendung des PCR-Ankerprimers mit den spezifischen Primern (PV3 und PV4) in zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationsreaktionen durchgeführt. Die Sequenzen dieser Primer sind wie folgt:

PV3: CAA TGT CTT ACA ACT CAC TAA G (SEQ ID NO:43)

PV4: AGT GTG GGA AGA GTG TTA TTC (SEQ ID NO:44)

[0210] Die Amplifikationsbedingungen waren 30 Zyklen für 40 Sekunden bei 94°C, 40 Sekunden bei 55°C, jeweils 60 Sekunden bei 72°C und ein Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten. Die Reaktionen wurden in 50 µl durchgeführt, die 30 pmol von jedem Primer, PV3 und PCR-Ankerprimer in der ersten und PV4 und PCR-Ankerprimer in der zweiten, 0,2 mM Desoxyribonukleotide und 0,5 Einheiten Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer) in dem entsprechenden Puffer enthielten. Das erhaltene 831 bp-Produkt wurde in pCR2.1 subkloniert und wie oben beschrieben sequenziert.

[0211] Bei dem 5'-RACE wurden wiederum überlappende PCR-Reaktionen durchgeführt, indem die spezifischen Primer SPV2 und SPV3 in Kombination mit dem Ankerprimer verwendet wurden. Die Sequenzen dieser Primer sind wie folgt:

SPV2: ACC AAA GCT TTG GTT TTC AGA (SEQ ID NO:45)

SPV3: TCT GAA AAC GTT TGA GTA GAG (SEQ ID NO:46)

[0212] Die Amplifikationsbedingungen für beide Reaktionen waren 30 Zyklen für 40 Sekunden bei 94°C, 40

Sekunden bei 50°C, jeweils 60 Sekunden bei 72°C und ein Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten. Die Reaktionen wurden in 50 µl durchgeführt, die 30 pmol von jedem Primer, SPV2 und PCR-Ankerprimer in der ersten und SPV3 und PCR-Ankerprimer in der zweiten, 0,2 mM Desoxyribonukleotide und 0,5 Einheiten Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer) in dem entsprechenden Puffer enthielten.

[0213] Um den cDNA-Klon mit voller Länge zu erhalten, wurde eine rekombinante PCR durchgeführt (Higuchi R., supra). Zwei PCR-Reaktionen wurden getrennt durchgeführt, eine mit dem 5'-Fragment und die andere mit dem 3'-RACE-Produkt, wobei Primer mit einer überlappenden Region verwendet wurden. Die überlappenden primären Produkte wurden anschließend mit flankierenden Primern reamplifiziert, was ein Fragment mit voller Länge ergab.

[0214] Die primären PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick-PCR-Aufreinigungsskit (QIAGEN) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt und zusammen in einer einzelnen zweiten Reaktion amplifiziert. Für die zweite PCR-Reaktion wurden die Primer PVEcoRI und der APEcoRI verwendet. Die Sequenzen dieser Primer sind wie folgt:

PVEcoRI: TAC ATG AAT TCG CTC AGT CAT TAT CTT TTA AC (SEQ ID NO:47)

APEcoRI: GAA TTC GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGAC (SEQ ID NO:48)

[0215] Beide primären und sekundären PCR-Reaktionen wurden in 100 µl durchgeführt, die 50 pmol von jedem Primer, 0,4 mM Desoxyribonukleotide und 1,0 Einheiten Pfu-Polymerase (Stratagene) in dem entsprechenden Puffer enthielten. Die primäre PCR-Reaktion amplifizierte die zwei getrennten Fragmente mit 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus 40 Sekunden bei 94°C, 40 Sekunden bei 50°C, 60 Sekunden bei 72°C und einen Verlängerungsschritt bei 72° für 10 Minuten umfasste. Die zweite PCR-Reaktion amplifizierte das rekombinante Fragment mit 12 Zyklen unter Verwendung derselben Bedingungen wie oben beschrieben. Das Produkt mit voller Länge wurde in die EcoRI-Stelle des Klonierungsvektors pCR2.1 ([Fig. 24A](#)) kloniert und, wie oben beschrieben, sequenziert. Dieses Plasmid wurde als pCR2.1-Pv-FRIL bezeichnet.

[0216] Die Nukleinsäuresequenz der Pv-FRIL-cDNA ist wie folgt:

```

1  GCTCAGTCAT TATCTTTTAA CTTTACCAAG TTTGATCTTG ACCAAAAAGA
51  TCTTATCTTC CAAGGTGATG CCACTTCTAC AAACAATGTC TTACAACCTCA
101 CTAAGTTAGA CAGTGGAGGA AACCCTGTGG GTGCTAGTGT GGGGAAGAGTG
151 TTATTCTCTG CACCATTTCA TCTTTGGGAA AACTCTATGG CAGTGTCAAG
201 CTTTGAAACT AATCTCACCA TTCAAATCTC AACACCTCAC CCTTATTATG
251 CAGCTGATGG CTTTGCCTTC TTCCTGCAC CACATGACAC TGTCATCCCT

301 CCAAATCTTT GGGGCAAATT CCTTGGACTC TACTCAAACG TTTTCAGAAA
351 CTCCCCACC TCTGAAAACC AAAGCTTTGG TGATGTCAAT ACTGACTCAA
401 GAGTTGTTGC TGTCGAATTT GACACCTTCC CTAATGCCAA TATTGATCCA
451 AATTACAGAC ACATTGGAAT CGATGTGAAC TCTATTAAGT CCAAGGAAAC
501 TGCTAGGTGG GAGTGGCAAA ATGGGAAAAC GGCCACTGCA CGCATCAGCT
551 ATAACCTCTG CTCTAAAAAA TCAACTGTTA CTACGTTTTA TCCTGGGATG
601 GAAGTTGTGG CTCTCTCCCA TGATGTTGAC TTACATGCAG AGCTTCCTGA
651 ATGGGTTAGA GTAGGGTTAT CTGCTTCAAC TGGAGAGGAG AAACAAAAAA
701 ATACCATTAT CTCATGGTCT TTCAC TTCAA GCTTGAAGAA CAACGAGGTG
751 AAGGAGCCGA AAGAAGACAT GTATATTGCA AACGTTGTGC GATCATATAC
801 ATGGATCAAT GACGTTCTAT CTTATATAAG CAATAAATAA ATGTATGATG
851 CACTCAATAA TAATCACAAG TACGTACGGT GTAGTACTTG TATGTTGTTT
901 ATGAAAAAAA AAAA (SEQ ID NO: 5)

```

[0217] Die Aminosäuresequenz von Pv-FRIL ist wie folgt:

AQSLSFNFTKFDLDQKDLIFQGDATSTNNVLQLTKLDSGGNPVGASVGRVLFSAFHLWENS
 MAVSSFETNLTIQISTPHFYAADGFAFFLAPHDTVIPPNSWGKFLGLYSNVFRNSPTSENQ
 SFGDVNTDSRVVAVEFDTFPNANIDPNYRHIGIDVNSIKSKETARWEWQNGKTATARISYNS
 ASKKSTVTTFFPGMEVVALSHDVDLHAELPEWVRVGLSASTGEEKQKNTIISWSFTSSLKNN
 EVKEPKEDMYIANVVRSYTWINDVLSYISNK*MYDALNNNHKYVRCSTCMLFMKKK
 (SEQ ID NO: 6)

[0218] Die Aminosäuresequenz von Pv-FRIL wurde mit den Aminosäuresequenzen von D1-FRIL und dem PHA-E-Lectin verglichen. Dieser Vergleich ist in [Fig. 24B](#) gezeigt.

Pv-FRIL-kodierende Pflanzenexpressionsvektoren und Nicotiana tabacum-Transformation

[0219] Es wurde eine rekombinante PCR verwendet, um ein Signalpeptid zum Einschleusen von Pv-FRIL in das endoplasmatische Retikulum am 5'-Ende des Pv-FRIL-cDNA-Klons einzuführen. Nach dem Verfahren von Higuchi (supra) wurden das Signalpeptid und der cDNA-Klon mit voller Länge in zwei getrennten primären PCR-Reaktionen amplifiziert. Das Signalpeptid wurde von der Amplifikation des binären Vektors pTA4, der die vollständige Sequenz des α -Amylase-Inhibitorgens der Bohne enthält (Hoffman et al., L. M., Y. Ma und R. F. Barker, Nucleic Acid Res. 10: 7819–7828, 1982, Moreno und Chrispeels, Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 7885–7889, 1989) erhalten.

[0220] Die verwendeten Primer für die zwei primären Reaktionen sind die folgenden:

Amplifikation des Signalpeptids

Sigforw BgIII: AGA TCT AGT GCT TCC TCC AAC (SEQ ID NO:49)

Sigrew: AAA GAT AAT GAC TGA GCG GCT GAG TTT GCG TG (SEQ ID NO:50)

Amplifikation der Mannose-Lectin-cDNA:

SpM1forw: CAC GCA AAC TCA GCC GCT CAG TCA TTA TCT TT (SEQ ID NO:51)

APXhoI: CTC GAG GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA (SEQ ID NO:52)

[0221] Die verwendeten Primer für die Sekundärreaktionen, Sigforw und AP, wurden entworfen, um BgIII-Stellen an den 5'- und XhoI-Stellen an den 3'-Enden zu entwerfen. Sowohl die primären als auch die sekundären PCR-Reaktionen wurden wie oben diskutiert, durchgeführt. Das rekombinante Produkt SpPv-FRIL wurde für 10 Minuten bei 72°C mit 0,5 Einheiten Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer) inkubiert und in den Klonierungsvektor pCR2.1 kloniert ([Fig. 25](#)). Die Nukleotidsequenz des PCR-Produkts wurde wie oben beschrieben bestimmt, um die korrekte Verknüpfung des Signalpeptids zu bestätigen.

[0222] Ein binärer Vektor wurde zur konstitutiven Expression von Pv-FRIL in Tabakpflanzen konstruiert. Das rekombinante SpPv-FRIL wurde in die BgIII/XhoI-Stellen eines Pflanzenexpressionsvektors kloniert, was zur Bildung von pM-SpPv-FRIL führte ([Fig. 26](#)).

[0223] Der binäre Vektor wurde in den Agrobacterium tumefaciens-Stamm C58 entsprechend dem Gefrier-tauverfahren, wie es von An et al., supra, beschrieben wurde, übertragen. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Nicotiana tabacum-Blatt-Scheiben wurde wie von Horsch et al. (Science 227: 1229–1231, 1985) beschrieben, durchgeführt, indem der C58-beherbergende Expressionsvektor pM-SpPv-FRIL verwendet wurde. Kanamycin-resistente Pflanzen wurden auf deren Fähigkeit ausgewertet, in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch Vermehrung in Murashige-Skoog-Medium, das 3% Saccharose und Kanamycinsulfat (Sigma) bei 100 mg/l enthielt, Wurzeln zu bilden.

[0224] Die in diesem Konstrukt transformierten Tabakpflanzen wurden in einem Wachstumsraum unter kontrollierten Bedingungen wachsen gelassen. Die Blätter (20 g) von jungen Pflanzen wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Mörser mit einer Mörserkeule pulverisiert. Das Pulver wurde in einem Puffergemisch, das aus 1 × Phosphat-gepufferter Saline, die 1 mM CaCl₂ enthielt, besteht, mit einem Cocktail von Protease-Inhibitoren (PMSF, Pepstatin und Leupeptin) gerührt. Dieser Brei wurde bei 2000 Upm zentrifu-

giert und der Überstand wurde bei 40 000 Upm in einer Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wurde für 3 Stunden mit 1 ml Ovalbumin-Sepharose gefällt. Die Beads wurden mit demselben Puffer gewaschen und über Nacht mit 200 mM Trehalose in 1/10 Phosphat-gepufferter Saline, die den Cocktail von Protease-Inhibitoren enthielt, gefällt. Ein mit Coomassieblau gefärbtes Gel zeigte, dass diese Präparation reines Pv-FRIL ist. Ein Immunoblot zeigte, dass sowohl die alpha- als auch die beta-Untereinheiten vorhanden sind, und daher wurde die einzelne Polypeptidkette, die für beide Untereinheiten kodiert, durch die transformierten Zellen in vivo gespalten. Bindung an die Ovalbumin-Sepharose und die Freisetzung durch Trehalose zeigt, dass das Produkt des Transgens ein aktives Lectin ist.

BEISPIEL 6

D1-FRIL unterstützt eine verlängerte Erhaltung von humanen CD34⁺ CD38⁻/SCID-repopulierenden Zellen im Ruhezustand ex vivo

[0225] Um weiter die Vorläuferzellkonservierungsaktivität von D1-FRIL zu charakterisieren, wurde ein funktioneller in vivo-Assay für primitive humane hämatopoetische Zellen verwendet, um die Fähigkeit der Zellen zu bestimmen, das Knochenmark von subletal bestrahlten C.B-17- und NOD/LtSz-Mäusen, die homozygot für die schwere kombinierte Immundefizienz-Mutation *Prkdc^{scid}* sind, zu besiedeln und zu repopulieren (Lapidot et al., Science 255: 1137, 1992; Larochelle et al., Nat. Med. 2: 1329–1887, 1996). Dazu wurden die folgenden Verfahren verwendet:

Herstellung von humanen Zellen

[0226] Humane Proben mit Nabelschnurblut (CB) wurden von Dauerlieferanten bezogen. Die Blutproben wurden 1:1 in Phosphat-gepufferter Saline (PBS) ohne Mg^{+2}/Ca^{+2} , die mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) ergänzt war, verdünnt. Mononukleare Zellen mit geringer Dichte wurden nach einer Standardauftrennung auf Ficoll-Paque gesammelt (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und in RPMI mit 10% FBS gewaschen. Einige Proben wurden in 10% DMSO gefroren, während die anderen frisch verwendet wurden. Die Anreicherung von CD34⁺-Zellen wurde mit einem Mini-MACS-Auftrennungskit entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Reinheit der angereicherten CD34⁺-Zellen betrug 60–80%, wenn eine Säule verwendet wurde. CD34⁺CD38^{-/low}-Zellen wurden durch eine FACS-Sortierung gereinigt (FACStar⁺, Becton Dickinson, San Jose, CA), nachdem CD34⁺ angereicherte Zellen mit mAb-Antihuman CD34-FITC (Becton Dickinson) und Antihuman CD38 PE (Coulter, Miami FL USA) (Reinheit > 99%) angefärbt wurden.

Mäuse

[0227] Acht Wochen alte NOD/LtSz-*Prkdc^{scid}/Prkdc^{scid}* (NOD-SCID)-Mäuse und NOD/SCID β 2-Mikroglobulin-Knockout-Mäuse, hier als NOD/SCID B2M^{null} bezeichnet (Christianson et al., J. Immunol. 158: 3578–3586, 1997), die unter festgelegten Tierhaltungsbedingungen in sterilen Mikroisolator Käfigen gezüchtet und gehalten wurden, wurden mit einer subletalen Dosis von 375 cGy bei 67 cGy/Minute von einer Kobaltquelle (⁶⁰Co) vor der Transplantation bestrahlt.

[0228] Humane Zellen wurden in die Schwanzvene von bestrahlten Mäusen in 0,5 ml RPMI mit 10% FBS injiziert. In einigen Experimenten (wie gezeigt) dienten nicht-transplantierte bestrahlte (1500 cGy) CD34⁺-Zellen als Trägerzellen und wurden mit kultivierten Zellen bei einer Endkonzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/Maus co-transplantiert. Die Mäuse wurden 1 Monat nach der Transplantation getötet und Knochenmark (BM)-Zellen wurden aus 8 Knochen von jeder Maus isoliert (Femur, Tibia, Oberarmknochen und Becken).

Ex vivo-Kulturen

[0229] Angereicherte humane CD34⁺-Zellen wurden in Platten mit 24 Vertiefungen kultiviert ($2-4 \times 10^5$ Zellen in 0,5 ml), die RPMI enthielten, das mit 10% FBS + 1% BSA ergänzt war. Ex vivo-Kulturen enthielten die folgende Cytokin-Kombination: Stammzellfaktor (SCF) – 100 ng/ml und Flt3-Ligand (Flt3-L) – 100 ng/ml (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), rhIL-6 – 50 ng/ml und sIL6R – 1280 ng/ml (InterPharm Laboratories, Ares-Serono Group, Ness Ziona, Israel) oder D1-FRIL – 10 ng/ml (ImClone Systems Inc., NY, USA). In einigen Experimenten umfasste der Wachstumsfaktor-Cocktail 300 ng/ml SCF, 300 ng/ml Flt3-L, 50 ng/ml G-CSF, 10 ng/ml IL-3 (R&D Systems) und 10 ng/ml IL-6, sofern bezeichnet. Die Kulturen wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre, die 5% CO₂ enthielt, kodiert. Nach 3, 6, 10 und 13 Tagen wurden die Zellen gesammelt, gezählt, durch FACS analysiert, in halbfesten Kulturen ausgesät und in NOD-SCID-Mäuse transplantiert. Zur

CD56⁺-NK-Zellentwicklung wurden BM-Zellen aus transplantierten Mäusen mit 100 ng/ml SCF und IL-15 (R&D) für 10 bis 14 Tage kultiviert.

Herstellung von D1-FRIL

[0230] D1-FRIL wurde von Samen von Hyazinthenbohnen (*Dolichos lab lab*) unter Verwendung des oben in Beispiel 1 beschriebenen Protokolls isoliert.

CFU-Assay

[0231] Halbfeste Kulturen wurden durchgeführt, um die Spiegel von humanen Vorläufern in ex vivo-Kulturen und im Mark von transplantierten Mäusen nachzuweisen. Die Zellen wurden in 0,9% Methylcellulose (Sigma, St. Louis, MO, USA) 30% FBS, 5×10^{-5} M 2ME, 50 ng/ml SCF, 5 ng/ml IL-3, 5 ng/ml GM-CSF (R&D), und 2 µ/ml Erythropoietin (Ortho Bio Tech, Don Mills, ON, Kanada) ausplattiert (4×10^3 Zellen/ml). Humane Zellen aus dem Knochenmark von transplantierten Mäusen wurden in 15% FBS + 15% humanem Plasma, das nur für humane Kolonien selektiv war, ausplattiert (2×10^5 Zellen/ml). Die Kulturen wurden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre, die 5% CO₂ enthielt, inkubiert und 14 Tage später mit einem Umkehrmikroskop auf myeloide, erythroide und gemischte Kolonien anhand morphologischer Kriterien ausgewertet.

Zellzyklusanalyse

[0232] Zellen wurden auf deren DNA-Gehalt durch Färbung mit Propidiumiodid (Sigma) analysiert. Die Zellen wurden in ex vivo-Kulturen wie beschrieben für 3, 6, 10 und 13 Tage, wie angegeben, kultiviert. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Zellen gesammelt, auf eine Endkonzentration von 0,1 bis 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert und mit 0,1% Triton X-100 (Sigma) für 20 Minuten auf Eis inkubiert. 50 mg/ml Propidiumiodid (PI) wurden vor der Analyse zugegeben. Die durchflusscytometrischen Analysen wurden unter Verwendung von FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA) durchgeführt.

Durchflusscytometrie-Analysen

[0233] Humane und murine Fc-Rezeptoren auf BM-Zellen von transplantierten Mäusen wurden unter Verwendung von humanem Plasma (1:50) und Antimäus-Fc-Rezeptor-Blocker (Antimäus CD16/CD32 mAb, Pharmingen, San Diego, CA, USA) blockiert. Es wurde ein isotypischer Kontroll-mAb verwendet, um falsch-positive Zellen auszuschließen (Coulter, Miami FL USA). Die Reinheit von angereicherten Subpopulationen nach einer magnetischen Bead-Auftrennung wurde durch eine Zweifarben-Färbung unter Verwendung von Antihuman CD34 FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) und Antihuman CD38 PE (Coulter) analysiert. Die Spiegel von humanen Zellen und lymphoiden Linien in dem Mark von transplantierten Mäusen wurden durch eine Doppelfärbung mit Antihuman CD45 FITC (Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande) zusammen mit einem Antihuman CD19 PE (Coulter) zur Detektion von prä-B-Zellen oder mit Antihuman CD56 PE (Coulter) zur Detektion von NK-Zellen nachgewiesen. Die Zellen wurden mit PBS, ergänzt mit 1% FBS und 0,02% Azid, gewaschen, auf ein Volumen von 0,1 bis 1×10^6 Zellen/ml suspendiert, mit direkt-markiertem mAb gefärbt und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen einmal in demselben Puffer gewaschen und mit einem FACSort (Becton Dickinson) analysiert. Die Analyse wurde unter Verwendung von CELLquest-Software (Becton Dickinson) durchgeführt.

Transplantationsanalyse von humanen Zellen

[0234] Die Spiegel der Einpflanzung von humanen Zellen wurde sowohl durch Durchflusscytometrie zur Analyse von humanen myeloiden CD45⁺- und lymphoiden CD45⁺CD19⁺-prä-B-Zellen und durch Quantifizierung humaner DNA wie zuvor beschrieben bestimmt (Lapidot et al., Science 255: 1137, 1992; Larochelle et al., Nat. Med. 2: 1329–1337, 1996; Peled et al., Science 283: 845–848, 1999). Kurz gesagt wurde DNA mit hohem Molekulargewicht vom Knochenmark von transplantierten Mäusen durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion erhalten. DNA (5 g) wurde mit EcoRI verdaut, einer Elektrophorese auf einem 0,6%-Agarosegel unterzogen, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer humanen Chromosom-17-spezifischen α-Satellitensonde (p17H8), die mit ³²P markiert war, hybridisiert (Lapidot et al., supra). Die Intensität der Banden in den Proben wurde mit Gemischen von artifizieller humaner/Maus-DNA (0%, 0,1%, 1% und 10% humaner DNA) verglichen, um die humane DNA zu quantifizieren (Bahnen rechts von Bahn 4 in [Fig. 31](#)). Es wurden mehrere Aufnahmen der Autoradiographien gemacht, um eine Empfindlichkeit herunter auf 0,01% humaner DNA sicherzustellen. Eine transplantierte Maus wurde als positiv gewertet, wenn sowohl humane myeloide und lymphoide Zellen als auch humane DNA in deren Knochenmark nachgewiesen wurde.

[0235] Von diesen Experimenten wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

D1-FRIL erhält, vermehrt jedoch nicht CB CD34⁺-Vorläuferzellen in einer Suspensionskultur

[0236] Wie oben gezeigt, konserviert D1-FRIL selbst unreife CB-Vorläuferzellen bis zu einem Monat in einer Suspensionskultur, ohne Mediumaustausche (siehe z.B. [Fig. 14A](#) und [Fig. 14B](#), und Tabelle 3). Um die Vorläuferzell-konservierenden Eigenschaften von D1-FRIL auf eine Kombination von Cytokinen (SCF, Flt3-L, IL-6 und sIL6-R), von denen gezeigt wurde, dass sie CB-Vorläuferzellen in einer Suspensionskultur erhalten (Sui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2859, 1995; Ebihara et al., Blood 90: 4363–4368, 1997) zu vergleichen, wurden CB CD34⁺-Zellen entweder mit D1-FRIL oder Cytokinen für 3, 6, 10 oder 13 Tage in Medium, das 10% FBS und 1% BSA in RPMI enthielt, kultiviert. Frische Medien und D1-FRIL und/oder Cytokine wurden am Tag 6 zugegeben. Die zu jedem Zeitpunkt geernteten Zellen wurden gezählt und auf klonogene Vorläuferzellen durch Ausplattierung (d.h. Aussäen) in halbfesten Medien getestet.

