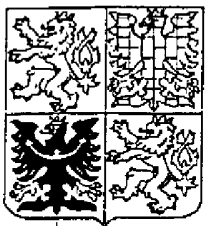


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

- (22) 12.05.94
(32) 24.05.93, 12.08.93, 25.08.93, 03.12.93, 07.03.94, 11.05.94
(31) 93/068394, 93/106463, 93/111758, 93/162407, 94/209502,
94/243545
(33) US, US, US, US, US, US
(40) 16.10.96

(21) 3079-95

(13) A3

6(51)

C 07 K 14/435
C 07 K 14/46
C 07 K 14/47
C 07 K 1/00
C 12 N 15/12
C 12 N 15/64
C 12 N 5/00
C 07 H 21/04
A 61 K 38/17
A 61 K 38/19
A 61 K 48/00

- (71) IMMUNEX CORPORATION, Seattle, WA, US;
(72) Lyman Stewart D., Seattle, WA, US;
Beckmann M. Patricia, Poulsbo, WA, US;
(54) **Ligandy pro FLT3 receptory**
(57) Ligandy pro flt3 receptory schopné samozesílení signálů pro regulaci růstu, proliferace nebo diferenciaci progenitorových buněk a kmenových buněk. Vynález je řízen na flt3-L jako izolovaný protein, DNA, kodující flt3-L, hostitelské buňky transfektované s cDNA, kodujícími flt3-L, kompozice, obsahující flt3-L, způsoby zlepšení genového transferu k savci za použití flt3-L a způsobů zlepšení transplantací za použití flt3-L. Flt3-L nachází použití při léčení pacientů s anémií, AIDS a různými rakovinami.

Ligandy pro FLT3 receptory

č.j.	110120
DOČÍM	
12. II. 96	
ORAD	
PROSTOR ÚVĚRY	
VLASTNÍ STVĚ	
PHIL.	

Oblast techniky

Předložený vynález se týká savčích flt3-ligandů, nukleových kyselin, kodujících takové ligandy, způsobů produkce rekombinantních flt3-ligandů, farmaceutických kompozic, obsahujících takové ligandy a jejich použití v různých terapiích.

Dosavadní stav techniky

Krevní buňky pocházejí z hematopoietických kmenových buněk, které se dělí do určitých rodin, tj. erythroidy, megakaryoty, granulocyty, monocyty a lymfocyty. Cytokiny, které stimulují proliferaci a maturaci buněčných prekurzorů jsou nazývány kolonie stimulující faktory ("CSF"). Některé CSF jsou produkovány T-lymfocyty, zahrnujícími interleukin-3 ("IL-3"), granulocyt-monocyt CSF (GM-CSF), granulocytový CSF (G-CSF) a monocytový CSF (M-CSF). Tyto CSF ovlivňují jak maturované buňky tak kmenové buňky. Dosud nebyly objeveny žádné faktory, které by byly schopny převážně stimulovat kmenové buňky.

Tyrosin kinásové receptory ("TKR") jsou receptory růstového faktoru, které regulují proliferaci a diferenciaci mnoha buněk (Yarden Y. a Ullrich A. *Annu, Rev. Biochem.* 57, 443-478, 1988; a Cadega D.L. a Gill G.N. *FASEB J.* 6, 2332-2337, 1992). Určité TKR působí v hematopoietickém systému. Například signalizací přes kolonie-stimulující faktor typu 1 ("CSF-1"), receptor c-fms reguluje přežívání, růst a diferenciaci monocytů (Stanley a spol., *J.Cell.Biochem.*, 21, 1983). Steel faktor ("SF", známý také jako

růstový faktor obrovských buněk, faktor kmenových buněk nebo kit ligand), působením přes c-kit, stimuluje proliferaci buněk jak v myeloidovém tak lymfoidním kompartmentu.

Flt3 (Rosner a spol. *Oncogene*, 6, 1641-1650, 1991) a flk-2 (Matthews a spol., *Cell*, 65, 1143-1152, 1992) jsou variantní formy TKR, který je příbuzný c-fms a c-kit receptorům. Flk-2 genový produkt je exprimován hematopoietickými a progenitorovými buňkami, zatímco flt3 genový produkt má obecnější tkáňovou distribuci. Flt3 a flk-2 receptorové proteiny jsou podobné pokud jde o aminokyselinovou sekvenci a mění se ve dvou aminokyselinových zbytcích v extracelulární doméně a rozcházejí v 31 aminokyselinové segmentu umístěném blízko C-konce (Lyman a spol., *Oncogene*, 8, 815-822, 1993).