[0237] Wie in [Fig. 27A](#) gezeigt, nahm die Gesamtanzahl von Zellen in D1-FRIL-Kulturen graduell über die Zeit ab, von anfangs 2×10^5 ausgesäten Zellen auf $1,26 \times 10^5$ Zellen am Tag 13, im Gegensatz zu dem erwarteten 14,3-fachen Anstieg auf $2,8 \times 10^6$ Zellen in Cytokin-Kulturen am Tag 13. In gleicher Weise blieben die Spiegel von Vorläuferzellen in D1-FRIL-Kulturen wie in [Fig. 27B](#) gezeigt auch relativ konstant bis zum Tag 10, nachdem sie auf 9% der Ausgangspopulation abfielen (von $24,7 \times 10^3$ Kolonien am Tag 0 auf $2,3 \times 10^3$ Kolonien am Tag 13). Die Vorläuferspiegel erhöhten sich in Cytokin-Kulturen um das 10-fache von dem Aussetzen bis hin zum Tag 13 der Kultur ([Fig. 27B](#)).

D1-FRIL erhält die Expansionskapazität von CD34⁺-Vorläufern bis zu 2 Wochen in einer ex vivo-Kultur

[0238] Um die Expansionskapazität von D1-FRIL-konservierten Vorläuferzellen in einer Suspensionskultur zu charakterisieren, wurden CD34⁺-Zellen für 6 Tage mit D1-FRIL gewaschen und gegenüber Cytokinen (ohne D1-FRIL) für weitere 4 Tage ausgesetzt. Es wurden Gesamtzellzähler und klonogene Vorläufer-Assays durchgeführt und die Ergebnisse wurden mit Zellen verglichen, die für 10 Tage mit D1-FRIL kultiviert wurden. Frische Medien und D1-FRIL wurden am Tag 6 zugegeben. Interessanterweise ergaben die D1-FRIL-kultivierten Zellen, die als Antwort auf eine Cytokin-Stimulation proliferierten, einen 3,4-fachen Anstieg bei den Zellzahlen ([Fig. 28A](#)) und einen 13-fachen Anstieg bei den Vorläuferspiegeln ([Fig. 28B](#)).

[0239] Weitere Experimente testeten die Fähigkeit von D1-FRIL Cytokin-reaktive CD34⁺-Vorläuferzellen, die entweder mit D1-FRIL für 10 Tage gefolgt von 3 Tagen einer Cytokin-Stimulation oder nur mit D1-FRIL für die gesamten 13 Tage kultiviert wurden. Frische Medien und D1-FRIL wurden am Tag 6 zugegeben. Ein 2,9-facher Anstieg bei der Gesamtzellzahl ([Fig. 28C](#)) und ein 5,5-facher Anstieg bei den Vorläuferzellen ([Fig. 28D](#)) wurden bei Zellen beobachtet, die mit D1-FRIL für 10 Tage gefolgt von weiteren 3 Tagen einer Cytokin-Stimulation kultiviert wurden, im Vergleich zu Kulturen mit D1-FRIL für 13 Tage allein. Diese Ergebnisse beweisen, dass D1-FRIL alleine die proliferative Fähigkeit von humanen Vorläuferzellen bis zu 13 Tage in einer Suspensionskultur aufrecht erhält, und dass eine nachfolgende Stimulation von Zellen, die für 10 Tage mit D1-FRIL kultiviert wurden, immer noch auf die proliferativen Signale von den Cytokinen reagieren.

D1-FRIL erhält SCID-repopulierende Stammzellen (SRC) in ex vivo-Kulturen

[0240] Zu jedem Zeitpunkt während der Kultur wurden die humanen CB CD34⁺-Zellen gesammelt und der Gehalt von jeder Vertiefung wurde auf die Vorläuferzellspiegel (oben beschrieben) getestet, und 2×10^5 der verbliebenen Zellen wurden in eine Maus transplantiert. Einen Monat später wurden die Mäuse getötet und deren Knochenmark wurde entnommen und auf das Vorliegen von humanen myeloiden und lymphoiden Zellen getestet. Vor dem Test wurden humane DNA-Spiegel in dem Knochenmark von einzelnen transplantierten Mäusen durch eine Southern Blot-Analyse quantifiziert. Eine repräsentative Southern Blot Analyse, welche die Detektion von 0%, 0,1%, 1% und 10% humaner DNA pro muriner DNA zeigt, ist in [Fig. 29E](#) wiedergegeben.

[0241] [Fig. 29A–Fig. 29D](#) zeigen repräsentative Southern Blot-Analysen des Knochenmarks von Mäusen, die mit ex vivo-kultivierten Zellen transplantiert wurden. [Fig. 29A](#) ist ein repräsentativer Southern Blot, der humane DNA in dem Mark von Mäusen zeigt, die mit Zellen transplantiert wurden, die mit FRIL für 6 Tage (Bahn 1), FRIL für 10 Tage (Bahn 2) oder mit FRIL für 6 Tage, gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (Bahn 3) kultiviert wurden. In einem anderen typischen Experiment nahmen die Transplantationsspiegel durch Zellen, die mit D1-FRIL für 10 Tage kultiviert wurden, um ungefähr das 10-fache ab im Vergleich zu Zellen, die mit D1-FRIL für 6 Tage kultiviert wurden ([Fig. 29A](#), Bahnen 1 und 2). Jedoch gab es einen ungefähr 10-fachen Anstieg bei dem Transplantationsgrad ([Fig. 29A](#), Bahn 3), wenn Zellen, die mit D1-FRIL für 6 Tage kultiviert

wurden, anschließend mit Cytokinen für 4 Tage stimuliert wurden im Vergleich zu D1-FRIL alleine für 10 Tage (Bahn 2). Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn Zellen von anderen Spendern, wie in **Fig. 29B**, Bahnen 3–4, gezeigt (Zellen wurden mit D1-FRIL für 6 Tage gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation kultiviert) im Vergleich zu den Bahnen 1 bis 2 (Zellen wurden mit D1-FRIL allein für 10 Tage kultiviert), vor der Transplantation transplantiert wurden. D1-FRIL-Kulturen konnten selbst bis zu 13 Tage, wie in den **Fig. 28C–Fig. 28D** gezeigt, vor einer Transplantation in Mäusen verlängert werden. Ein moderater Anstieg bei den Transplantationsgraden wurde festgestellt, wenn das Mark von Mäusen, die mit den ursprünglichen Zellen transplantiert wurden, die nicht mit D1-FRIL vor dem Aussäen kultiviert wurden (**Fig. 29C**, Bahn 1) mit Zellen, die mit D1-FRIL für 13 Tage kultiviert wurden (**Fig. 29C**, Bahn 2) verglichen wurden. **Fig. 28D** zeigt die Ergebnisse eines anderen Experiments, wobei der Unterschied zwischen den Transplantationsgraden, die von Zellen, die mit D1-FRIL für 10 Tage (Bahn 1) oder mit D1-FRIL für 6 Tage, gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (Bahn 2) erhalten wurden, gering ist. Trotzdem wurde ein 10-facher Anstieg bei den Zellen beobachtet, die entweder mit D1-FRIL für 13 Tage (**Fig. 29D**, Bahn 3) oder mit D1-FRIL für 10 Tage, gefolgt von 3 Tagen einer Cytokin-Stimulation (**Fig. 29D**, Bahn 4) kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen, die für 10 Tage kultiviert wurden (**Fig. 29D**, Bahnen 1 und 2).

[0242] Die humanen Transplantationsgrade im Knochenmark von Mäusen, die mit CD34⁺-Zellen transplantiert wurden, die entweder mit D1-FRIL für 10 Tage (n = 12) oder mit D1-FRIL für 6 Tage (n = 33) gefolgt von einer Cytokin-Stimulation für 4 Tage kultiviert wurden, sind in **Fig. 30** zusammengefasst. Zellen, die mit D1-FRIL, gefolgt von Cytokinen, kultiviert wurden, zeigten einen 7,4-fach höheren Transplantationsgrad als Zellen, die mit D1-FRIL allein für 10 Tage kultiviert wurden (**Fig. 30**, p = 0,05).

[0243] Um die Wirkung von D1-FRIL auf CB-Populationen, bei denen primitive humane SRC hoch angereichert waren, zu testen, wurden CD34⁺-Zellen, die durch immunomagnetische Beads isoliert wurden, weiter durch Durchflusscytometrie basierend auf einer fehlenden CD38-Expression weiter sortiert. CD34⁺CD38^{-low}-Zellen (99% Reinheit), die mit D1-FRIL allein oder mit D1-FRIL gefolgt von Cytokinen kultiviert wurden, zeigten Transplantationsmuster in NOD/SCID B2M^{null}-Mäusen (Christianson et al., supra), die ähnlich denen waren, wie sie für CD34⁺-Zellen beobachtet wurden. Diese Mäuse wurden erfolgreich für eine sekundäre humane Stammzelltransplantation verwendet (Peled et al., supra), besitzen eine geringere angeborene Immunität aufgrund des Fehlens von NK-Aktivität und erfordert daher (10-mal) weniger humane Zellen zur Transplantation im Vergleich zu NOD/SCID-Mäusen.

[0244] **Fig. 31** ist ein repräsentativer Southern Blot (1 von 4 Experimenten), der die relativen Transplantationsgrade von Zellen zeigt, die mit D1-FRIL für 10 Tage kultiviert wurden (Bahn 4) im Vergleich zu 6 Tagen mit D1-FRIL, gefolgt von 4 Tagen einer Cytokin-Stimulation (Bahnen 1–3) vor einer Transplantation in Mäusen. DNA mit hohem Molekulargewicht wurde von dem Knochenmark von transplantierten Mäusen erhalten und einer Southern Blot Analyse auf das Vorliegen von humaner DNA unterzogen.

[0245] Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein erhöhter Transplantationsgrad in Zellen festgestellt, die Cytokinen nach D1-FRIL ausgesetzt waren. Daher wurde dieselbe Anfangszelldosis, die in eine Maus in Bahn 4 transplantiert wurde, auf 3 Mäuse in den Bahnen 1 bis 3 aufgeteilt, was auf eine Vermehrung von D1-FRIL-kultivierten SRC hinweist, wenn sie im Anschluss einer Cytokin-Stimulation ausgesetzt waren. Der Transplantationsgrad in Mäusen, die mit Zellen transplantiert wurden, die mit D1-FRIL und anschließend Cytokinen behandelt wurden (**Fig. 31**, Bahn 1 bis 3) war ungefähr um das 10-fache höher im Vergleich zu Mäusen, die mit Zellen transplantiert wurden, die mit D1-FRIL alleine kultiviert wurden (**Fig. 31**, Bahn 4). Da die Anfangsdosis von Zellen für die D1-FRIL + Cytokin-Probe auf drei Mäuse aufgeteilt wurde, wurde ein 30-facher Anstieg beim Transplantationsgrad für CD34⁺CD38^{-low}-Zellen festgestellt, die durch Cytokine nach D1-FRIL stimuliert wurden, im Vergleich zu der Kultur mit D1-FRIL allein. Zusätzlich zeigt dieses Experiment einen ungefähr 3-fach höheren Vermehrungsspiegel von SRC für CD34⁺CD38^{-low}-Zellen als für die gesamten CD34⁺-Zellen. **Fig. 32** fasst den Grad der Zunahme bei den Transplantationsgraden von CD34⁺CD38^{-low}-Zellen, die mit D1-FRIL alleine kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen, die anschließend mit Cytokinen stimuliert wurden, in 6 Experimenten zusammen (3 Experimente mit NOD/SCID B2M^{null}-Mäusen und 3 Experimente mit NOD/SCID-Mäusen ergaben ähnliche Ergebnisse). Diese Daten zeigten eine 30-fache Vermehrung von SRC für CD34⁺CD38^{-low}-Zellen und einen 3-fach höheren Spiegel als der von Gesamt-CD34⁺-Zellen in den entsprechenden Experimenten.

[0246] Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass D1-FRIL langfristig repopulierende Stammzellen konserviert. Knochenmark, das von NOD/SCID-Mäusen entnommen wurde, die anfangs mit CD34⁺-Nabelschnurblutzellen transplantiert wurden, die mit D1-FRIL kultiviert wurden, wurden in eine zweite Gruppe von sublethal-bestrahlten NOD/SCID-Maus-Empfängern transplantiert. Nach einem Monat wurden das Knochenmark

von der zweiten Empfängergruppe auf das Vorliegen einer humanen Hämatopoese getestet, was unter Verwendung der oben beschriebenen Assays bestimmt wurde. Es wurde eine Multi-Linien-Transplantation in der zweiten Gruppe von sublethal-bestrahlten NOD/SCID-Maus-Empfängern festgestellt. Diese beobachtete Persistenz von repopulierenden Zellen in dieser seriellen Transplantationsstudie hat auf das Vorliegen von langfristigen repopulierenden Stammzellen hingewiesen.

D1-FRIL konserviert das SRC-Potential einer Multi-Linien-Differenzierung im Knochenmark der Maus

[0247] Eine Southern Blot Analyse detektierte und quantifizierte die Spiegel von humaner DNA im Knochenmark von transplantierten Mäusen ohne spezifisch den Differenzierungsstatus von humanen Zellen, die von dem Knochenmark der Maus entnommen wurden, anzugeben. Da SCID-repopulierende Stammzellen (SRC) durch eine Multi-Linien-Differenzierung von myeloiden und lymphoiden Zellen in NOD/SCID-Mäusen definiert werden, wurden die in vivo-Differenzierungsprozesse von D1-FRIL-kultivierten CD34⁺-Zellen im Knochenmark der Maus weiter untersucht. Dazu wurden CD34⁺- oder sortierte CD34⁺CD38^{-low}-Zellen entweder mit FRIL für 10 Tage oder mit FRIL für 6 Tage gefolgt von einer Cytokin-Stimulation für 4 Tage vor der Transplantation kultiviert. Knochenmark von transplantierten Mäusen wurde einen Monat später gesammelt und die Zellen wurden entweder in halbfesten Medien, die selektiv für humane Kolonien waren (Ergebnisse sind in [Fig. 33A](#) gezeigt), ausgesät, oder wurden auf Linien-spezifische Marker durch Durchflusscytometrie analysiert (Ergebnisse sind in den [Fig. 33B](#) bis [Fig. 33F](#) gezeigt).

[0248] Die Vorläuferzellkapazität von humanen CB CD34⁺-Zellen, die für 10 Tage mit D1-FRIL kultiviert wurden und einen Monat nach Transplantation in NOD/SCID-Mäusen geerntet wurden, wurde in Halbfest-Kolonie-Assays, die selektiv das Wachstum von humanen Vorläuferzellen fördern, bestimmt. [Fig. 33A](#) zeigt, dass die Spiegel von humanen Vorläuferzellen im Knochenmark von transplantierten Mäusen sich um das 2,3-fache erhöhte, wenn SRC mit Cytokinen für 4 Tage nach 6 Tagen einer D1-FRIL-Inkubation, im Vergleich zu D1-FRIL allein für 10 Tage vor einer Transplantation stimuliert wurden. Darüber hinaus bildeten sich sowohl myeloide als auch erythroide Kolonien in den Kolonie-Assays (Daten nicht gezeigt) sowie eine humane B-Zell-Differenzierung, die durch Durchflusscytometrie bestimmt wurde ([Fig. 33C](#) und [Fig. 33D](#)), was darauf hinweist, dass eine Inkubation mit D1-FRIL das Multi-Linien-Differenzierungspotential von SRC aufrecht erhielt. Eine repräsentative Durchflusscytometrie-Analyse zeigte das Vorliegen von humanen CD45⁺CD19⁺-prä-B-Zellen im Mark von Mäusen, die entweder mit CD34⁺-Zellen ([Fig. 33C](#)) oder CD34⁺CD38^{-low}-Zellen ([Fig. 33D](#)) transplantiert wurden, die mit D1-FRIL für 10 Tage (1% bzw. 10% CD19⁺-Zellen) kultiviert wurden.

[0249] Um zu bestimmen, ob humane lymphoide Vorläuferzellen im Knochenmark von transplantierten Mäusen das Potential haben, sich nicht nur in myeloide Zellen sondern auch in lymphoide NK-Zellen zu differenzieren, wurden Zellen aus transplantiertem Knochenmark der Maus auch mit SCF und IL-15 für 10 Tage kultiviert. Zellen, die von den Kulturen geerntet wurden, wurden auf humane NK-Zellen durch Durchflusscytometrie unter Verwendung der human-spezifischen monoklonalen Antikörper gegen CD45 und dem NK-Zellantigen, CD56, analysiert. Zellen von Mäusen, die mit CD34⁺ oder CD34⁺CD38^{-low}-Zellen transplantiert wurden, sind gezeigt (1% bzw. 7,7% CD56⁺-Zellen, [Fig. 33E](#) bzw. [Fig. 33F](#)).

Ex vivo-Konservierung von frühen Vorläuferzellen mit D1-FRIL im Vergleich zum Flt3-Ligand

[0250] D1-FRIL wurde anhand dessen Fähigkeit identifiziert, die Proliferation von NIH 3T3-Zellen, die mit Flt3 transfiziert waren, zu stimulieren und nicht durch nicht-transfizierte Zellen oder Zellen, die mit dem verwandten Fms-Tyrosin-Kinaserezeptor transfiziert waren (Moore et al., Blood 90 supp. 1: 308, 1997). Obwohl D1-FRIL und Flt3-L beide eine Proliferation von Flt3 3T3-Zellen stimulieren, besitzen sie unterschiedliche Aktivitäten auf CB-Vorläuferzellen. Flt3-L führt primitive Zellen aus dem Ruhezustand in den Zellzyklus (Lyman und Jacobsen, Blood 91: 1101–11345, 1998). Im Gegensatz dazu erhält D1-FRIL selbst Vorläuferzellen in einem Serumdefinierten Medium für 15–29 Tage in Kultur ohne Medien austausche (Colucci et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(2): 646–650, 1999). Die Fähigkeit von D1-FRIL oder Flt3-L CB CD34⁺-Vorläuferzellen in Suspensionskulturen, die aus 10% FBS und 1% BSA in RPMI bestehen, für 10 Tage zu erhalten, wurde in der Gegenwart und Abwesenheit von Cytokinen verglichen. Die Zellen wurden dann für einen CFU-Assay ausgesät.

[0251] Wie in [Fig. 34A](#) gezeigt, erhöhte sich die Anzahl von Gesamtzellen, die 10 Tage nach einer Suspensionskultur in D1-FRIL geerntet wurden, minimal um das 1,9-fache, während Zellen, die entweder mit Flt3-L allein oder in Kombination mit D1-FRIL kultiviert wurden, sich um das 4,5-fache, bzw. um das 5,4-fache erhöhten ($p < 0,05$). Kulturen, die CB CD34⁺-Zellen mit Cytokinen enthalten, entweder allein oder mit D1-FRIL und Flt3-L, führten zu einem 10,9 bis 12,5-fachen Anstieg bei den Zellzahlen; jedoch nahmen die Zellen, die mit D1-FRIL allein und anschließend Cytokinen kultiviert wurden, lediglich um das 4,6-fache zu ([Fig. 34A](#), $p <$

0,05).

[0252] Interessanterweise erhielten Zellen, die mit D1-FRIL alleine oder gefolgt von Cytokinen kultiviert wurden, selektiv eine höhere Anzahl und Verhältnis der primitiven Granulozyten-Erythroid-Makrophagen-Megakaryozyten-Kolonie-bildenden Einheiten (CFU-GEMM) aufrecht als andere Behandlungen (Fig. 34B, $p < 0,05$). Ungefähr 40% der Vorläuferzellen, die durch D1-FRIL aufrecht erhalten wurden, waren CFU-GEMM, ein relativer 2,6–3,7-facher Anstieg bei den D1-FRIL-Kulturen im Vergleich zu anderen Kombinationen (Fig. 34B, $p < 0,05$). Im Gegensatz zu Flt3-L wurde der hohe Prozentsatz von CFU-GEMM, 18,2% versus 38,6% beibehalten, wenn Zellen zuerst mit D1-FRIL und dann mit Cytokinen inkubiert wurden (Fig. 34B, $p < 0,05$). Diese Ergebnisse zeigen, dass D1-FRIL und Flt3-L unterschiedlich auf primitive Vorläuferzellen in Kultur wirken.

D1-FRIL erhält höhere Spiegel von CD34⁺-Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus im Vergleich zu Cytokin-behandelten Zellen

[0253] In vivo sind unreife CD34⁺-Zellen hauptsächlich nicht-zyklische Zellen im Ruhezustand (Young et al., Blood 87: 545, 1996; Movassagh et al., Stem Cell 15: 214–222, 1997; Ladd et al., Blood 90: 658–668, 1997). Da D1-FRIL relativ konstante Spiegel von Vorläuferzellen über zwei Wochen in einer Suspensionskultur, die anschließend auf eine Cytokin-Stimulation reagieren kann (siehe Fig. 27) aufrecht erhält, wurde der Zellzyklus-Status von CD34⁺-Zellen, die mit D1-FRIL inkubiert wurden, untersucht und mit Kulturen mit einer Cytokin-Stimulation verglichen. Der DNA-Gehalt von CD34⁺-Zellen wurde durch Durchflusscytometrie unmittelbar nach der Isolation von Zellen analysiert. Ein Durchschnittswert von 96,6% Zellen wurde in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus festgestellt (Fig. 35A).

[0254] Der Zellzyklus-Status von CB CD34⁺-Zellen wurde in 5 unabhängigen Experimenten mit Zellen, die für 3 bis 13 Tage entweder mit D1-FRIL oder einer Cytokin-Kombination kultiviert wurden, analysiert (SCF, Flt3-L, G-CSF, IL-3, IL-6) (Bhatia et al., J. Exp. Med. 186: 619–624, 1997; Conneally et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9836–9841, 1997). Der Prozentsatz von zyklischen Zellen in der SG₂M-Phase nahm in beiden Kulturen um die Hälfte vom Tag 3 bis zum Tag 13 ab, von 17,7% auf 9,1% bei D1-FRIL und von 50,9% auf 23,2% bei den Cytokinen (Tabelle 1) (3,4% der Zellen der anfangs ausgesäten Zellen befanden sich in SG₂M).

TABELLE 5

Prozentsatz und Anzahl von zyklischen CD34⁺-Zellen (in der SG₂M-Phase), die mit D1-FRIL oder Cytokinen für 3, 6, 10 oder 13 Tage kultiviert wurden

Tag in Kultur	D1-FRIL (%)	Cytokine (%)	D1-FRIL (Zellen x 10 ³)	Cytokine (Zellen x 10 ³)	-facher Anstieg induziert durch Cytokin
Tag 3	17,7±1,9	50,8±1,4	35	212	6
Tag 6	20±2	26	43,6	389,5	9
Tag 10	10±1,9	29,7±1	26,4	553	21
Tag 13	9,1±4,1	23,14	11,4	664,6	60

[0255] CD34⁺-Zellen wurden mit D1-FRIL oder SCF + Flt3-Ligand + IL-3 + G-CSF + IL-6 kultiviert (2 × 10⁵ Zellen/0,5 ml). Eine Zellzyklusanalyse wurde mit Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Die Zellzahlen wurden berechnet, indem der Prozentsatz von zyklischen Zellen mit den Gesamtzellzahlen multipliziert wurde. Die Daten stellen Mittelwerte ± SE-Werte aus 5 Experimenten dar.

[0256] Noch drastischer unterschied sich die Anzahl von Zellen in der SG₂M-Phase während der Kultur von den 6,8 × 10³ Zellen in der SG₂M-Phase, die am Anfang ausgesät wurden. Die durchschnittliche Anzahl von zyklisierenden Zellen in D1-FRIL-Kulturen blieb relativ konstant, von 35 × 10³ Zellen am Tag 3 und 43,6 × 10³ Zellen am Tag 6 und sank auf eine geringere Zahl von 26,4 × 10³ Zellen am Tag 10 und 11,4 × 10³ Zellen am Tag 13. Dieses Zellmuster im Zellzyklus erklärt die niedrigen Spiegel von den Gesamtzellzahlen und Vorläuferzellen (siehe Fig. 27). Im Gegensatz dazu nahm die erwartete Anzahl von zyklisierenden Zellen in Cytokin-Kulturen dramatisch zu. Die durchschnittliche Anzahl von Zellen in der SG₂M-Phase in Cytokin-Kulturen erhöhte sich um das 31-fache auf 212 × 10³ Zellen am Tag 3, um das 57-fache auf 389,5 × 10³ Zellen am Tag 6, um das 81-fache auf 553 × 10³ Zellen am Tag 10 und um das 97,7-fache auf 664,6 × 10³ zyklisierenden Zellen am Tag 13, im Vergleich zu 6,8 × 10³ Zellen in SG₂M, die in Kultur ausgesät wurden (Tabelle 1). Zusammengefasst

belegen diese Ergebnisse die Feststellung, dass D1-FRIL reifere Vorläuferzellen in einem Ruhezustand im Vergleich zu Cytokin-behandelten Kulturen bis zu 2 Wochen in Kultur konserviert.

[0257] Um zu testen, ob D1-FRIL auf eine dominante Weise wirkt, um zu verhindern, dass Cytokine die Vorläuferzellpopulation aus dem Ruhezustand in die SG₂M-Phase freisetzen, wurde der Zellzyklusstatus von Zellen, die entweder mit D1-FRIL oder Flt3-L in der Gegenwart oder Abwesenheit von Cytokinen kultiviert wurden, nach 3 Tagen Suspensionskultur analysiert, was in den [Fig. 35A](#) und [Fig. 35G](#) und in Tabelle 6 gezeigt ist. Die [Fig. 35A](#) bis [Fig. 35G](#) zeigen repräsentative Zellzyklus-Histogramme von CD34⁺-Zellen, die ohne Zusatz ([Fig. 35A](#)), D1-FRIL alleine ([Fig. 35B](#)) oder verschiedenen Cytokinen oder Kombinationen davon ([Fig. 35C](#) bis [Fig. 35G](#)) für 3 Tage kultiviert wurden und der durchschnittliche Prozentsatz von Zellen in jeder Zellzyklusphase ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

TABELLE 6

Zellzyklusstatus von CD34⁺-Zellen, für 3 Tage ex vivo-kultiviert

Kulturbedingungen	Sub G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	SG ₂ M
D1-FRIL	9,4±2,8	72,9±2,8	17,7±1,9
Flt3-L	9,4±3,3	68,4±2,1*	22,2±5,4*
D1-FRIL+Flt3-L	8,6±3,9	67,1±1,8*	24,3±5,65*
Cytokine	2,6±1,7	46,5±4,5*	50,9±1,4*
Cytokine+D1-FRIL	2,5±0,6	47,5±2,2*	50,0±2,7*
Cytokine+Flt3-L	2,1±0,5	47,7±2,4*	50,2±2,9*

[0258] Daten sind als durchschnittlicher Prozentsatz ± SE, von 4 unabhängigen Experimenten gezeigt. p-Werte = (vs. D1-FRIL): * < 0,05.

[0259] Wie auch in Tabelle 5 gezeigt, hält D1-FRIL einen signifikant höheren Prozentsatz von Zellen im Ruhezustand und einen geringeren Prozentsatz von zyklierenden Zellen ([Fig. 35B](#) und Tabelle 6) im Vergleich zu einer Stimulation mit Cytokinen ([Fig. 35C–Fig. 35G](#) und Tabelle 6). Kulturen mit Flt3-L alleine führten zu einem moderaten, jedoch signifikanten Abfall beim Prozentsatz von Zellen in G₀/G₁ (p < 0,05) und zu einem entsprechenden Anstieg in der SG₂M-Phase im Vergleich zu Zellen, die mit D1-FRIL allein kultiviert wurden (Tabelle 6). Kulturen, die D1-FRIL und Flt3-L zusammen enthielten, erhöhten leicht den Prozentsatz von Zellen in der SG₂M-Phase von 17,7% (mit D1-FRIL alleine) auf 24,3% (p < 0,05, Tabelle 6). Wie in Tabelle 5 gezeigt, induzierte das Aussetzen von CB CD34⁺-Zellen gegenüber Cytokinen für 3 Tage einen wesentlich größeren Anteil von Zellen in der SG₂M-Phase im Vergleich zu einer Kultur mit D1-FRIL allein (p < 0,05). Der Prozentsatz von Zellen, die eine Apoptose durchmachen, wenn sie in D1-FRIL kultiviert wurden, war leicht höher als unter Cytokin-Bedingungen, was anhand einer subG₀/G₁-Population bestimmt wurde. Weder D1-FRIL noch Flt3-L bewirkten unter diesen Kulturbedingungen eine Cytokin-Induktion in die SG₂M-Phase von der im Wesentlichen im Ruhezustand befindlichen CD34⁺-Zellpopulation (Tabelle 6)

BEISPIEL 7

D1-FRIL konserviert CB-Vorläufer in der Gegenwart von wirksamen Stimulatoren im Ruhezustand

[0260] D1-FRIL wurde aus Dolichos lab lab wie oben in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. D1-FRIL wurde über einen 5-Log-Dosisbereich (10 ng/ml bis 1000 ng/ml) auf humane CB MNC getestet, die in einem Serum-definierten Medium, das Agar-Leukozyten-konditioniertes Medium enthielt, einer wirksamen Quelle eines breiten Bereichs von Stimulatoren, kultiviert wurden. Die Anzahl von lebenden MNC und Vorläuferzellen wurde nach 5 Tagen in Kultur bestimmt. Die Ergebnisse eines von drei repräsentativen Experimenten sind in Tabelle 7 unten gezeigt. Die Anzahl von lebenden MNC am Ende der Kultur verringerte sich um das 1,7- bis 5-fache in Kulturen, die 10 bis 1000 ng/ml D1-FRIL enthielten. Die Häufigkeiten von myeloiden und erythroiden Vorläufern in diesen Kulturen erhöhten sich um das 1,4- bis 2,4-fache über denselben Dosisbereich.

TABELLE 7

D1-FRIL (ng/ml)	MNC (x 10 ⁻⁴)	Vorläuferzellhäufigkeit (Kolonien/10 ⁻⁵ MNC)	
		Myeloid	Erythroid
1000	20	90 +/- 85	150 +/- 42
100	55	44 +/- 15	85 +/- 12
10	70	77 +/- 12	103 +/- 6
1	120	16 +/- 2	38 +/- 7
0,1	115	21 +/- 7	50 +/- 7
0	120	38 +/- 7	63 +/- 32

[0261] Kultur von CB MNC in D1-FRIL führt zu weniger MNC und zu einer höheren Häufigkeit von Vorläuferzellen. 4×10^6 CB MNC wurden in 2 ml AIMV (Life Technologies), das Agar-SCM (StemCell Technologies) und verschiedene Konzentrationen von D1-FRIL enthielt, kultiviert. Die Kulturen wurden nach 5 Tagen geerntet und die Anzahl von lebenden MNC und Vorläuferzellen wurde bestimmt. Die gezeigten Koloniedaten wurden als die Häufigkeit von Vorläufern pro 105 MNC normalisiert.

[0262] Eine Abnahme bei der Zellzahl und ein entsprechender Anstieg bei der Häufigkeit von Vorläufern in Kulturen, die D1-FRIL enthalten, in der Gegenwart von wirksamen Stimulatoren stimmen mit unserer Hypothese überein, dass D1-FRIL eine Cytokin-induzierte Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen verhindern kann. Tabelle 8 unten zeigt die relative Abnahme von MNC in D1-FRIL-enthaltenen Kulturen im Vergleich zu den Kontrollen und den relativen Anstieg bei der Vorläuferzellhäufigkeit von Vorläuferzellen. Die Gesamtzahl von Vorläuferzellen war wie erwartet vermindert (Vorläuferzellen in den verschiedenen Differenzierungsstadien, es würde keine direkte Korrelation zwischen der Anzahl von Vorläuferzellen und MNC erwartet werden.

TABELLE 8

-fache ABNAHME		-fache ZUNAHME	
D1-FRIL (ng/ml)	MNC	Vorläuferhäufigkeit	
		Myeloid	Erythroid
1000	5,0	2,4	2,4
100	2,0	1,2	1,4
10	1,7	2,1	1,6
1	1,0	0,4	0,6
0,1	1,0	0,6	0,8
0	1,0	1,0	1,0

[0263] Eine Verringerung bei den MNC korreliert mit dem relativen Anstieg der Häufigkeit von Vorläuferzellen. Die relative Abnahme bei den MNC von D1-FRIL-Kulturen stimmt mit einer erhöhten Vorläuferzellhäufigkeit in den entsprechenden Proben überein.

BEISPIEL 8

D1-FRIL schützt CB MNC vor der Toxizität von Chemotherapie-Arzneimitteln

[0264] Experimente, die zeigen, dass D1-FRIL die Proliferation und Differenzierung von CB-Vorläuferzellen in Kulturen, die wirksame Stimulatoren enthalten, verhindern kann, zeigten, dass D1-FRIL Vorläuferzellen vor der Toxizität von Zellzyklus-aktiven Chemotherapie-Arzneimitteln schützt. Das oben beschriebene Kultursystem wurde an ein Plattenformat mit 96 Vertiefungen angepasst und die üblicherweise verwendeten Chemotherapeutika, Cytarabin (Ara-C) ([Fig. 36A](#)), Doxorubicin (Dox) ([Fig. 36B](#)) und 5-Fluoruracil (5-FU) ([Fig. 36C](#)) wurden über einen 5-Log-Dosisbereich auf CB MNC getestet, die in der Gegenwart und Abwesenheit von D1-FRIL kultiviert wurden (siehe [Fig. 36A-36C](#)). D1-FRIL wurde von Dolichos lab lab, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, gereinigt. Kulturen, die D1-FRIL enthielten (entweder 10 ng/ml oder 100 ng/ml), ergaben einen 2–3

Log-Dosis-Shift von CB MNC zu Ara-C ([Fig. 36A](#)) und Dox ([Fig. 36B](#)). Wie in [Fig. 36C](#) gezeigt, erhöhte die Gegenwart von D1-FRIL in 5-FU-Kulturen die Lebensfähigkeit über einen großen Dosisbereich. Unterschiede zwischen dem Dosis-Shift von Ara-C und Dox durch D1-FRIL im Vergleich zu 5-FU kann anhand kürzlicher Berichte erklärt werden, die zeigen, dass 5-FU über einen RNA-Mechanismus und nicht als ein DNA-spezifisches Arzneimittel wirkt (Bunz et al., J. Clin. Invest. 104: 263–269, 1999).

BEISPIEL 9

Mäuse tolerieren hohe Spiegel von D1-FRIL

[0265] Es wurde die in vivo-Toxizität von D1-FRIL in Mäusen bestimmt. Zu Beginn wurde D1-FRIL intravenös in Mäusen über einen 3-Log-Dosisbereich von 0,006 bis 1 mg/kg (0,32 bis 20 µg/Maus) verabreicht. D1-FRIL wurde gut toleriert und diese Mäuse haben anschließend zweimonatige Gaben von D1-FRIL erhalten, ohne dass kurz- oder langfristige Nebenwirkungen festzustellen waren.

[0266] Protokolle, um chemoprotektive Eigenschaften von Cytokinen in Mäusen zu testen, beinhalten typischerweise 4- bis 10-tägige Vorbehandlungskuren (Bolos- oder kontinuierliche Abgabe) vor dem Beginn einer Chemotherapie. Indem diese Rahmenbedingung als Ausgangspunkt verwendet wurde, wurde D1-FRIL mit 5 mg/kg (100 µg/Maus) täglich intravenös für 4 Tage injiziert. Es wurden keine größeren Nebenwirkungen in den über 150 behandelten Mäusen bei diesem Dosierungsschema festgestellt. D1-FRIL wurde aus Dolichos lab lab, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, gereinigt.

[0267] Es wurden die oberen Grenzen einer D1-FRIL-Toxizität als nächstes festgestellt, indem eine einzelne intraperitoneale Bolus-Injektion von D1-FRIL (auf 1 ml Volumen gebracht) mit 500 mg/kg injiziert wurde und das Überleben von Mäusen für 48 Stunden überwacht wurde. Von den vier BALB/c-Mäusen, die diese Behandlung erhielten (2 Männchen und 2 Weibchen, 5 Monate alt) überlebte lediglich eine Maus (ein Männchen) für 48 Stunden. Das Gewicht der überlebenden Maus verringerte sich um ungefähr 15% in den ersten beiden Tagen und ging bis zum Tag 4 auf Normal zurück. Die Blutwerte der überlebenden Maus befanden sich 3 Tage nach der Injektion von FRIL in normalem Bereich. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst eine sehr hohe Dosis von D1-FRIL nicht vollständig toxisch ist.

[0268] Zusätzliche Untersuchungen zum Bestimmen des Dosisbereichs wurden durchgeführt, um die Toxizität in Mäusen zu bestimmen, die hohe Dosen von D1-FRIL über verschiedene Routen verabreicht bekamen (intravenös, intraperitoneal, subkutan und oral).

BEISPIEL 10

In vivo-Modulation von Vorläufern durch D1-FRIL in Mäusen

[0269] Indem das am Anfang entwickelte Dosierungsschema von D1-FRIL verwendet wurde (5 mg/kg × 4 Tage), um eine Chemoprotektion zu testen, wurden hämatopoetische Parameter in Mäusen 3, 5 und 7 Tage am Ende der D1-FRIL-Behandlung untersucht. D1-FRIL wurde, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, aus Dolichos lab lab aufgereinigt. BALB/c-Mäuse, deren Gewicht angepasst wurde (Weibchen, 8 Wochen alt), wurden intravenös entweder mit 0,2 ml D1-FRIL (500 mg/ml) oder 0,2 ml HBSS täglich für 4 Tage intravenös injiziert. Zwei Mäuse von jeder Gruppe wurden nach 3 Tage, 5 Tagen und 7 Tagen nach Beendigung der D1-FRIL-Behandlung untersucht. Blut wurde in heparinisierten Gefäßen durch Augenblutungen vor dem Abtöten der Mäuse mit CO₂ gesammelt. Von jeder Maus wurden zwei Oberschenkel und eine Milz entnommen und die Proben wurden innerhalb einer Stunde verarbeitet. Vorläuferzellen wurden isoliert, indem hämatopoetische Standard-Kolonie-Assays verwendet wurden (StemCell Technologies). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind unten in Tabelle 9 gezeigt.

TABELLE 9

Hämatopoetische Parameter 3, 5 und 7 Tage nach einer D1-FRIL-Behandlung (5 mg/kg × 4 Tage)

Zellanteile

Tage	RBC	WBC	BM	Milz
3	0,58	0,34	0,59	1,01
5	1,26	0,98	0,75	0,72
7	0,95	0,82	0,91	1,12

Vorläuferzellen des Knochenmarks

Tage	CFU-C		CFU-E		BFU-E + Mix	
	Häuf.	Gesamt	Häuf.	Gesamt	Häuf.	Gesamt
3	1,85	1,10	1,63	1,01	1,61	1,01
5	1,17	0,87	0,86	0,63	1,03	0,80
7	1,81	1,69	0,61	0,57	2,59	2,47

Tage	CFU-C		CFU-E		BFU-E + Mix	
	Häuf.	Gesamt	Häuf.	Gesamt	Häuf.	Gesamt
3	-	-	2,83	3,35	-	-
5	2,41	1,68	0,95	0,63	2,12	1,42
7	-	-	1,74	1,78	-	-

Vorläuferzellen der Milz

[0270] Die D1-FRIL-Daten sind relativ zu Kontrollwerten dargestellt.

[0271] Wie in Tabelle 9 gezeigt, waren die peripheren Blutwerte (rote Blutzellen (RBC) und weiße Blutzellen (WBC)) von D1-FRIL-behandelten Mäusen um das 1,7- bzw. um das 2,9-fache nach 3 Tagen verringert, und gingen bis zum Tag 5 auf Normal zurück. Die Zellularität von Knochenmark (BM) war ebenfalls um das 2,5-fache am Tag 3 vermindert und ging nach 7 Tagen auf Normal zurück. Die Zellularität der Milz war am Tag 5 geringer, am Tag 3 und Tag 7 jedoch normal.

[0272] Wie in Tabelle 9 gezeigt, war die Häufigkeit von Vorläuferzellen im Knochenmark um das 1,6- bis 1,85-fache am Tag 3 leicht erhöht, aber die Gesamtzahl von Vorläuferzellen im Knochenmark blieb unverändert. In der Milz, einem kompensatorischen Organ während eines Hämatopoese-Stress, wurde eine 2,83-fache höhere Häufigkeit und eine 3,35-fache höhere Anzahl von erythroiden Vorläuferzellen in der Milz am Tag 3 festgestellt (siehe Tabelle 9). Die Häufigkeiten und die Gesamtzahl von Vorläuferzellen im Knochenmark erschien am Tag 5 normal zu sein, aber es wurden weniger reife erythroide Vorläufer (CFU-E) und mehr primitive Vorläufer (BFU-E/Mix) am Tag 7 festgestellt. Eine ähnliche Verminderung bei den CFU-E wurde in der Milz am Tag 5 festgestellt; andererseits erhöhten sich die Häufigkeiten und die Gesamtzahlen von Vorläuferzellen an den Tagen 3 bis 7.

BEISPIEL 11

D1-FRIL schützt Mäuse vor einem 5-FU-induzierten Tod in der kritischen ersten Woche

[0273] Es wurde ein Dosierungsschema etabliert, um zu bestimmen, ob FRIL Mäuse vor einem Ableben schützt, das auf eine hämatopoetische Toxizität von Ara-C und Dox zurückzuführen ist. Dieses murine 5-FU-Chemoprotektionsmodell basiert auf Untersuchungen, die zeigen, dass eine Einzeldosis von 5-FU (150 mg/kg) eine > 90% Reduktion der Zellanteile des Knochenmarks bewirkt, aber nur eine beschränkte cytotoxische Wirkung auf Stammzellen hat (Lerner und Harrison, Exp. Hematol. 18: 114–118, 1990). Diese Beobachtung stimmt mit dem Verständnis überein, dass sich Stammzellen im Knochenmark hauptsächlich im Ruhezustand befinden. Die Knochenmarks-Zellularität in diesen Mäusen wurde nach zwei Wochen wieder hergestellt, indem die Vorläuferzellen im Ruhezustand und die reaktiven Stammzellen, die von der Toxizität von 5-FU ver-

schont blieben, rekrutiert wurden. Eine Verabreichung einer zweiten Dosis von 5-FU (auch 150 mg/kg) 3 bis 7 Tage nach der Anfangsdosis brachte solche Stammzellen und Vorläuferzellen zum Absterben, die als Antwort auf die erste Behandlung von 5-FU in die S-Phase rekrutiert wurden (Lerner und Harrison, supra).

[0274] De Haan et al. (Blood 87: 4581–4588, 1996) wendete dieses Modell an, um zu testen, ob eine prophylaktische Behandlung von Mäusen mit hämatopoetischen Regulatoren (pegyliertes SCF + IL11) die Stammzell- und primitive Vorläuferkompartimente expandieren konnte und Mäuse vor einem Ableben durch eine 5-FU-induzierte hämatopoetische Toxizität schützen konnte. Diese Experimente zeigten, dass, obwohl eine SCF + IL11-Vorbehandlung die hämatopoetische Regenerierung, nachdem sie für 4 bis 5 Tage angewendet wurde im Vergleich zu Kontrollen beschleunigen konnte (zwischen ungefähr 11 Tage und 7 Tage 40% Überleben) die SCF + IL11-Cytokin-Vorbehandlungsstrategie Mäuse nicht vor einem Ableben schützte, wenn die zweite Dosis 5-FU in der kritischen ersten Woche, in der die Stammzellen fehlten, verabreicht wurde (de Haan et al., supra).

[0275] In der unten beschriebenen Studie wurde das oben beschriebene Vorbehandlungsdosierungsschema für D1-FRIL (5 mg/kg × 4 Tage) basierend auf dem Erfordernis einer Behandlung von Tieren mit Cytokinen mehrere Tage vor dem Beginn der Chemotherapie ausgewählt und weil D1-FRIL-behandelte Mäuse leichter Dosen tolerierte, die um das 10- bis 100-fache höher waren als die, die bei den Cytokinen verwendet wurden (5 mg/kg). Da FRIL und die Cytokine auf Vorläuferzellen im selben Konzentrationsbereich (ng/ml) wirken, wurde dieses Vorbehandlungsdosierungsschema verwendet, um zu testen, ob D1-FRIL Mäuse vor FU schützen kann, das innerhalb von zwei Intervallen in der ersten Woche verabreicht wurde: 5-FU (150 mg/kg) wurde am Tag 0 injiziert und dann wurde eine zweite Dosis (auch 150 mg/kg) entweder am Tag 3 (d0/3 Dosisintervall) oder Tag 5 (d0/5 Dosisintervall) injiziert. Es wurde kein Überleben im Tag 3-Intervall von de Haan et al. (supra) am Tag 3 festgestellt.

[0276] D1-FRIL wurde aus Dolichos lab lab wie oben in Beispiel 1 beschrieben, aufgereinigt. BALB/c-Mäuse, bei denen das Gewicht angepasst wurde (10 Mäuse/Gruppe), wurden entweder mit 0,2 ml D1-FRIL (500 mg/ml) oder 0,2 ml HBSS täglich für 4 Tage intravenös injiziert. Zwei Stunden nach der Endbehandlung von D1-FRIL wurden die Mäuse mit 5-FU (150 mg/kg) intraperitoneal injiziert. Gruppen von Mäusen erhielten eine zweite Dosis von 5-FU (150 mg/kg) entweder am Tag 3 oder am Tag 5. Es starb keine Maus an einer Einzeldosis 5-FU.

[0277] Wie in der Tabelle 10 gezeigt, verbesserte eine D1-FRIL-Vorbehandlung das Überleben von Mäusen in zwei getrennten Experimenten.

TABELLE 10

Ex.	Mäuse	5-FU-Dosisintervall			
		D0/3		D0/5	
		FRIL	HBSS	FRIL	HBSS
1	Männchen, 16 Wochen	3/10	0/10	N.G.	N.G.
2	Weibchen, 8 Wochen	0/10	0/10	4/10	1/10

[0278] Verbessertes Überleben von Mäusen, die mit FRIL (5 mg/kg × 4 Tage) vor der Durchführung von 5-FU-Dosisintervallen von d0/3 und d0/5 vorbehandelt wurden.

[0279] In dem ersten Experiment überlebten 3 von 10 Mäusen in dem d0/3-Dosisintervall von 5-FU im Vergleich zu der HBSS-Vorbehandlungskontrolle, bei der keine Mäuse überlebten. In dem zweiten Experiment überlebten 4 von 10 Mäusen, die mit D1-FRIL vorbehandelt wurden in dem d0/5-Dosisintervall von 5-FU im Vergleich zu 1 von 10 Mäusen bei den HBSS-vorbehandelten Mäusen.

BEISPIEL 12

Optimierung des Dosierungsschemas eines Mitglieds der FRIL-Familie zum Schutz von Mäusen vor einem 5-FU-induziertem Ableben

[0280] Mitglieder der FRIL-Familie kommen in Leguminosen relativ häufig vor. Zum Beispiel macht D1-FRIL ungefähr 0,02% der Masse von Hyazinthenbohnen aus.