Flt3-ligand ("flt3-L") byl shledán regulujícím růst a diferenciaci progenitorových a kmenových buněk a je pravděpodobně možné jeho klinické použití při léčbě hepatopoietických poruch, zejména aplastické anemie a myelodysplastických syndromů. Dále flt3-L bude použitelný u allogenních, syngenních nebo autologních transplantátů kostní dřeně u pacientů, kteří podstoupili cytoreduktivní terapie, jakož i buněčnou expanzi. Flt3-L bude také vhodný pro použití v genové terapii a mobilizaci systémů progenitorových a kmenových buněk.

Rakovina je léčena cytoreduktivními terapiemi, které zahrnují podání ionizujícího záření nebo chemických toxinů, což usmrcuje rychle se dělící buňky. Vedlejší účinky typicky vyplývají z cytotoxických účinků na normální buňky a může omezit použití cytoreduktivních terapií. Častým vedlejším účinkem je myelosuprese nebo poškození buněk kostní dřeně.

které zvyšuje bílé a červené krevní krvinky a destičky. Výsledkem myelosuprese je, že se u pacienta vyvíjí cytopenie nebo deficit krvinek, což zvyšuje nebezpečí infekce a krvácení.

Cytopenie zvyšuje morbiditu, mortalitu a vede k poddávkování v léčbě rakoviny. Mnoho klinických hodnotitelů zkoušelo měnit režimy a průběh dávkování cytoreduktivní terapie pro zvýšení dávkování v terapii rakoviny, aby bylo omezeno poškození kostní dřeně. Jeden pokus zahrnuje transplantování kostní dřeně nebo buněk periferní krve, ve kterých kostní dřeň nebo cirkulující hematopoietický progenitor nebo kmenové buňky jsou odstraněny před cytoreduktivní terapií a pak reinfuzovány po terapii pro obnovu hematopoietické funkce. US patent č. 5199942, uvedený zde jako odkaz, popisuje metodu pro použití GM-CSF, IL-3, GM-CSF/IL-3 fuzních proteinů, erythropoietinu ("EPO") a jejich kombinací v autologních transplantačních režimech.

Vysokodávková chemoterapie je terapeutickým přínosem, protože může produkovat zvýšenou četnost objektivní odezvy u pacientů s metastatickými rakovinami, zejména rakovinou prsu, v porovnání se standardní dávkovou terapií. Toto může vést k prodloužené choroby prosté remisi i u některých pacientů se špatnou prognózou. Přesto je vysokodávková chemoterapie toxická a mnoho vzniklých klinických komplikací je spojeno s infekcemi, poruchami krvácení a jinými účinky spojenými s prodlouženými periodami myelosuprese.

Myelodysplastické syndromy jsou poruchy kmenových buněk charakterizované zhoršenou buněčnou maturací, progresivní pancytopenií a funkčními abnormalitami zralých buněk. Byly také charakterizovány různými stupni cytopenie, neúčinné

erythropoiesis a myelopoiesis s buňkami kostní dřeně, které jsou normální nebo ve zvýšeném počtu a které mají pekuliární morfologii. Bennett a spol (*Br.J.Haematol.* 1982; 51:189-199) dělí tyto poruchy do pěti podtypů: refraktorní anemie, refraktorní anemie s kruhovitými sideroblasty, refraktorní anemie s přebytkem blastů, refraktorní anemie s přebytkem blastů ve transformaci a chronická myelocytomonocytická leukemie. I když se u významného procenta těchto pacientů vyvíjí akutní leukemie, většina umírá na infekční nebo hemorrhagické komplikace. Léčba těchto syndromů s retinoidy, vitamínem D a cytarabinem nebyla úspěšná. Většina těchto pacientů je postarších a nejsou vhodnými kandidáty pro transplantaci kostní dřeně nebo agresivní antileukemickou chemoterapii.