[0281] D1-FRIL wird durch eine Kohlenhydrataffinitätschromatographie, wie in Beispiel 1 beschrieben, aufgereinigt und dessen Reinheit wurde durch SDS-PAGE beurteilt (5 einzelne Banden sind auf einem überladenen Gel sichtbar; siehe [Fig. 37](#)); wurde bezüglich der Masse und Zusammensetzung durch eine Aminosäureanalyse analysiert; und wurde in dem oben beschriebenen Nabelschnurblut-Vorläuferzell-Assay untersucht.

[0282] Das murine 5-FU-Chemoprotektionsmodell (Lerner und Harrison, supra; de Haan, supra) wird verwendet, um das optimale Dosierungsschema von D1-FRIL empirisch abzuleiten, um Mäuse vor einem Ableben zu schützen. D1-FRIL wird an Mäusen über einen 3-Log-Dosisbereich (5 bis 5000 mg/kg) mit verschiedenen Dosierungsschemata, die eine D1-FRIL-Behandlung vor der Chemotherapie (täglich 3 Tage bis 2 Stunden vor der Einleitung der Chemotherapie) und während der Chemotherapie umfassen, intravenös verabreicht.

[0283] Die in diesen Studien verwendeten Mäuse sind weibliche BALB/c-Mäuse, zu Beginn der Experimente 8 bis 10 Wochen alt (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), jeweils mit angepasstem Gewicht für das Experiment, 10 Mäuse pro Gruppe. Organe von Mäusen, die eine Dosis von 5000 mg/kg FRIL erhielten (ohne 5-FU-Behandlung), wurden für die Toxizitätsstudien entnommen.

[0284] Die fünf Dosen D1-FRIL sind 0, 5, 50, 500 und 5000 µg/kg. Die vier Dosierungsschemata von D1-FRIL sind: Stunde -2; Tag -1 und Stunde -2; Tag -2, Tag -1 und Stunde -2; Tag -3, Tag -2, Tag -1 und Stunde -2 vor der 5-FU-Behandlung. Die zwei Aufrechterhaltungskuren finden entweder täglich × 7 Tage (Stunde -2 bis Tag 7) oder an jedem zweiten Tag (Tage 0, 2, 4, 6) statt. Daher wird eine Gruppe Mäuse eine Dosis von D1-FRIL täglich für 7 Tage erhalten, während die zweite Gruppe eine Dosis von D1-FRIL an jedem zweiten Tag für 7 Tage erhält.

[0285] Die 5-FU-Dosisintervalle von 150 mg/kg entsprechen den Dosisintervallen von d0/3, d0/5 und d0/7.

BEISPIEL 13

Ein Mitglied der FRIL-Familie besitzt chemoprotektive Eigenschaften bei weitläufig-verwendeten Zellzyklus-aktiven Chemotherapeutika

[0286] Nach dem Etablieren des optimalen Dosierungsschemas für ein Mitglied der FRIL-Familie wird die Fähigkeit des Mitglieds der FRIL-Familie bestimmt, Mäuse vor einem Ableben durch Cytarabin (Ara-C) und Doxorubicin zu schützen.

[0287] Die anfänglichen Dosierungsschemata von Cytarabin (Ara-C) und Doxorubicin sind wie folgt: Doxorubicin – 14 mg/kg als Einzelbolus, i.p.-Injektion (Grzegorzewski et al., J. Exp. Med. 180: 1047–1057, 1994); Ara-C – 300 mg/kg, i.p.-Injektion nach 0 und 12 Stunden (Paukovits et al., Blood 77: 1313–1319, 1991). Weitere Untersuchungen basieren auf einer gerichteten klinischen Indikation.

BEISPIEL 14

Charakterisierung des hämatopoetischen Status von Mäusen während des optimalen Dosierungsschemas eines Mitglieds der FRIL-Familie zum Schutz von Mäusen gegen ein 5-FU-induziertes Ableben

[0288] Es wurden die peripheren Blutwerte und der Status der hämatopoetischen Vorläuferzellen (Häufigkeit, Gesamtzellzahl und Zellzyklusstatus) in Mäusen während und nach dem Erhalt des optimalen Dosierungsschemas eines Mitglieds der FRIL-Familie charakterisiert.

[0289] Dazu werden Mäuse, die mit einem Dosierungsschema von einem Mitglied der FRIL-Familie ohne 5-FU-Behandlung injiziert wurden, täglich während und eine Woche nach der Behandlung mit dem Mitglied der FRIL-Familie untersucht. Die Mäuse werden anhand der folgenden hämatopoetischen Parameter untersucht: WBC- und RBC-Werte; Knochenmarks- und Milzzellzellularitäten und Vorläuferzellstatus, der hämatopoetische Kolonie-Assays umfasst (StemCell Technologies). Die untersuchten Vorläuferzellen sind myeloid (CFU-C), erythroid (CFU-E) und primitiv, multipotentiell (BFU-E/Mix). Die Häufigkeiten und Gesamtzellzahlen werden bestimmt, sowie der Zellzyklusstatus dieser Zellen, der anhand eines ³H-Thymidin-Suizid-Assays gemessen wurde (Moore et al., Exp. Hematol. 14: 222–229, 1986).

BEISPIEL 15

Analyse der Pharmakologie und Toxikologie von FRIL in Mäusen

[0290] Die Clearance eines Mitglieds der FRIL-Familie von der Zirkulation und dessen Anhäufung im Körper werden durch vorläufige Pharmakokinetiken bestimmt.

[0291] Bei diesen Untersuchungen wird ^{125}I -FRIL in Mäusen injiziert (die Dosierung von FRIL basiert auf Optimierungsergebnisse). Die Beseitigung von FRIL aus dem Blut wird zu den folgenden Zeitpunkten nach der Injektion untersucht: 5 Minuten, 15, Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden, 12 Stunden, 36 Stunden, 48 Stunden. Es werden zwei Mäuse zu jedem Zeitpunkt untersucht. Nach dieser Untersuchung werden die Tiere abgetötet und die Organe werden entnommen und untersucht.

[0292] Die Experimente zur Bestimmung des Dosisbereichs ermitteln die maximale tolerierte Dosis eines Mitglieds der FRIL-Familie bei verschiedenen Verabreichungsrouten (intravenös, intraperitoneal, subkutan und oral). Zur Durchführung dieser Untersuchungen zur Bestimmung des Dosisbereichs werden vier Routen mit vier Dosen verwendet. Die Verabreichungsrouten sind intravenös, intraperitoneal, subkutan, oral. Die höchste Dosis eines Mitglieds der FRIL-Familie beträgt 1 g/kg. Die Dosierung des Mitglieds der FRIL-Familie ist zum Überleben der Mäuse um das Zweifache reduziert. Das Überleben wird 48 Stunden nach der Behandlung gemessen. Es werden andere klinische Untersuchungen durchgeführt, einschließlich der Untersuchung der Verhaltensweise, der Lethargie, der Stimmgebung, Diarrhö. Es werden CBC-Analysen durchgeführt. Die Tiere werden anhand der Nekropsie (d.h. hässlichen Läsionen) ausgewertet. Nach dieser Untersuchung werden die Tiere getötet und die Organe werden entnommen und untersucht.

[0293] Akute Dosistoxizitätsstudien ermöglichen die Identifikation von Zielorganen, die Läsionen nach einer Exposition gegenüber einem Mitglied der FRIL-Familie entwickeln können. Für diese akuten Dosistoxizitätsstudien wird eine Dosis ausgewählt und ein Mitglied der FRIL-Familie wird täglich für 7 Tage injiziert. Die akute Toxizität wird nach 7 Tagen untersucht und die Regenierung von einer akuten Toxizität wird nach 21 Tagen untersucht. Es werden die Blutchemie, Zielorgane, Knochenmark und Blut und andere Gesundheitsindikatoren untersucht.

[0294] Es werden Hypersensitivitätsstudien in Meerschweinchen durchgeführt, um schädliche immunologische Reaktionen zu testen. Dazu werden fünfzehn Meerschweinchen verwendet (5 FRIL, 5 DNCB-Positivkontrollen, 5 Saline-Negativkontrollen). Ein Mitglied der FRIL-Familie wird intradermal mit 0,1 ml injiziert. Die täglichen klinischen Untersuchungen der Rötungsstellen und Ödeme werden mit denen der DNCB-Positivkontrolle verglichen. Die FRIL-Meerschweinchen werden nach 2 Wochen mit 0,05 ml des Mitglieds der FRIL-Familie behandelt und es werden täglich klinische Untersuchungen durchgeführt.

[0295] Es wird eine Bestimmung der Produktion von Anti-FRIL-Familie-Mitglied-Antikörpern der Maus in Mäusen, die einer Behandlung mit einem Mitglied der FRIL-Familie unterzogen wurden, durchgeführt, um die Höhe und die Art der Körperantwort auf das Mitglied der FRIL-Familie zu bestimmen. Dazu wird ein Mitglied der FRIL-Familie an Tosyl-aktivierte magnetische Dynal-Beads gekoppelt. Die mit dem Mitglied der FRIL-Familie beschichteten Beads werden mit Plasma (gepoolt oder einzeln) von einer Maus, die einer Behandlung mit dem Mitglied der FRIL-Familie unterzogen wurde, inkubiert. Indem Kaninchen- und Ratten-Antiserum gegen FRIL als Positivkontrolle verwendet wird, wird das Vorliegen von Antikörpern, die spezifisch für das Mitglied der FRIL-Familie sind, durch SDS-PAGE und Western Blot-Analyse (Meerrettichperoxidase oder Chemilumineszenz) untersucht. Schließlich wird bestimmt, ob Zucker eine Antikörperbindung blockiert (α -D-Mannopyranosid und Negativkontrolle).

BEISPIEL 16

Aufreinigung von Vorläuferzellen unter Verwendung von D1-FRIL-beschichteten magnetischen Beads

[0296] Indem magnetische Beads verwendet wurden, die mit einem nicht darauf beschränkten Mitglied der FRIL-Familie beschichtet wurden (D1-FRIL), ist eine Population von Vorläuferzellen isoliert und charakterisiert worden. Dazu wurden die folgenden Verfahren verwendet.

Herstellung von FRIL-Beads zur Zellisolation

[0297] D1-FRIL wurde aus Dolichos lab lab-Samen, wie in Beispiel 1 beschrieben, aufgereinigt. D1-FRIL

kann auf magnetischen Beads (M-280 Tosyl-aktivierte Dynal-Beads, Lake Success, NY) über Amino- und Sulfhydrylgruppen des Lectins entsprechend den Angaben des Herstellers immobilisiert werden. D1-FRIL kann auch auf magnetischen Beads durch eine Biotin-Streptavidin-Interaktion immobilisiert werden.

[0298] In diesem Beispiel wurde D1-FRIL auf magnetischen Beads mittels einer Biotin-Streptavidin-Interaktion immobilisiert. Eine Biotinylierung von D1-FRIL über primäre Amingruppen (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Lectin, Pierce Chemical Company, Rockford, IL) wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Biotinyliertes D1-FRIL wurde mit magnetischen Streptavidin-markierten Beads (Dynal oder Miltenyi Biotec, Auburn, CA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers inkubiert.

Herstellung von Zellen

[0299] Humanes Nabelschnurblut (CB), peripheres Blut und Knochenmark, das in sterilen Behältern gesammelt wurde, die ein Antikoagulant enthalten (z.B. Heparin, EDTA), wurde verarbeitet, um mononukleare Zellen (mnc) innerhalb einer 6-stündigen Sammlung durch Dichtezentrifugation auf Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) entsprechend den Anweisungen des Herstellers zu isolieren. Mononukleare Zellen, die aus der Interphase geerntet wurden, und Ficoll-Paque wurden gewaschen und in Serum-definiertem Medium resuspendiert (z.B. XVIVO-10, Biowhittaker, Walkerville, MD oder AIM-V, Life Technologies, Rockville, MD).

D1-FRIL-Bead-Zellisolation

[0300] D1-FRIL-beschichtete Beads haben eine kleine mnc-Population gebunden, die im Nabelschnurblut, peripherem Blut und Knochenmark anzutreffen waren. Ein 10-facher Überschuss von D1-FRIL-Beads wurde mit den Zellen inkubiert. Bei Nabelschnurblut, bei dem die D1-FRIL-Beads ungefähr 1% mnc gebunden haben, betrug das Verhältnis von Beads zu den Zellen 1:10 oder eine 10-mal höhere Anzahl von Beads für jede Zielzelle. Das Verhältnis bei anderen FLT3-exprimierenden Zellpopulationen, wie hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellpopulationen, wurde anhand einer Serien-Exposition von Zellen gegenüber frischen D1-FRIL-Beads experimentell bestimmt.

[0301] D1-FRIL-Beads wurden zweimal in einem Serum-definierten Medium vor der Verwendung gewaschen. Ein Aliquot der D1-FRIL-Beads wurde zu 10 ml eines Serumdefinierten Mediums in ein konisches Zentrifugationsröhrchen mit 15 ml (Falcon, Becton-Dickinson, Lincoln, NJ) dazugegeben, vermischt und in einen Magneten (Dynal oder Miltenyi Biotec, abhängig von der Herkunft der magnetischen Beads) für 10 Minuten dazugegeben. Medium wurde mit einer 10 ml-Pipette abgesaugt, ohne dabei die Beads aufzuwühlen, die an den Wänden des Zentrifugationsröhrchens durch die magnetische Ladung von dem Magneten gebunden waren. Nach dem Waschen wurden 0,5 ml des Serum-definierten Mediums zu den Röhrchen dazugegeben, um die Beads von den Wänden auf den Boden des konischen Röhrchens zu waschen. Das Medium wurde zu den Beads in einem kleinen Volumen (< 2 ml) dazugegeben und das Zentrifugationsröhrchen wurde auf einem Schwenkgerät in einem kalten Raum (d.h. bei ungefähr 4°C) für eine Stunde rotiert. Nach der Inkubation wurde Serum-definiertes Medium bis zu einem Endvolumen von 10 ml dazugegeben und das Röhrchen wurde für 10 Minuten in den Magneten gegeben. Das Medium wurde durch Absaugen entfernt, ohne Zellen aufzuwühlen, die an D1-FRIL-Beads an den Wänden des Zentrifugationsröhrchens über die magnetische Ladung gebunden waren. Die Zellen wurden ein zweites Mal gewaschen, indem das konische Röhrchen von dem Magneten entfernt wurde, 10 ml Serum-definiertes Medium dazugegeben wurde, die Zellen gemischt wurden und das konische Röhrchen zurück in den Magneten gegeben wurde. Nach dem Absaugen des Mediums wurde das Endvolumen auf 2 ml eingestellt.

Ablösen von D1-FRIL-Beads von den Zellen

[0302] Bei einigen Anwendungen ist ein Ablösen von D1-FRIL-Beads von den Zellen bevorzugt. Ungefähr die Hälfte der D1-FRIL-Beads lösten sich von CB-mnc nach einer Übernacht-Inkubation auf einem Schwenkgerät in dem kalten Raum ab. Obwohl Bindungsstudien zeigten, dass ein Überschuss von Mannose und α -Methyl- α -D-Mannosid eine Bindung von D1-FRIL an Flt3 verhindert, konnte kein Zucker die festgebundenen D1-FRIL-Beads von CB-mnc freisetzen. Um D1-FRIL-Beads von dieser Subpopulation von Zellen zu entfernen, wurden die Zellen in 100 mM Trehalose (Sigma, St. Louis, MO) für eine Stunde auf einem Schwenkgerät in dem kalten Raum inkubiert.

[0303] Es sollte angemerkt werden, dass, da Miltenyi-Beads (ungefähr 50 nm) im Vergleich zu Dynal-Beads (ungefähr 10 μ m) sehr klein sind, es den Beads ermöglicht wurde, an die aufgereinigten Vorläuferzellen ge-

bunden zu bleiben, wenn Miltenyi-Beads zur Aufreinigung von D1-FRIL-Bindungsvorläuferzellen verwendet wurden.

Rezeptor-Tyrosinkinase-Genexpression

[0304] Eine Rezeptor-Tyrosinkinase-Genexpression wurde durch RT-PCR charakterisiert. Unter Verwendung dieser Verfahren wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

Funktionelle Eigenschaften von D1-FRIL-Bead-selektionierte CB-mnc

[0305] Die Vorläuferkapazität von D1-FRIL-selektierten CB-mnc wurde in einem Methylcellulose-Kolonie-Assay unter Bedingungen getestet, bei denen eine Proliferation und Differenzierung unter den hämatopoetischen oder endothelialen Zelllinien (wie oben beschrieben) gefördert wird. Tabelle 11 zeigt die Anzahl von hämatopoetischen Kolonien (myeloid, erythroid und gemischt) und endothelialen Kolonien (andere), die sich nach einer Kultur von nicht-selektierten Zellen (CB-mnc), D1-FRIL-selektierten Zellen (D1-FRIL⁺) und CB-mnc, die nicht an D1-FRIL-Beads banden (D1-FRIL⁻), bildeten.

TABELLE 11

Antwort von D1-FRIL-selektierten Zellen auf hämatopoetische und endotheliale Stimulatoren

Stimulator		myeloid	erythroid	gemischt	andere	insgesamt
+ CSFs	CB mnc	1	3	2	0	6
	D1-FRIL⁺	14	10	4	0	28
	D1-FIL⁻	1	1	2	0	4
+ VEGF	CB mnc	0	0	0	2	2
	D1-FRIL⁺	0	0	0	19	19
	D1-FIL⁻	0	0	0	5	5

[0306] Mononukleare Zellen von Nabelschnurblut wurden mittels Ficoll-Paque isoliert, Bead-selektiert und in MethoCult[®], StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada, ausplattiert.

[0307] Wie in Tabelle 11 gezeigt, erhöhte eine D1-FRIL-Selektion die Anzahl von hämatopoetischen Kolonien (stimuliert mit Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSFs)) um das 14-fache bei myeloiden Kolonien, 3,3- bis 10-fache bei erythroiden Kolonien (CB mnc- bzw. D1-FRIL-Zellen) und um das 2-fache bei gemischten Kolonien. Ähnliche Spiegel einer D1-FRIL-Bead-Anreicherung wurde bei endothelialen Kolonien beobachtet (stimuliert mit vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)): 9,5-fache über CB-mnc und 3,8-fache für D1-FRIL⁻-Zellen.

Phänotypische Zelloberflächeneigenschaften von D1-FRIL-Bead-selektierten CB mnc

[0308] Die phänotypischen Zelloberflächeneigenschaften von D1-FRIL-Bead-selektierten CB mnc wurden durch Durchflusszytometrie charakterisiert. Tabelle 12 zeigt die Phänotypen der drei CB-Zellpopulationen (anhand des Prozentsatzes von Zellen, die den angegebenen Zelloberflächenphänotypmarker exprimieren): (1) Zellen, die nicht durch D1-FRIL-Beads selektiert werden (D1-FRIL⁻); (2) Zellen, die sich von D1-FRIL-Beads nach einer Übernacht-Inkubation im Kälteraum auf einem Schwenkgerät abgelöst haben (D1-FRIL⁺) und (3) Zellen, die durch D1-FRIL-Beads nach einer Übernacht-Inkubation zurückgehalten wurden (D1-FRIL⁺⁺). Die zwei Zellpopulationen der D1-FRIL-Bindung wurden getrennt analysiert, um zu sehen, ob die Festigkeit der Bindung (Affinität) mit der Art der ausgewählten Zellen zusammenhing. Isotypische Kontrollspiegel wurden auf 2% eingestellt; alle Werte von 2% zeigten keine Reaktivität mit Testantikörpern.

TABELLE 12

Durchflusscytometrische Analyse von D1-FRIL-selektionierten CB mnc

Antigen		Zelltyp	D1-FRIL ⁻ (%)	D1-FRIL ⁺ (%)	D1-FRIL ⁺⁺ (%)
CD3	Reife T		26	35	6
CD11b	Mac-1, CR3		19	35	67
CD11c	LeuCAMc		10	22	32
CD13	Pan myeloid, CFU-GM		5	<2	<2
CD19	Pan B		4	5	12
CD32	IgG Fcγ-R mit niedriger Affinität		5	19	26
CD33	Myeloide Vorläuferzellen		3	2	8
CD34	Pan-Vorläuferzellen		<2	<2	<2
CD38	Aktivierte T		88	96	93
CD42a	Plättchen-gpIX		5	2	7
CD69	Frühaktivierung ag (EA-1)		6	8	14
CDw90	Thy-1, Vorläuferzelluntergruppe		8	14	13
CD117	c-Kit, Vorläuferzellen		4	2	2

[0309] Wie in Tabelle 12 gezeigt, haben D1-FRIL-Beads keine CB mnc eingefangen, die CD34 exprimieren, dem Kennzeichnungsmarker von hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen. Diese Beobachtung war unerwartet, da D1-FRIL-selektionierte Zellen Vorläuferzellen anreichern (siehe Tabelle 11). Obwohl CB CD34⁺-Zellen FLT3 einheitlich exprimieren, exprimieren lediglich 70% von Flt3⁺-CB mnc auch CD34 (Rappold et al., Blood 90: 111–125, 1997). Daher exprimierten 30% CB mnc den Phänotyp von DC34-Flt3⁺. D1-FRIL-Beads schienen diese letzte Population von Zellen abzufangen.

[0310] Zellen, welche die dendritische Zellmarker (DC), CD11b und CD11c exprimieren, waren ungefähr um das 2-fache in der D1-FRIL⁺-Zellpopulation angereichert und um das mehr als 3-fache in der D1-FRIL⁺⁺-Zellpopulation (Tabelle 12). Diese Beobachtung stimmt mit Berichten überein, das Flt3 bei der dendritischen Zellproliferation und Reifung in Mäusen (Pulendran et al., J. Immunol. 159: 2222–2231, 1997) und Menschen (Miller et al., Blood 93: 96–106, 1999) beteiligt ist. Die seltene hämatopoetische dendritische Zellpopulation ist zur Induktion einer Tumorrepression und für die Behandlung von AIDS verwendbar.

[0311] Unterschiede bei den Zelloberflächenphänotypen wurde bei den D1-FRIL⁺- und D1-FRIL⁺⁺-CB-Zellen festgestellt (siehe Tabelle 11). Der Prozentsatz von CD3T-Zellen erniedrigte sich von 35% für D1-FRIL⁺-Zellen um 6% für D1-FRIL⁺⁺-Zellen. Umgekehrt erhöhte sich der Prozentsatz von CD11b⁺-Zellen und CD11c⁺-Zellen von 35% auf 67% für D1-FRIL⁺- bzw. von 22% auf 32% für D1-FRIL⁺⁺-Zellpopulationen.

[0312] Zellen, welche die D1-FRIL-Beads nach einer Übernacht-Inkubation auf einem Schwenkgerät in dem Kälteraum zurückhielten (D1-FRIL⁺⁺-Zellen), lagen als einzelne Zellen oder als Klumpen von Bead-gebundenen Zellen vor. Diese Klumpen konnten nicht durch mechanische Mittel oder durch Elution mit kompetitierenden Zuckern, wie Mannose oder Mannose-Derivaten, aufgelöst werden (Daten nicht gezeigt). In Studien zur Charakterisierung der Kohlenhydratbindungseigenschaften von D1-FRIL, zeigte α,α-Trehalose eine 3,6-fache höhere Wirksamkeit als Mannose und eine 1,6- bis 2,1-fache höhere Wirksamkeit als α-Methyl-α-D-Mannosid-Derivate, die getestet wurden (Mo et al., Glycobiology 9: 173–179, 1999). Die Inkubation von verklumpten D1-FRIL-Beads-gebundenen Zellen mit 100 mM Trehalose löste effizient die verklumpten Zellen auf und entfernte die meisten D1-FRIL-Beads von Zellen.

[0313] Zwei Populationen von Trehalose-gelösten D1-FRIL⁺⁺-Zellen wurden durch Durchflusscytometrie analysiert: Zellen, die nicht länger Beads banden (D1-FRIL⁺⁺) und Zellen, die noch Beads nach einer Inkubation mit Trehalose zurückhielten (D1-FRIL⁺⁺⁺). Die Ergebnisse von einem Experiment sind in Tabelle 13 gezeigt.

TABELLE 13

Durchflusscytometrische Analyse von D1-FRIL-selektionierten CB mnc nach einer Exposition gegenüber Trehalose

Antigen		Zelltyp	D1-FRIL ⁺⁺ (%)	D1-FRIL ⁺⁺⁺ (%)
CD3	Reife T		6	3
CD11b	Mac-1, CR3		52	76
CD11c	LeuCAMc		16	43
CD13	Pan myeloid, CFU-GM		72	46
CD19	Pan B		5	9
CD32	IgG Fc- γ mit niedriger Affinität		43	19
CD33	Myeloide Vorläuferzellen		56	15
CD34	Pan-Vorläuferzellen		2	2
CD117	c-Kit, Vorläuferzellen		2	12
CD135	Flt3, Vorläuferzellen		2	5

[0314] Der Unterschied bei den Zelloberflächenphänotypen zwischen D1-FRIL⁺⁺-Zellen und D1-FRIL⁺⁺⁺-Zellen in Tabelle 13 war höher als der, der für D1-FRIL⁺-Zellen und D1-FRIL⁺⁺-Zellen in Tabelle 12 beobachtet wurde. In Tabelle 13 sank der Prozentsatz von CD3-, CD13-, CD32- und CD33-Zellen um das 1,6- bis 3,7-fache in D1-FRIL⁺⁺⁺-Zellen, im Vergleich zu den D1-FRIL⁺⁺-Zellen ab. Umgekehrt erhöhte sich der Prozentsatz von CD11b-, CD11c-, CD19-, CD117- und CD135-Zellen um das 1,5- bis 6-fache in D1-FRIL⁺⁺⁺-Zellen im Vergleich zu den D1-FRIL⁺⁺-Zellen. Wiederum wurde kein CD34 in einer der Zellpopulationen festgestellt.

[0315] Der Anstieg bei dem Prozentsatz von Zellen, die CD117 und CD135 exprimieren, zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren, die für die hämatopoetische Stammzell- und Vorläuferfunktion essentiell sind (Lyman und Jacobson, Blood 91: 1101–1134, 1998), legen nahe, dass die Affinität einer D1-FRIL-Bead-Bindung von Zellen dem primitiven Status der Zellen entsprechen könnte. Die hier beschriebenen Untersuchungen, welche die Kohlenhydratbindungseigenschaften von D1-FRIL charakterisieren, unterstützten diese Vermutung. D1-FRIL besitzt weder eine verlängerte Kohlenhydrat-kombinierende Bindungsstelle noch eine hydrophobe Bindungsstelle, die benachbart dazu liegt (Mo et al., Glycobiology 9: 173–179, 1999). D1-FRIL bindet meist fest an eine Trimannosylstruktur, die die Basis für eine N-gebundene Glykosylierung in Säugetieren darstellt. Daher kann D1-FRIL Zellen binden, die einer geringeren Glykosylierung ausgesetzt waren, was mit primitiveren Zellen konsistent ist. Diese Eigenschaft der D1-FRIL-Bindung kann ein spezifisches Verfahren darstellen, um primitive Zellen zu isolieren, was gegenwärtig nicht mit Antikörpern gegen CD34 möglich ist. Daher bindet D1-FRIL den normal glykosylierten FLT3-Rezeptor fester als der FLT3-Ligand den normal glykosylierten FLT3 bindet. D1-FRIL bindet den normal glykosylierten FLT3-Rezeptor fester als der typische Antikörper dessen spezifischen Liganden bindet.

Rezeptor-Tyrosinkinase-Genexpression in D1-FRIL-selektionierten CB-Zellen

[0316] Die Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren und -Markern erhöht sich, wenn pluripotente hämatopoetische Stammzellen proliferieren und differenzieren. Die Anzahl von funktionellen Rezeptoren auf den meisten primitiven Zellen beträgt vermutlich weniger als 10. Die Nachweisspiegel für eine Durchflusscytometrie liegen vermutlich im Bereich von mehreren 100 Zelloberflächenmolekülen. Daher kann eine Analyse von primitiven Zellpopulationen nicht anhand einer Durchflusscytometrie analysiert werden.

[0317] Das Vorliegen oder Fehlen von funktionellen Tyrosinkinase-Rezeptoren auf primitiven Zellen wurde weiter durch RT-PCR charakterisiert. Die Expression von FLT3-, Kit-, Fms-, Flk1-, Flt1- und Flt4-mRNA wurde für CB mnc, CD34-selektionierte Zellen und D1-FRIL-selektionierte Zellen bestimmt. Bei CB mnc waren die PCR-Produkte für die Rezeptoren entweder schwach oder nicht detektierbar. Die Genexpressionsmuster bei Zellen, die durch CD34-Beads oder D1-FRIL-Beads selektiert wurden, waren dieselben; alle Tyrosinkinase-Rezeptoren zeigten stärkere PCR-Signale. Diese Daten legen nahe, dass Rezeptoren, die mit Stammzellen (Flt3 und Kit) und primitiven endothelialen Zellen (Flk1, Flt1 und Flt4) assoziiert sind, auch in D1-FRIL-selektionierten Zellen detektiert werden.

BEISPIEL 17

Verwendung von Beads, die mit einem Mitglied der FRIL-Familie beschichtet sind, um CD34⁺ primitive Stammzellen zu isolieren

[0318] Eine seltene humane Stammzellpopulation mit dem Phänotyp CD34⁺CD38⁻Lin wurde anhand dessen Fähigkeit identifiziert, eine Multilinienvorplanzung in NOD/SCID-Mäusen zu etablieren (Bhatia et al., Nat. Med. 4: 1038–1045, 1998). Diese repopulierenden Zellen führen zu Stammzellen, die den CD34-Kennzeichnungsmarker exprimieren. Das Isolieren von CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Zellen erfolgt durch die laborintensiven Verfahren einer Negativselektion, die die Verwendung von immunomagnetischen Beads und Durchflusszytometrie umfassen, um Zellen zu depletieren, die CD34, CD38 und Linienmarker exprimieren. Eine schnelle, effiziente, positive Selektion von CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Zellen erfolgt vorzugsweise für klinische Verwendungen. Jedoch ist durch das Fehlen der hochexprimierten CD34-Marker und die niedrige Anzahl funktioneller Rezeptoren auf dieser seltenen Population von Zellen, die Verwendung von Antikörpern zur Zellisolation nicht möglich.

[0319] FRIL, das an magnetische Beads gebunden ist, wird in einem spezifischen Verfahren verwendet, um die seltene CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Zellpopulation durch Bindung von primitiven Zellen, die diesen Phänotyp exprimieren, zu isolieren. Die Isolation von CD34⁺CD38⁻Lin⁻ wird durch eine einzelstufige Zellisolation erreicht. Jedoch wird eine optimale Isolation von CD34⁺CD38⁻Lin⁻-Zellen verbessert, indem zuerst nicht benötigte Zellen durch immunomagnetische Beads, die an CD11b, CD11c und/oder CD38 binden, negativ selektioniert werden, da FRIL-Beads auch Zellen erkennen, die CD11b, CD11c und CD38 exprimieren.

BEISPIEL 18

Verwendung von Beads, die mit einem Mitglied der FRIL-Familie beschichtet sind, um normale Stammzellen von Patienten mit Leukämie zu isolieren

[0320] Eine Mehrzahl der Leukämien exprimieren den Phänotyp CD34⁺Flt3⁺ (Carow et al., Blood 87: 1089–1096, 1996). Daher können Verfahren, die auf einer CD34-Expression basieren, nicht normale Stammzellen und Vorläufer von Leukämiezellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patienten unterscheiden.

[0321] FRIL interagiert nicht mit zwei Leukämie-Zelllinien, die mit dem CD34⁺Flt3⁺-Phänotyp (KG1-A und ML-1) getestet wurden. FRIL bewirkt weder ein Wachstum dieser Leukämie-Zelllinien noch fangen FRIL-Beads eine nennenswerte Anzahl von Zellen ein (Daten nicht gezeigt). Da FRIL-Beads normale Vorläuferzellen mit dem Phänotyp CD34⁺Flt3⁺ selektionieren, stellen FRIL-Beads ein spezifisches Verfahren bereit, das zwischen normalen und Leukämiezellen unterscheidet.

[0322] Ein Mitglied der FRIL-Familie, das an magnetische Beads gebunden ist, wird verwendet, um normale hämatopoetische Stammzellen und Vorläufer von dem Knochenmark und peripheren Blut von Leukämiepatienten zu isolieren. Dies wird erreicht, indem ein Verfahren ähnlich dem der Leukopherese verwendet wird, bei dem Blut über eine Vorrichtung durchlaufen gelassen wird, die die Zellen von Interesse zurückhält. In diesem Beispiel binden FRIL-Beads normale CD34⁺Flt3⁺-Zellen. Da FRIL auch mit Flt3-exprimierenden CD11b- und CD11c-Zellen vor einer Exposition und Entfernen der Zellen interagiert, können immunomagnetische Beads, die an CD11b und/oder CD11c binden (d.h. negative Selektion) eine Anreicherung von primitiven Zellen ermöglichen.

BEISPIEL 19

Verwendung von FRIL-Beads zur Isolation von dendritischen Vorläufern und reifen Zellen von normalen Individuen

[0323] Dendritische Zellen (DC) sind Immunzellen, die Antigene einfangen und T-Zell-vermittelte Immunantworten einleiten (Banchereau und Steinman, Nature 392: 245–252, 1998). DC wirken als erste Verteidigungslinien in der Haut, Darm und den lymphoiden Organen. Antigene auf den DC können naive und T-Zellen im Ruhezustand aktivieren und eine kleine Anzahl von DC, die mit niedrigen Dosierungen von Antigenen gepulst wurden, stimulieren starke T-Zellantworten. Unter bestimmten Umständen induzieren DC auch eine T-Zelltoleranz. Daher haben die einzigartigen Eigenschaften von DC ein großes Interesse geweckt, um diese Zellen zur Behandlung von Krebs und AIDS zu verwenden. DC leiten sich von CD34⁺-Vorläufern im Knochenmark von Menschen ab. Die Cytokine GM-CSF, TNF- α und Flt3-Ligand (FL) beeinflussen eine DC-Entwicklung (Banchereau und Steinman, supra; Pulendran et al., J. Immunol. 159: 2222–2231, 1997). Eine Injektion von

FLT3-Ligand in Mäusen erhöht die Anzahl von DC in drastischer Weise (Pulendran et al., supra).

[0324] FRIL interagiert mit dem Flt3-Rezeptor auf DC und FRIL-Beads fangen Zellen mit dem dendritischen Phänotyp von CD11b und CD11c ein. Die Selektion von dendritischen Zellen mit FRIL-Beads von humanem Knochenmark, peripheren Blut oder Nabelschnurblut ermöglicht die effiziente und wirksame Isolation von DC zur klinischen Verwendung.

BEISPIEL 20

Verwendung von FRIL-Beads zur Isolation von endothelialen Stammzellen und Vorläufern

[0325] Endotheliale Stammzellen und Vorläuferzellen führen zu Zellen, die Blutgefäße in einem Prozess, der als Angiogenese bezeichnet wird, bilden. Während Schlaganfällen und Herzinfarkten werden neue Blutgefäße benötigt, um den Schaden zu reparieren. Eine Aktivierung von endothelialen Stammzellen und Vorläuferzellen zur Herstellung von reiferen Zellen wird durch die Cytokine vermittelt, die die Flkl/KDR-, Flt1- und Flt4-Tyrosinkinaserzeptoren aktivieren. Flt3 wird auf sehr primitiven endothelialen Vorläuferzellen exprimiert. FRIL-Beads werden verwendet, um eine Population von Zellen aus Nabelschnurblut einzufangen, die sämtliche dieser Rezeptoren exprimieren.

BEISPIEL 21

Verwendung von Mitgliedern der FRIL-Familie und Lectinen die nicht Mitglieder der FRIL-Familie sind zur Änderung der Signaltransduktion und anderen zellulären Pathways

[0326] Arzneimittel, die entworfen wurden, um Signaltransduktionswege zu verändern, werden benötigt, um spezifisch Zielzellen zu unterscheiden. FRIL wird als ein Zielvehikel verwendet, um kleine Moleküle an Flt3-exprimierenden Zellen, wie Stammzellen, Vorläufer und dendritischen Zellen abzugeben. FRIL hat mehrere Vorteile bezüglich der Arzneimittelabgabe: 1) FRIL ist spezifisch für Flt3; 2) FRIL ist stabil im Cytoplasma; 3) FRIL ist in der Lage eine Konjugation mit kleinen Molekülen einzugehen; 4) FRIL kann in einer Dosis-abhängigen Weise abgegeben werden und 5) FRIL besitzt eine Spezifität für überlappende Signaltransduktionswege.

[0327] Andere Leguminosen- oder von der Zwiebel abgeleitete Lectine können auch kleine Molekulararzneimittel an spezifische Zellpopulationen abgeben. Zum Beispiel binden sowohl die Lectine PHA als auch ConA an den CD3-T-Zellrezeptorkomplex und den FC-gamma-Rezeptor (CD32) (Leca et al., Scand. J. Immunol. 23: 535–544, 1986); UDA bindet die V β -Domäne des T-Zellrezeptors (Galelli et al., J. Immunol. 151: 1821–1831, 1993).

[0328] Standardverfahren zur Konjugation werden verwendet, um kleine Moleküle, Oligos oder Enzyme an Pflanzenlectine zu binden.

BEISPIEL 22

Aufreinigung und Klonierung von YamFRIL aus *Sphenostylis stenocarpa*

[0329] Trockensamen von der Yamswurzelbohne (*Sphenostylis stenocarpa*) wurden in einer Kaffeemühle zerrieben und das Pulver wurde mit 5 Volumen 10 mM Na-Acetatpuffer, pH 5,2, der 1 mM CaCl₂ enthält, für eine Stunde für 4°C extrahiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand mit Tris-HCl, pH 8,0 neutralisiert.

[0330] Eine YamFril-Aufreinigung wurde über und durch Absorption an eine Ovalbumin-Gel-Affinitätsäule (Sigma) erreicht und wurde mit 200 mM Trehalose eluiert.

[0331] Das resultierende Protein wurde in 2 Polypeptide fraktioniert, die folgende N-terminale Aminosäuresequenzen aufweisen.

Beta-Bande: AQSVSFTFTKFDSDQ (SEQ ID NO: 9)

Alpha-Bande: AASNNVVAVEFDTXPN (SEQ ID NO: 10)

[0332] Eine reverse Transkriptase-PCR wurde mit Gesamt-RNA durchgeführt, die von dem International Institute of Tropical Agriculture (Ibadan, Oyo State, Nigeria) unter Verwendung von degenerierten Primern durch-

geführt wurde, die auf den alpha- und beta-N-Terminussequenzen basieren (d.h. SEQ ID NO: 10 bzw. SEQ ID NO: 9).

[0333] Es wurde eine 3'-RACE-PCR mit Gesamt- und polyA+-RNA unter Verwendung von Gen-spezifischen Primern mit einem Anker-Primer durchgeführt.

[0334] Es wurden partielle cDNA-Klone erhalten und die folgenden Sequenzen wurden abgeleitet.

YamFrl: partielle mRNA-Sequenz

ACGAAGTTCGACAGCGACCAAAAGGATCTTATGTTCCAAGGTCATACCATTTCTAGCAGC
AATGTCATACAACCTACCAAGTTAGACAGTAATGGAAACCCTGTGAGTACCAGTGTGGGA
AGAGTGTTATACTCTGCACCATTTGCGCCTTTGGGAAAGCTCTACAGTAGTGTCAACCTTT
GAGACCACTTTCACCTTTCAAATCTCAACACCTTACACTAGTCCTCCTGGTGATGGGCTC
GCCTTCTTTCCTTGCACCATATGACACTGTTCATCCCTCCAAATCTTGCTGGCAATCTTCTT
GGACTCTTTCTTAACCTTAAATGCTTTAAGAACTCCACCACCAGTAAAGAAACCACTATT
GATGTCAATGCTGCATCTAACAACGTTGTTGCCGTTGAATTTGACACCTACCCTAACGAC
AATATTGGTGATCCAAGATACAAACACATTGGAATCGATGTCAACTCTATCAGGTCCAAG
GCAACTGTTGCCGTGGGACTGGCAAAATGGGAAAACAGCCACTGCACACATCAGCTATAAC
TCTGCCCTCTAAAAGACTATCTGTTACTACTTTTATCTCTGGGGGTAAAGCTGTGAGTCTT
TCCCATGACGTTGAGCTCACTCAAGTGCTTCTCAATGGATTAGAGTAGGGTTCTCTGCT
TCAACAGGATTAGAGAAA (SEQ ID NO: 7)

YamFrl: abgeleitete Aminosäuresequenz

AQSVSFTFTKFDSDQKDLMFQGHITSSSNVIQLTKLDSNGNPFVSTSVGRVLYSAPLRLWE
SSTVVSTFETFTFQISTPYTSPPGDGLAFFLAPYDTVIPPNSAGNLLGLFPNLNALRNS
TTSKETIDVNAASNNVVAVEFDTPNDNIGDPRYKHIGIDVNSIRSKATVAWDWQNGKT
ATAHISYNSASKRLSVTTFYPGGKAVSLSHDVELTQVLPQWIRVGFSASTGLEK (SEQ ID
NO: 8)

Patentansprüche

1. Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die ein FRIL-Protein enthält, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 6 umfasst, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Zustands, der durch eine hämatopoietische Vorläuferzell-depletierende Aktivität von einer radiotherapeutischen oder einer chemotherapeutischen Behandlung oder einer Kombination von einer radiotherapeutischen oder einer chemotherapeutischen Behandlung charakterisiert ist, wobei die therapeutische wirksame Menge der Zusammensetzung die hämatopoietische Vorläuferzell-depletierende Aktivität der therapeutischen Behandlung in dem Patienten lindert oder reduziert, und wobei das Arzneimittel vor der radiotherapeutischen oder chemotherapeutischen Behandlung verabreicht wird, wobei das Arzneimittel ungefähr 5 Tage bis ungefähr 2 Stunden vor der therapeutischen Behandlung verabreicht wird und täglich verabreicht wird.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das FRIL-Mitglied durch die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 5 kodiert wird.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die hämatopoietischen Vorläuferzellen in dem Patienten, der mit der therapeutischen Behandlung behandelt wird, entweder durch Abtöten der Vorläuferzellen oder indem die Vorläuferzellen dazu induziert werden, eine irreversible Differenzierung durchzumachen, depletiert sind.

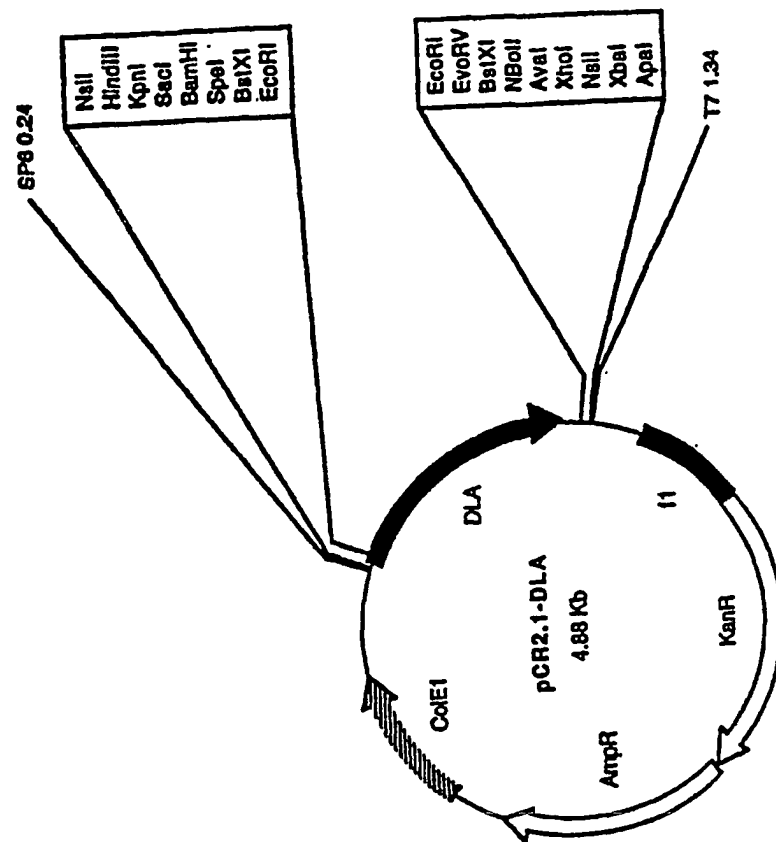
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Patient ein Mensch ist.

5. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der Patient Krebs hat.

6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Chemotherapeutikum ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Cytarabin, Doxorubicin und 5-Fluoruracil.

Es folgen 41 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1

```

1  AQSLSFSTKFDPNQEDLIFQGTATS.....KLD SAGNPVSSSAGRV 42
   |||||
1  AQSLSFSTKFDPNQEDLIFQGHATSTNNVLQVTKLD SAGNPVSSSAGRV 50
   |||||
43  LYSAPLR LWEDSAVLTSFDPTIY..IFTN YTSRIADGLA.FIAPPDVIS 89
   |||||
51  LYSAPLR LWEDSAVLTSFDTIINFEISTPYTSRIADGLAFFIAPPDVIS 100
   |||||
90  YHGGFLGLFFNAAESG..... 105
   |||||
101 YHGGFLGLFFNPANTLNNSSTSEN 123
   |||||

```

```

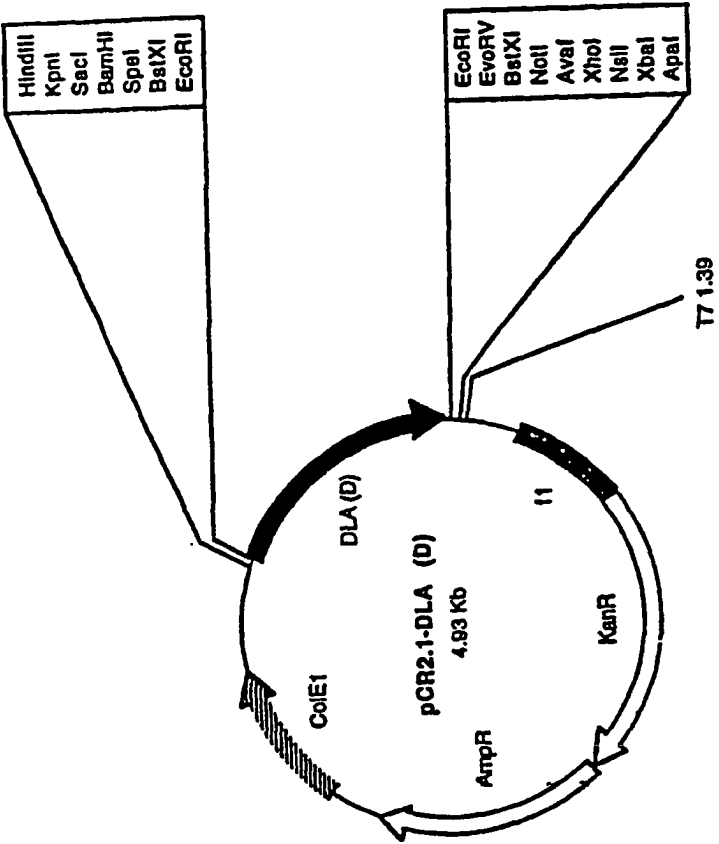
1 1 . . . . . IAESNVAVEFDTYLNPDYGDPNYIHIGIDVNSIRSKVTASWDW 45
  |.|||||
1 QTTTKAASSNVAVEEDT.YLNPDYGDPNYIHIGIDVNSIRSKVTAKWDW 49

46 QNGKIATAHISYNSVSKRLSVTTYPPGRGKPATSYDIELHTVLPWVRVG 95
  |||||
50 QNGKIATAHISYNSVSKRLSVTSYYAGSKPATLSYDIELHTVLPWVRVG 99

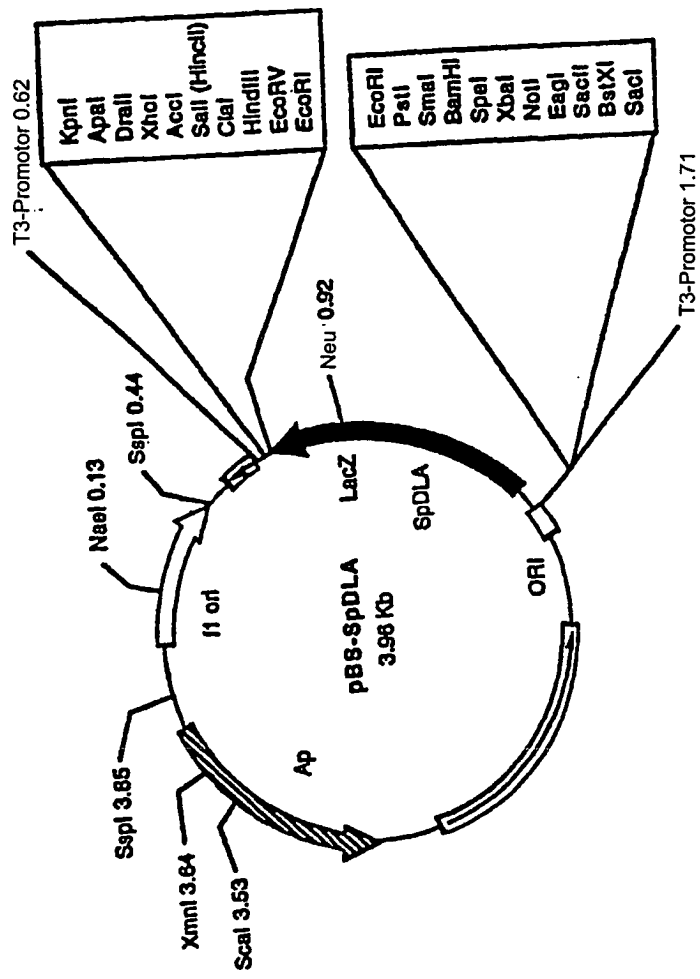
96 LSASTGQNIERNTVHWSFTSSLWNTNVAKVGVASISG..... 132
  |||||:|||||
100 LSASTGQDKERNTVHWSFTSSLWNTNVAKKENENKYTRGVL**YMCIND 149

```

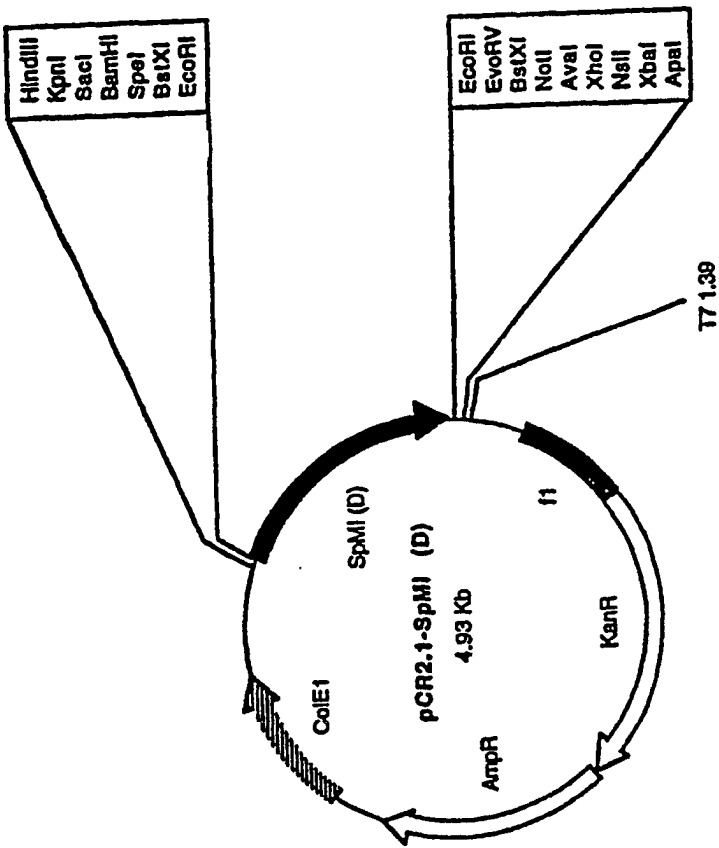
FIGUR 2



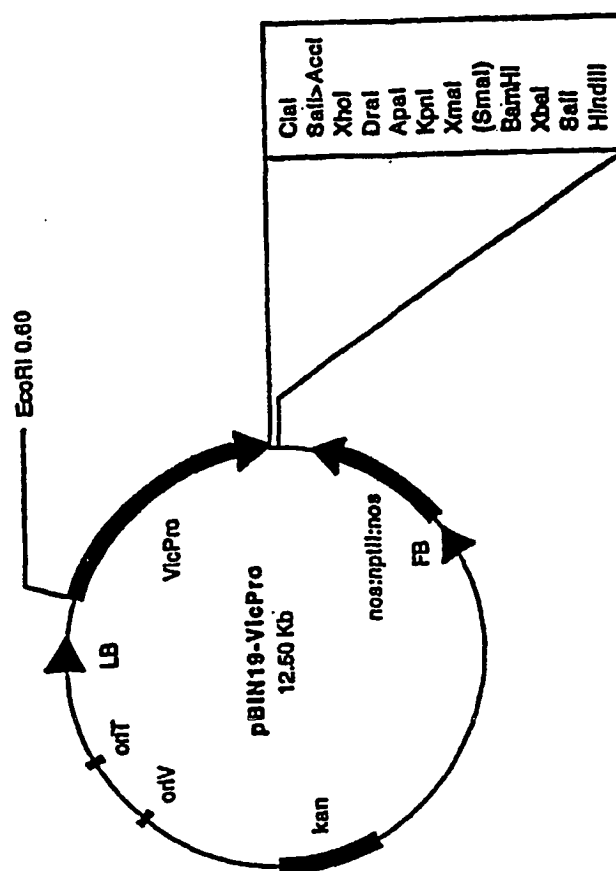
FIGUR 3



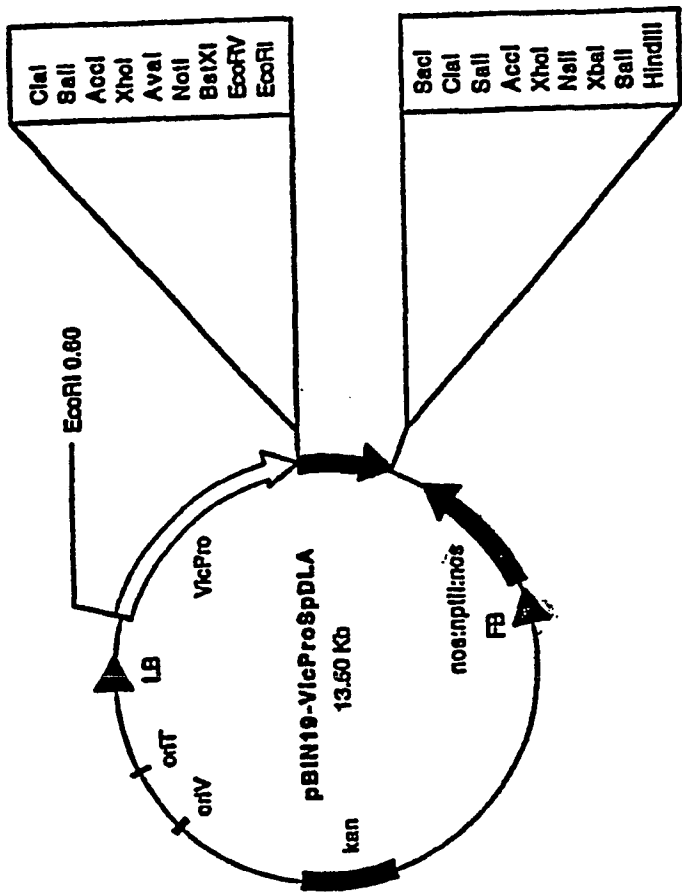
FIGUR 4



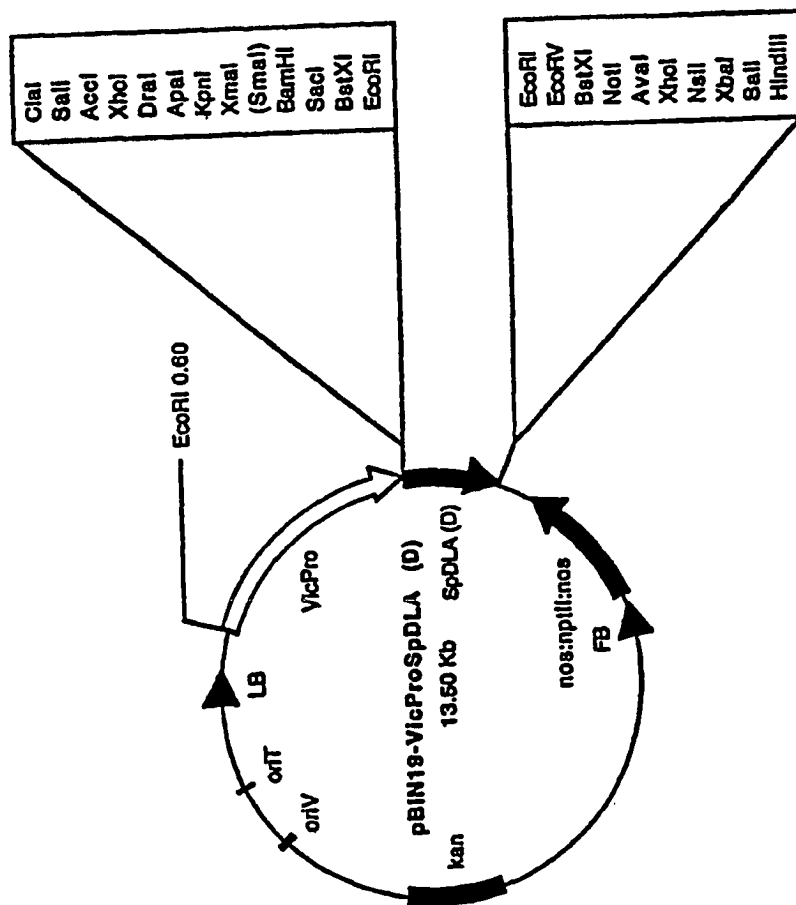
FIGUR 5



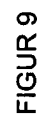
FIGUR 6

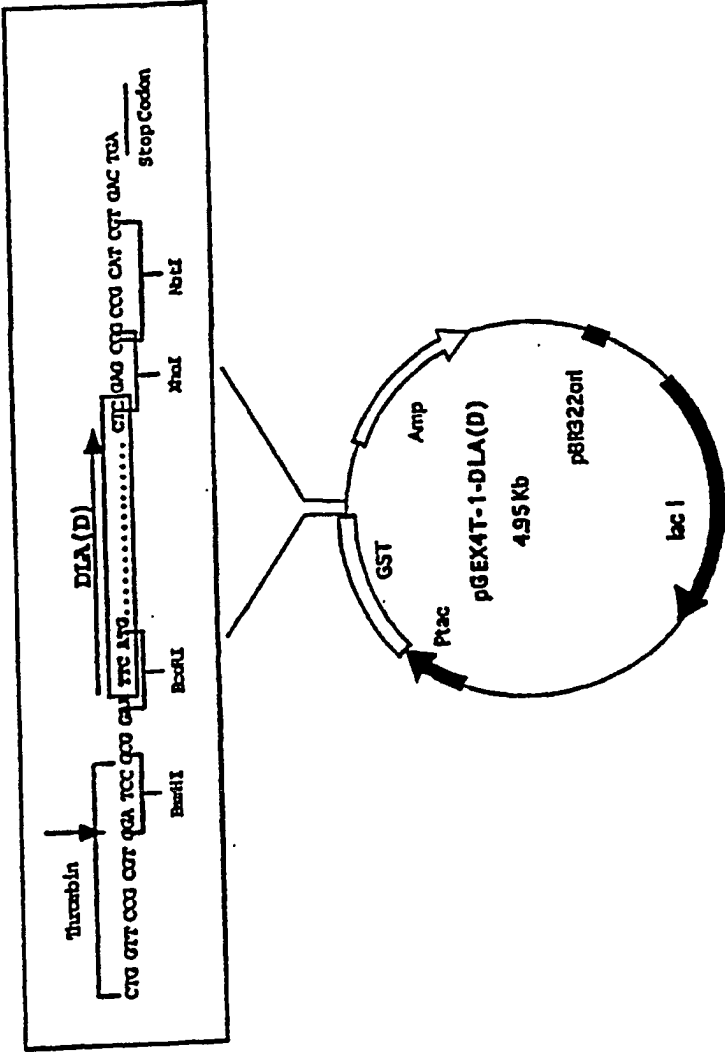


FIGUR 7

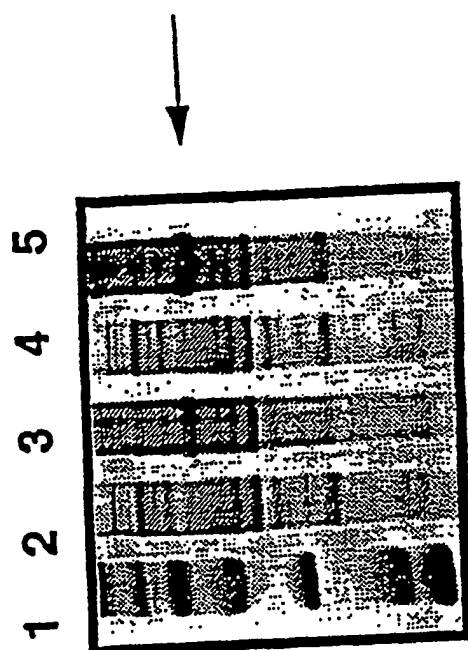


FIGUR 8

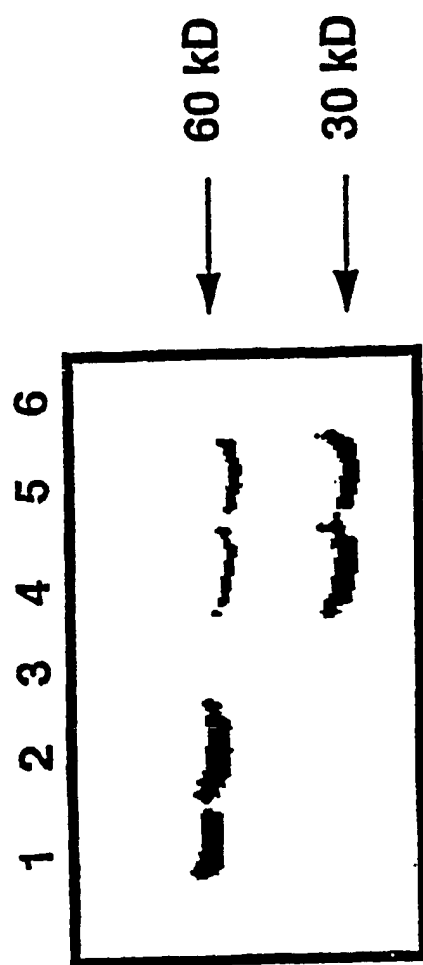




FIGUR 10

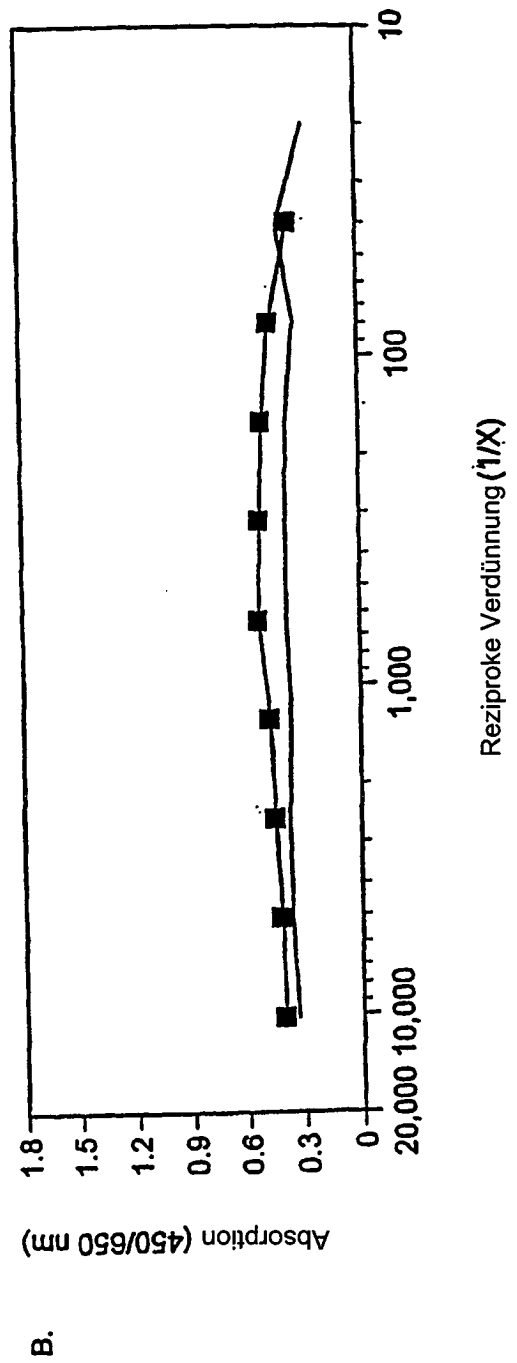
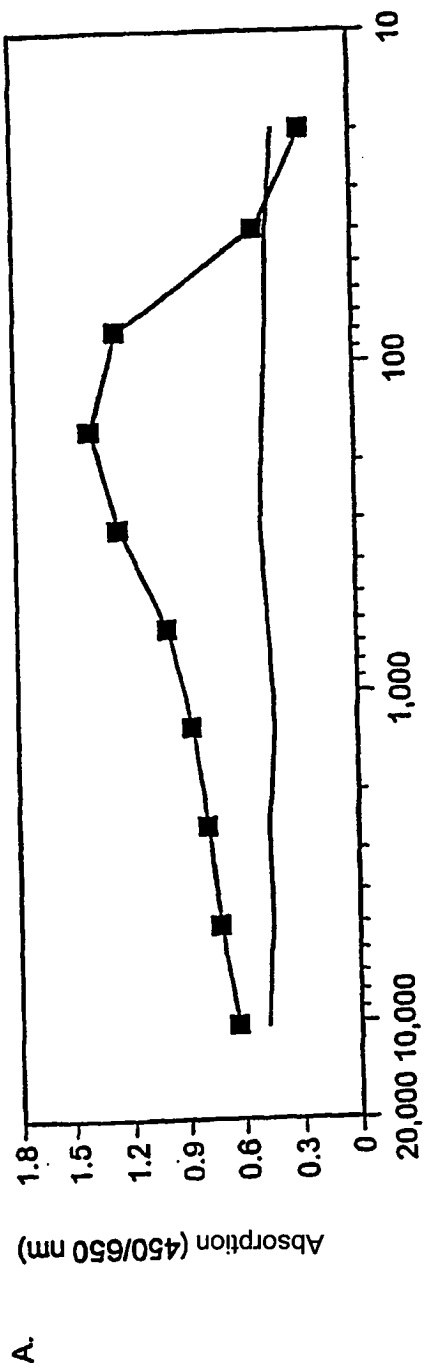


FIGUR 11

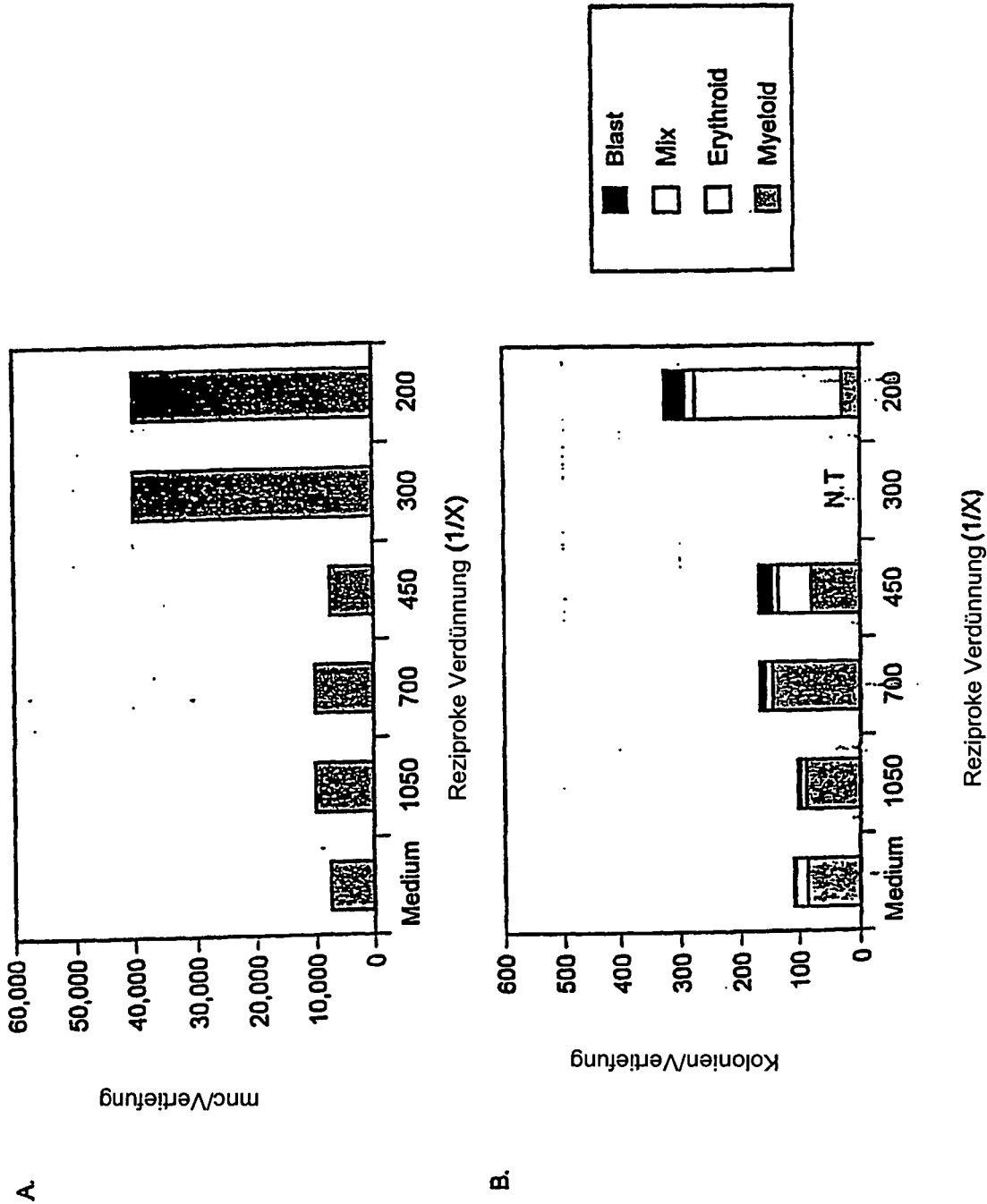


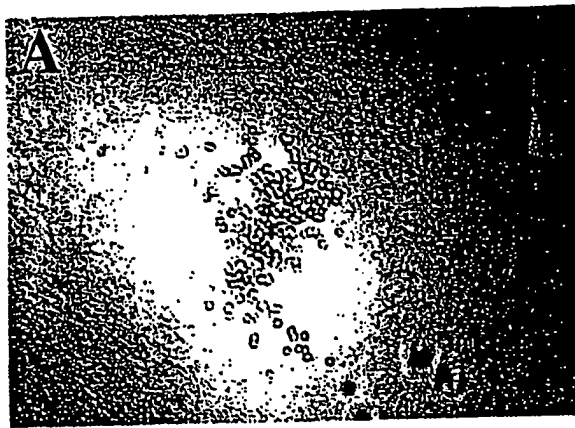
FIGUR 12

Figuren 13A und 13B

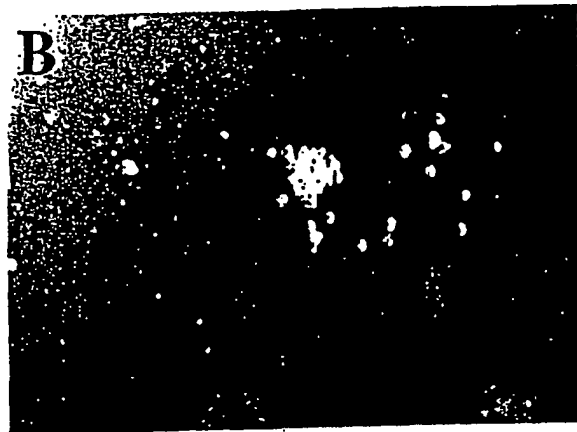


Figuren 14A und 14B

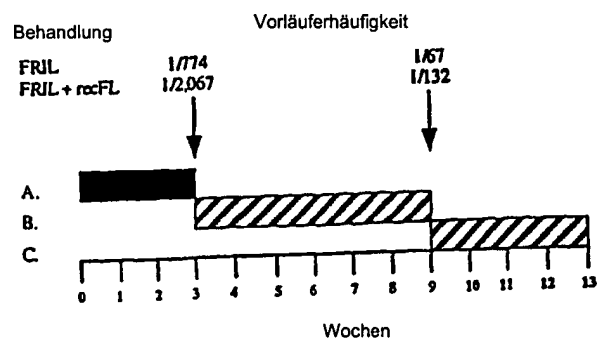




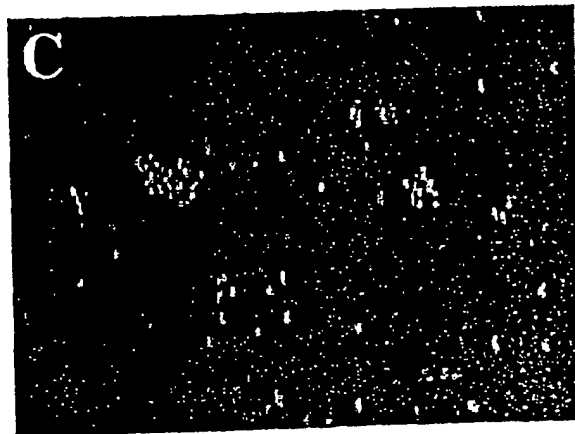
FIGUR 15A



FIGUR 15B

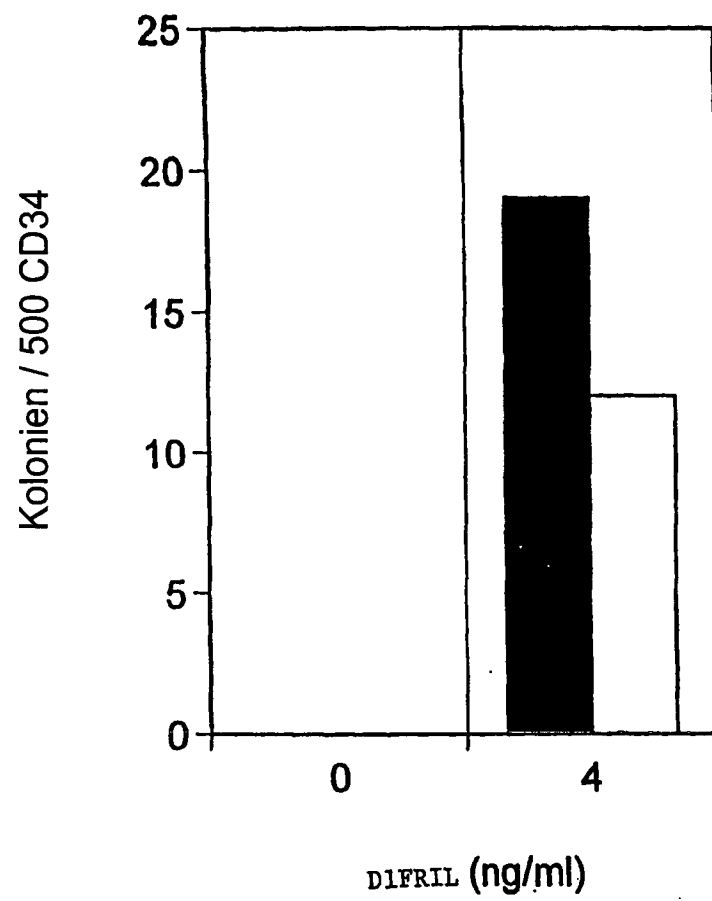


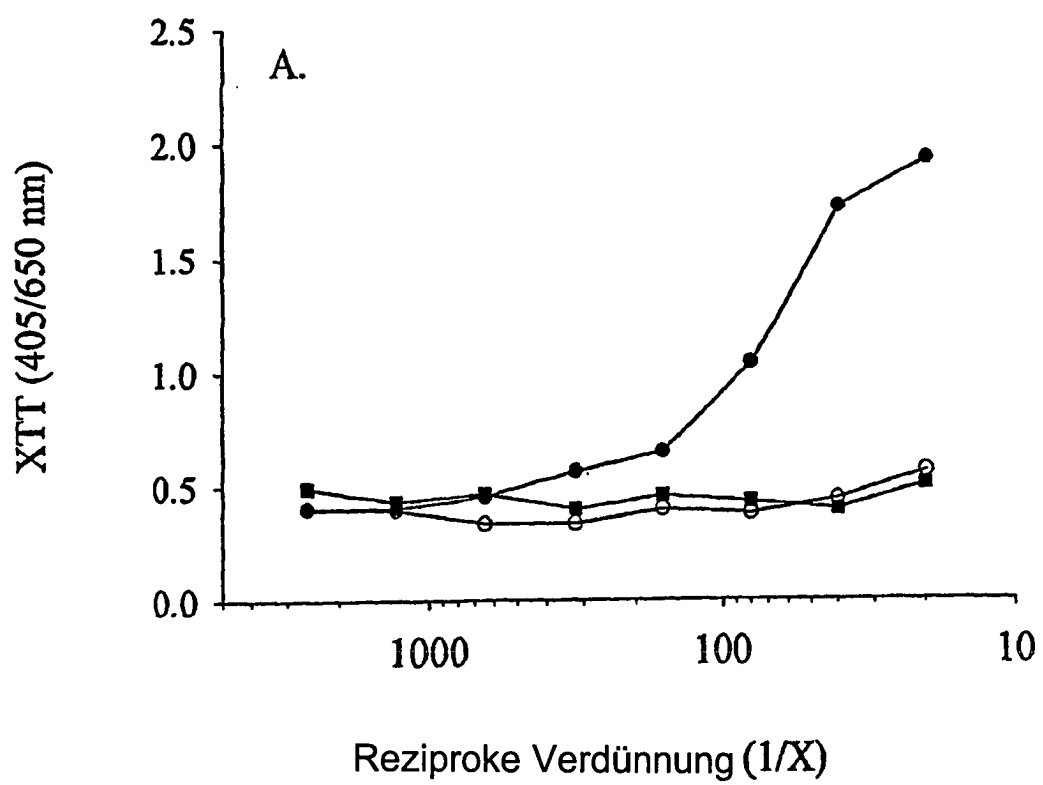
FIGUR 16



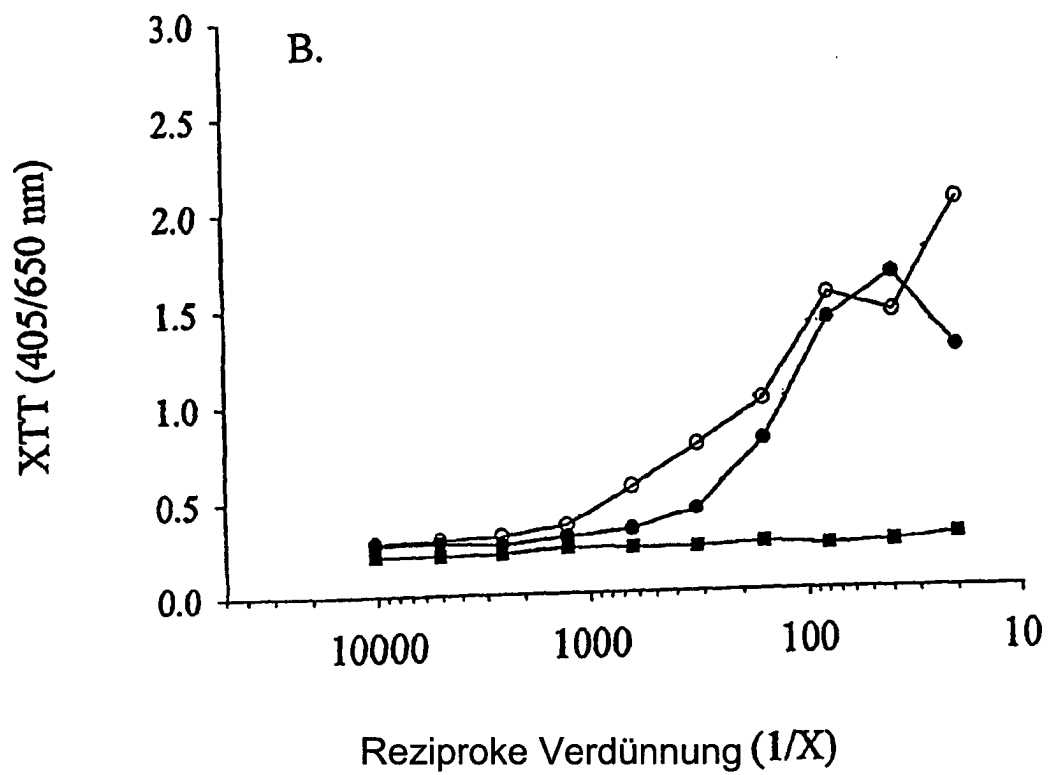
FIGUR 17

FIGUR 18

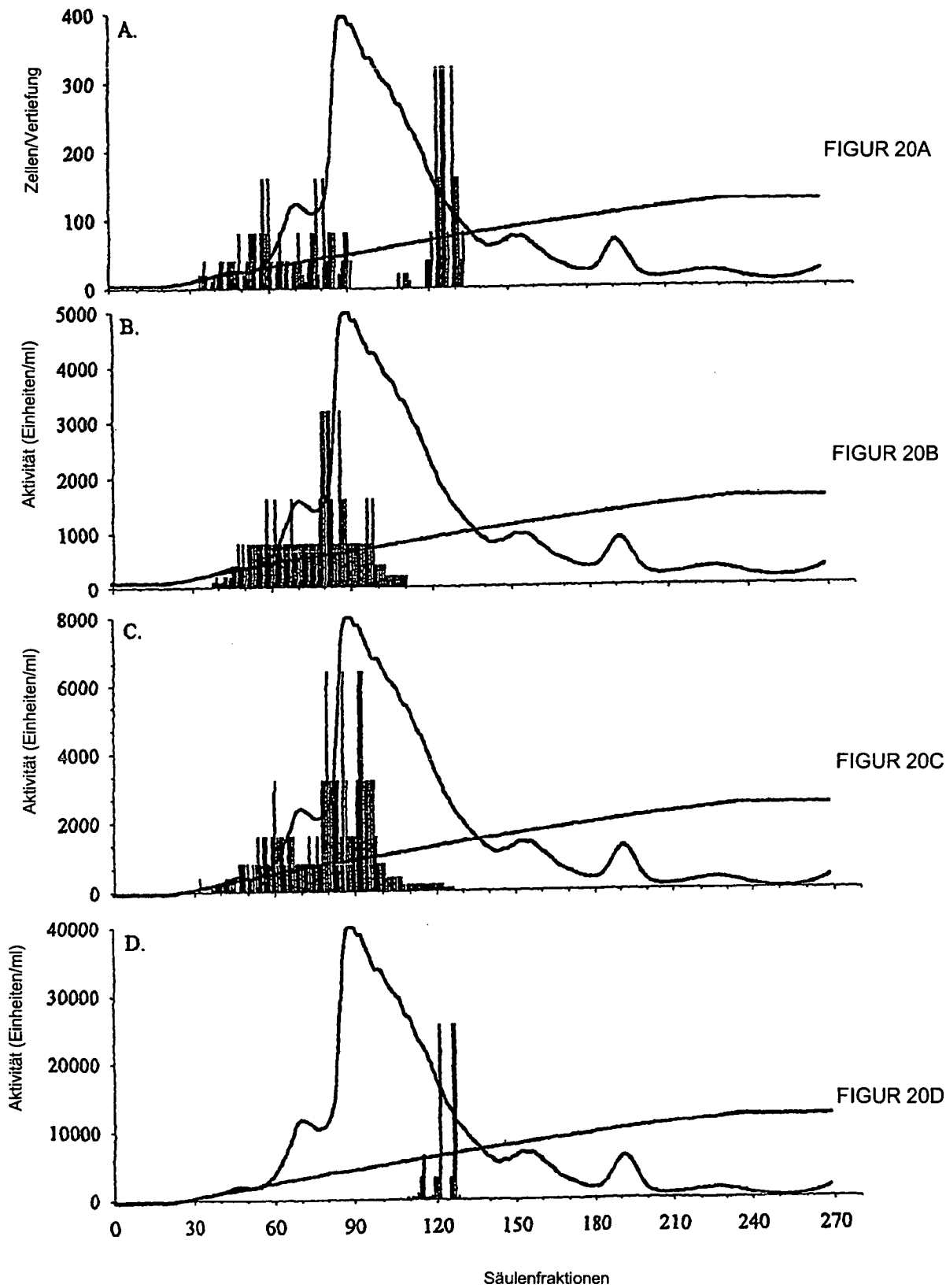


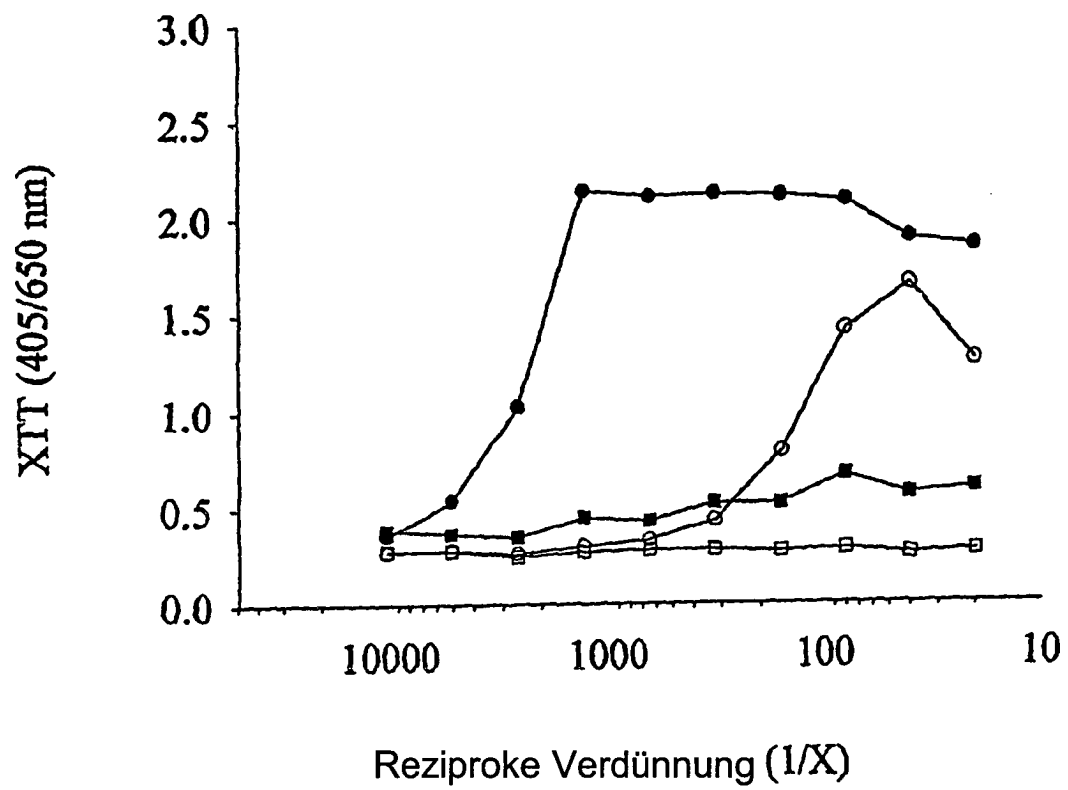


FIGUR 19A

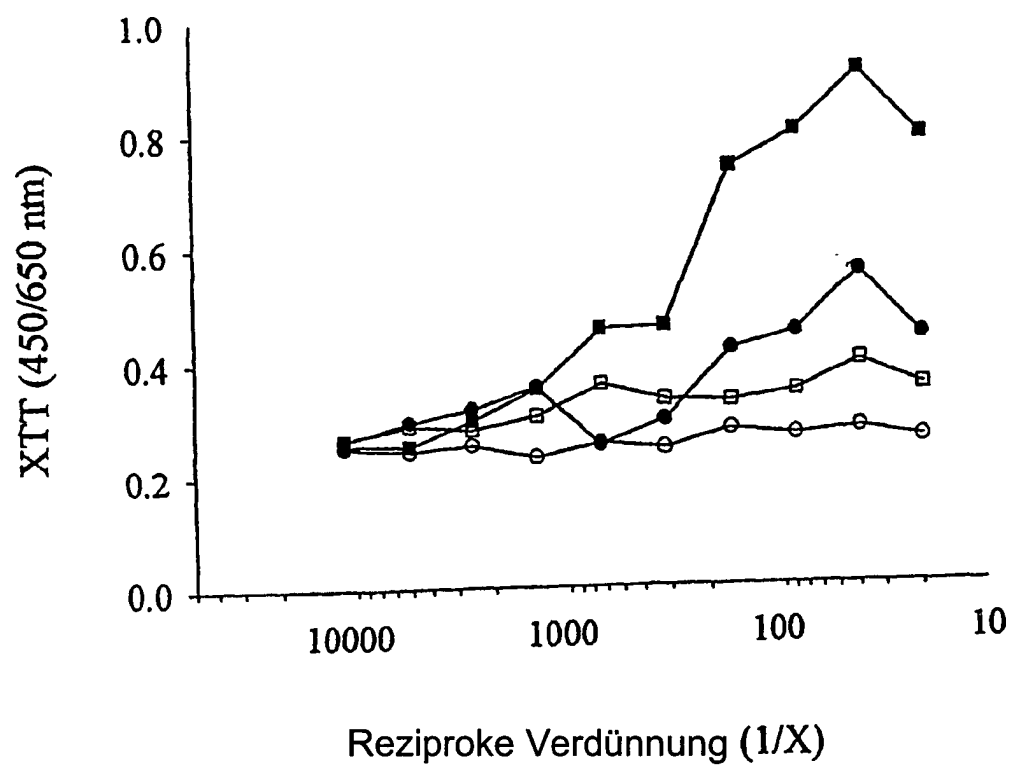


FIGUR 19B

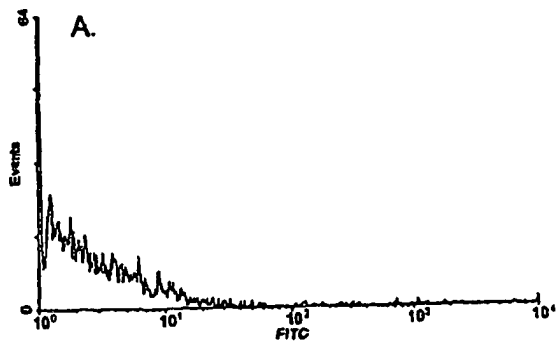




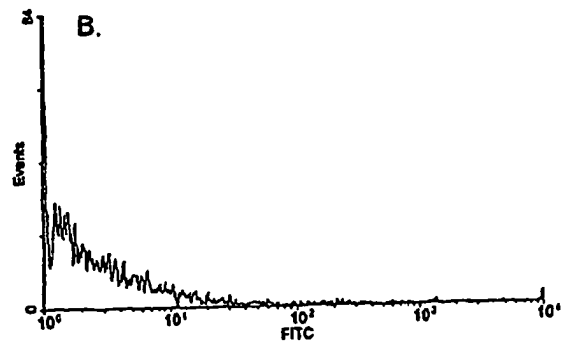
FIGUR 21A



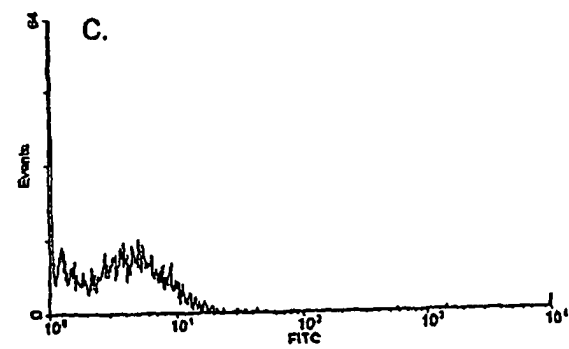
FIGUR 21B



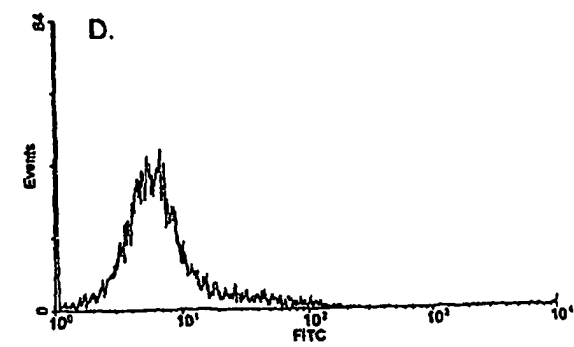
FIGUR 22A



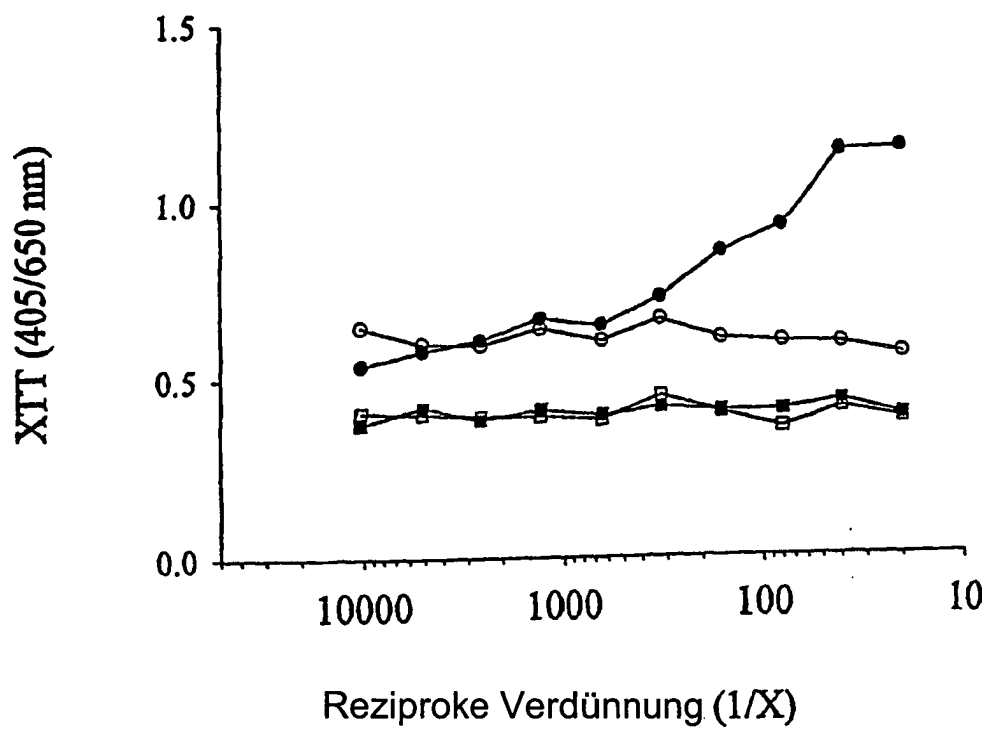
FIGUR 22B



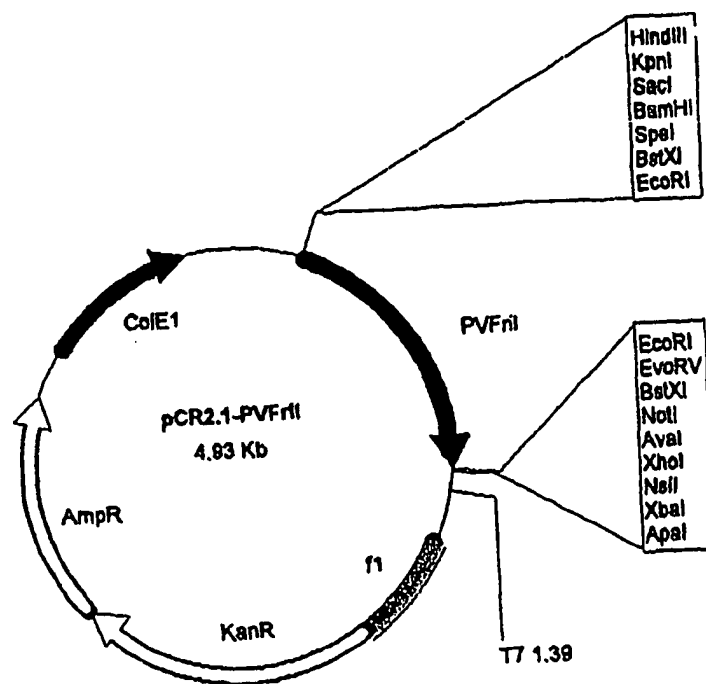
FIGUR 22C



FIGUR 22D



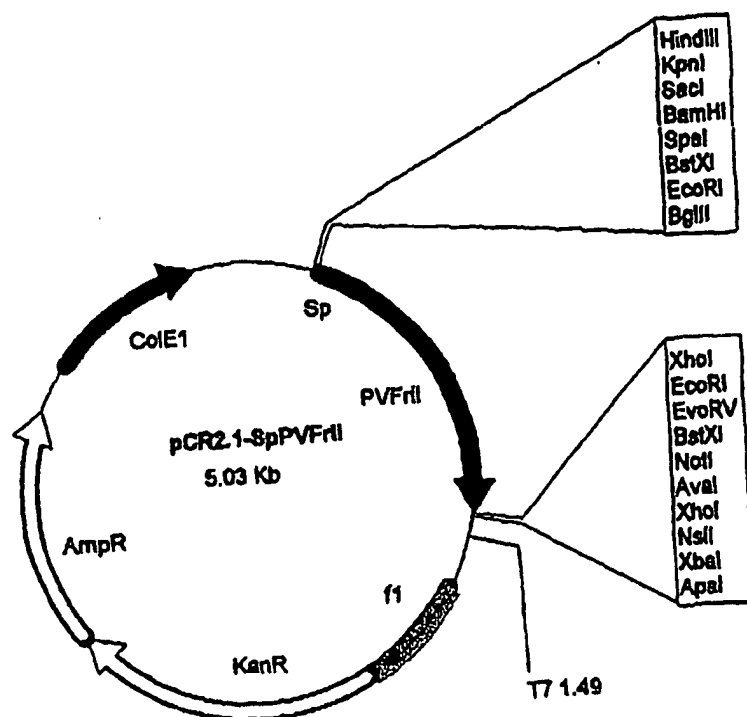
FIGUR 23



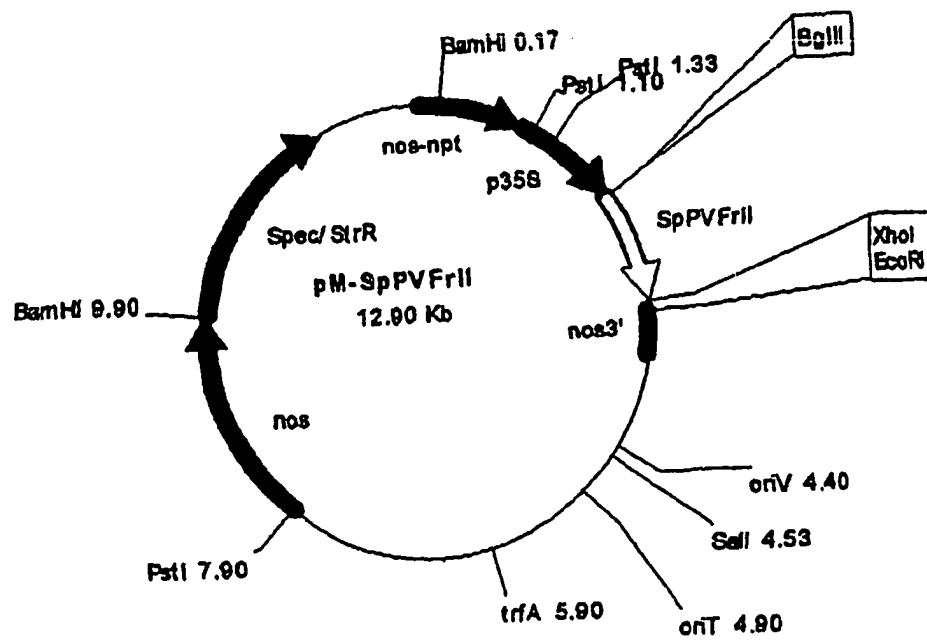
FIGUR 24A

DLL	1	AQSLSFSFTKFD	PNQEDLIFQGTATS	- - - -	26		
PvFRIL	1	AQSLSFNFTKFD	LDQKDLIFQGDATSTNN	- - - -	29		
PHA-E	1	ASQTSESFEQRLEN	- - ETNLLIQRDATIVSSKG	- - - -	28		
DLL	27	- - - -	KLDSAGNPVSSS	AGRVLYSAPLR	61		
PvFRIL	30	VLIQLTKLDSGGNP	VGASVGRVLESAP	FHLW	59		
PHA-E	29	QLRLTINVNDNGE	PTLSSLGRAFY	SAPIQITW	58		
DLL	52	EDSAVLTSTFDP	- - - TIYITFTNYTSR	IADGL	78		
PvFRIL	60	ENSMAYSSFEETN	- LTIQIISTPHPHYA	AADGE	88		
PHA-E	59	DNTTGAVAASPTS	FTFNLDVPINN	SGPADGL	88		
DLL	78	AFIAPP	- DSVISYH -	GGFLGLEFP	NAAESG	105	
PvFRIL	89	AFFLAPHDTIV	PPNSWGKELGLYS	NVFRNS	-	118	
PHA-E	89	AEVLLLPVGSQPKDK	- - GGLLGLENN	NYKYDS	-	116	
DLL	106	IAESN	- - - - -	VVAVEFDT	TDY	LNPD	124
PvFRIL	119	PTSEN	QSFQDVNTDSR	VVAVEFDT	- -	FPNA	146
PHA-E	117	NAH	- - - - -	TVAVEFDT	- -	LYNV	131
DLL	125	YGDPNYL	HIGIDVNSIR	SKVTASWDWQNGK	-	-	154
PvFRIL	147	NIDPNYR	HIGIDVNSIKS	KETARMEWQNGK	-	-	176
PHA-E	132	HWDPKPR	HIGIDVNSIKS	IKTITTWDFVKGE	-	-	181
DLL	155	IATAHISYNS	VSKRLSVTTIYPGRGK	- PAT	-	-	183
PvFRIL	177	TATARISYNS	ASKKSTVTTFYPGMEV	- VAL	-	-	205
PHA-E	182	NAEVLITYDS	STKLIVASLVYPSL	KTSFIV	-	-	191
DLL	184	SYDLELHTV	LPEWVRVGLSASTG	Q - - -	NIE	-	210
PvFRIL	206	SHDVDLHAE	LPEWVRVGLSASTGE	- - -	EKO	-	232
PHA-E	182	SDTVDLKSV	LPEWVTVGFTATTIG	ITKG	NVE	-	221
DLL	211	RNTVHSWSFTSS	LWTNVAKVG	- - - -	VAS	I	235
PvFRIL	233	KNTIISWSFTSS	LKNNEVK	EPKEDMY	I	ANV	262
PHA-E	222	TNDILSWSFA	SKLS	DGTTSEALN	- - -	LANF	248
DLL	236	SG	- - - - -	- - - -	-	-	237
PvFRIL	263	VRSYTWINDV	LSYISNK	- - - -	-	-	279
PHA-E	249	ALNQIL	- - - - -	- - - -	-	-	254

FIGUR 24B

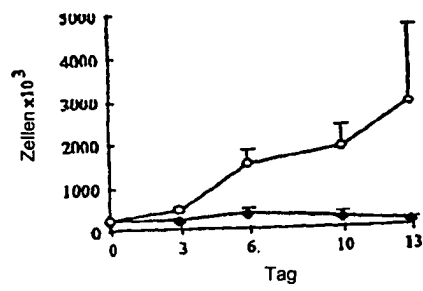


FIGUR 25

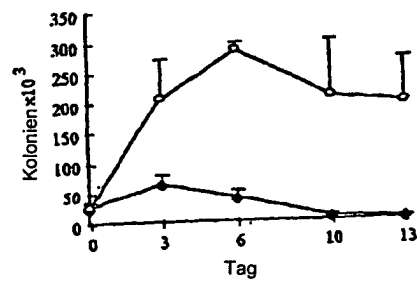


FIGUR 26

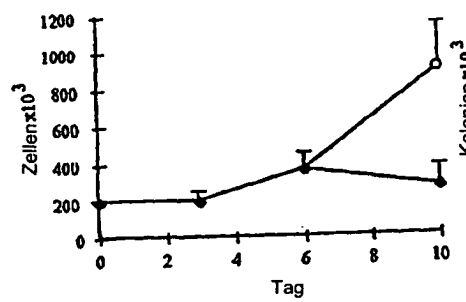
FIGUR 27A



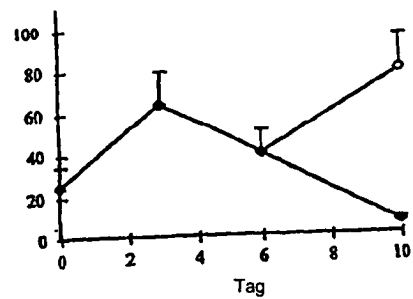
FIGUR 27B



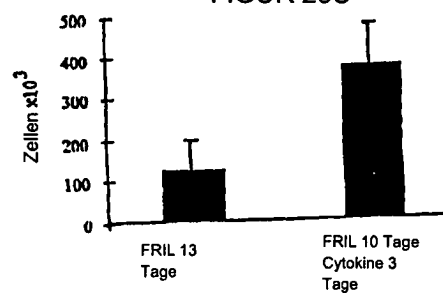
FIGUR 28A



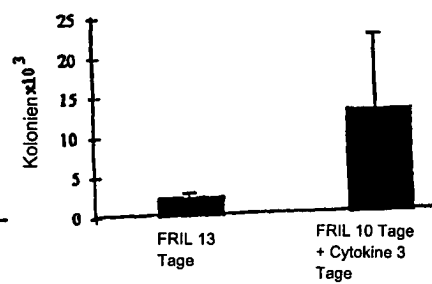
FIGUR 28B

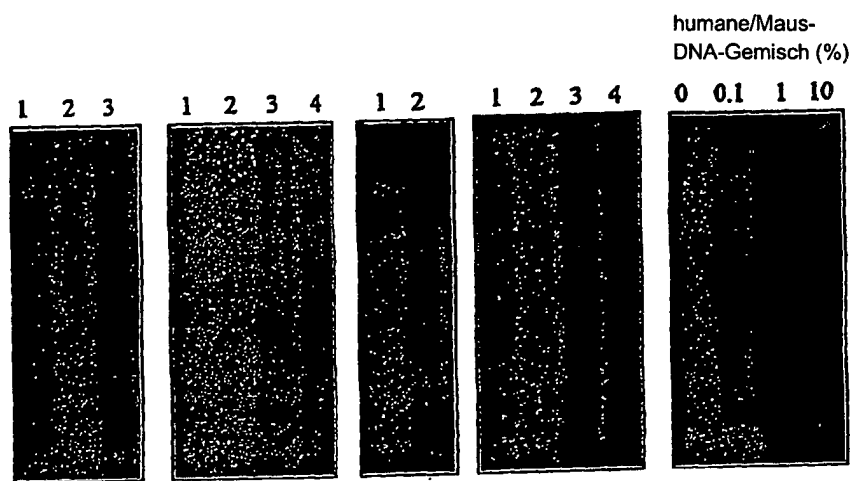


FIGUR 28C

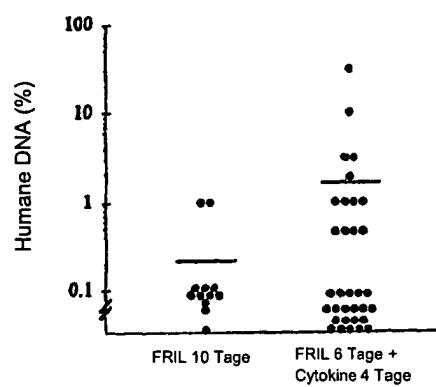


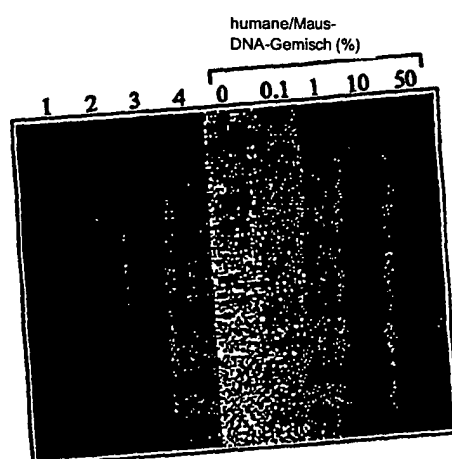
FIGUR 28D



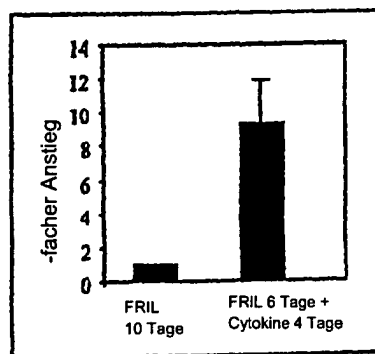


FIGUREN 29A - 29E

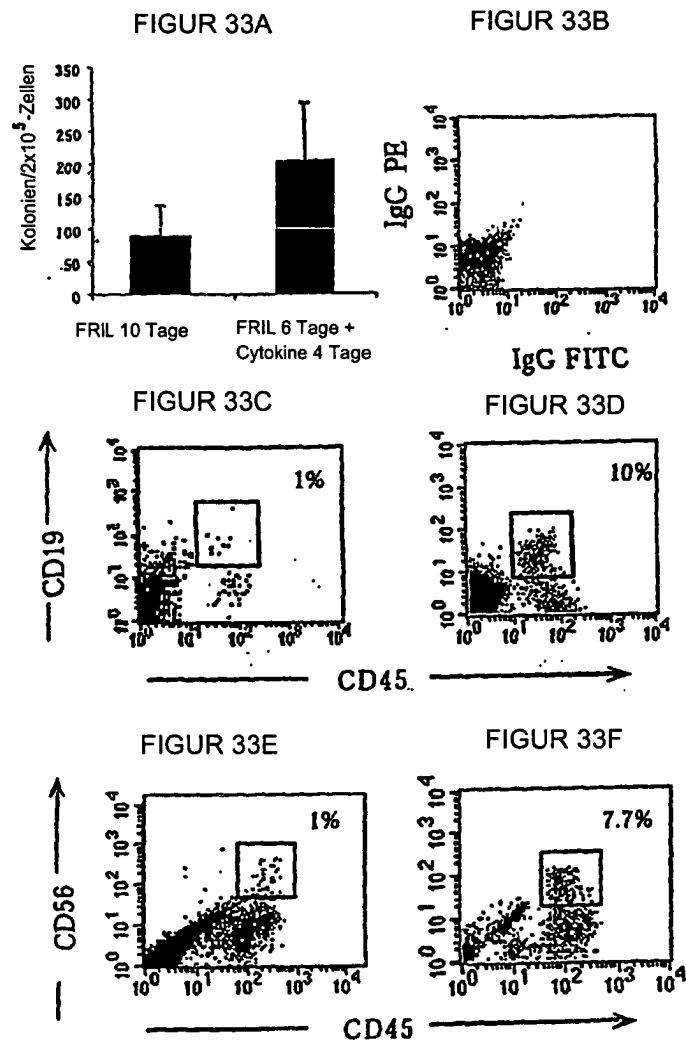


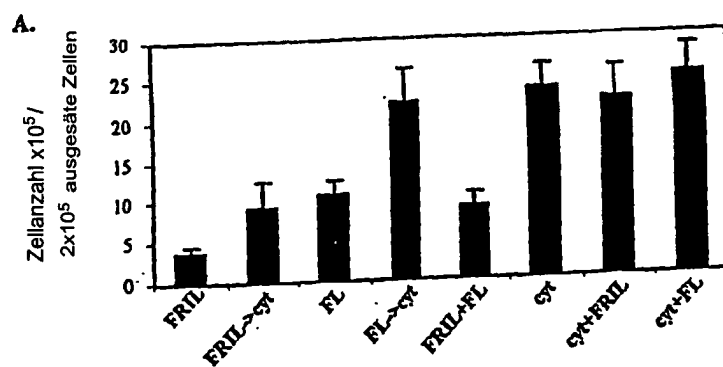


FIGUR 31

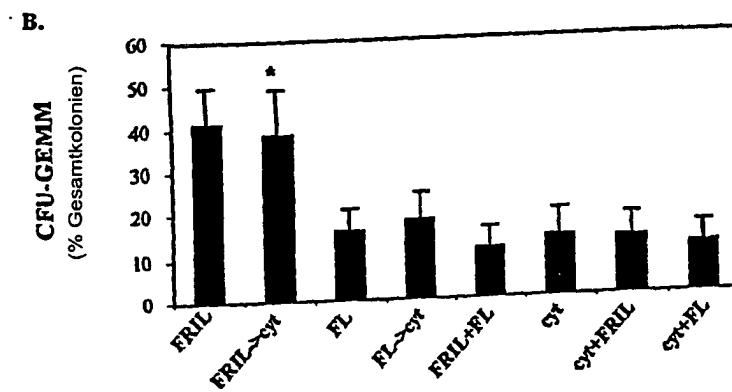


FIGUR 32



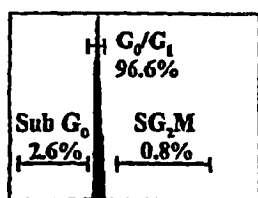


FIGUR 34A

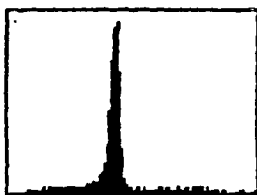


FIGUR 34B

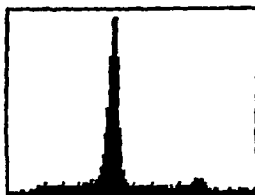
FIGUR 35A



FIGUR 35B



FIGUR 35C



FIGUR 35D



FIGUR 35E



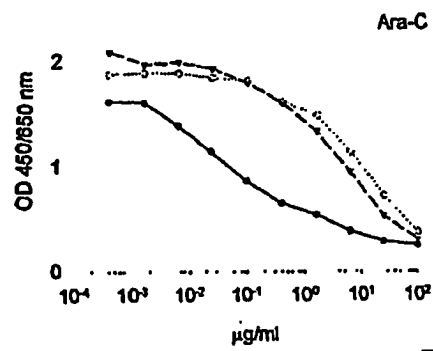
FIGUR 35F



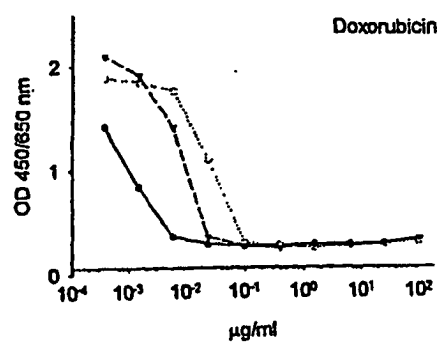
FIGUR 35G



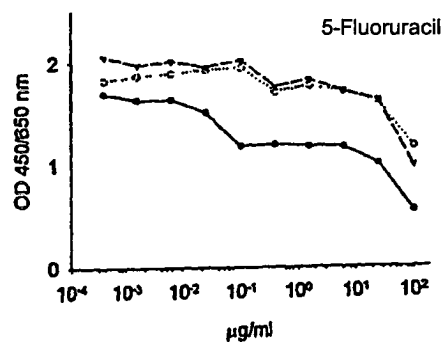
FIGUR 36A



FIGUR 36B



FIGUR 36C



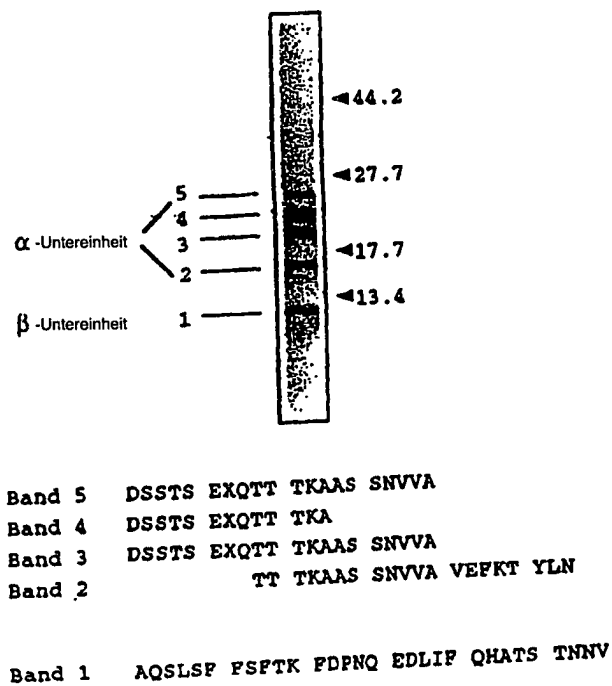


Fig. 1. Fraktionierung von aufgereinigter Hyazinthenbohne FRIL durch SDS/PAGE und aminoterminalen Aminosäuresequenzen der Polypeptidbestandteile.

FIGUR 37