Aplastická anemie je jinou chorobou, která je charakterizována selháním kostní dřeně a nebezpečnou pancytopenií. Na rozdíl od myelodysplastického syndromu je kostní dřeň acelulární nebo hypocelulární v této chorobě. Současné léčby zahrnují transplantaci kostní dřeně z histokompatibilního dárce nebo imunosupresivní léčbu antithymocyt globulinem (ATG). Podobně jako u myelodysplastického syndromu, většina pacientů postižených tímto syndromem je postarších a jsou nevhodní pro transplantaci kostní dřeně nebo pro agresivní antileukemickou chemoterapii. Mortalita u těchto pacientů je zvláště vysoká z důvodů infekčních nebo hemorrhagických komplikací.

Anemie je běžná u pacientů se syndromem získané imunitní nedostatečnosti (AIDS). Anemie je obvykle nebezpečnější u pacientů se zidovudinovou terapií. Mnoho důležitých retrovirálních činidel, protiinfekčních látek a antineoplastik potlačuje erythropoiesis. Rekombinantní EPO byl zjištěn jako

normalizující pacientovy hematokritové a hemoglobinové hladiny, nicméně obvykle jsou vyžadovány velmi vysoké dávky. Růstový faktor, který stimuluje proliferaci erythroidové skupiny by měl být použit samotný nebo v kombinaci s EPO nebo jinými růstovými faktory pro léčbu takových pacientů a snížení počtu vyžadovaných transfuzí. Růstový faktor, který by také zvyšoval počet T buněk by mohl nalézt použití zejména u pacientů léčených na AIDS.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká biologicky aktivního flt3-ligandu (flt3-L) jako izolovaného nebo homogenního proteinu. Dále je vynález řízen na izolované DNA, kodující flt3-L a na expresivní vektory, obsahující cDNA, kodující flt3-L. V rozsahu tohoto vynálezu jsou hostitelské buňky, které byly transfektovány nebo transformovány s expresivními vektory, které obsahují cDNA, kodující flt3-L a procesy pro produkci flt3-L kultivací takových hostitelských buněk za podmínek, vedoucích k expresi flt3-L.

Flt3-L může být použit pro přípravu farmaceutických kompozic pro použití v allogenních, syngenních nebo autologních transplantačních metodách. Farmaceutické kompozice mohou obsahovat flt3-L samotný nebo v kombinaci s jinými růstovými faktory jako jsou interleukiny, faktory, stimující kolonie, protein tyrosin kinázy a cytokiny.

Vynález zahrnuje metody použití flt3-L kompozic v genové terapii a při léčbě pacientů postižených myelodysplastickým syndromem, aplastickou anémií, HIV infekcí (AIDS) a rakovinami jako je rakovina prsu, lymfom, rakovina malých plicních buněk, násobný myelom, neuroblastom, akutní leukemie, testikulární

nádory a rakovina vaječníků.

Předložený vynález se také týká protilátek a zejména monoklonálních protilátek, které jsou imunoreaktivní s flt3-L. Fuzní proteiny, obsahující rozpustný podíl flt3-L a konstatní doménu imunoglobulinového proteinu jsou také zahrnuty ve vynálezu.

Předložený vynález je také řízen na použití flt3-L v postupech transplantace periferních krevních progenitorových nebo kmenových buněk. Typicky jsou periferní krevní progenitorové buňky nebo kmenové buňky odstraněny z pacienta před myelosupresivní cytoreduktivní terapií a pak znovu podány pacientovi, současně s nebo po cytoreduktivní terapii pro paralyzování myelosupresivních účinků takové terapie. Předložený vynález poskytuje použití účinného množství flt3-L alespoň jedním z následujících způsobů: (i) flt3-L je podán pacientovi před odebráním progenitorových nebo kmenových buněk pro zvýšení nebo imobilizaci počtu takových obíhajících buněk; (ii) po odebrání pacientových progenitorových nebo kmenových buněk se flt3-L použije pro expandování takových buněk ex vivo a (iii) flt3-L je podán pacientovi po transplantaci odebraných progenitorových nebo kmenových buněk pro usnadnění jejich ujetí. Transplantační metoda podle vynálezu dále zahrnuje použití účinného množství cytokinů v následné nebo současné kombinaci s flt3-L. Takové cytokiny zahrnují, ale nejsou tak omezeny, interleukiny ("IL") IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 nebo IL-15, CSF vybraný ze skupiny, zahrnující G-CSF, GM-CSF, M-CSF nebo GM-CSF/IL-3 fuze nebo jiné růstové faktory jako je CSF-1, SF, EPO, leukemii inhibující faktor ("LIF") nebo fibroblastový růstový faktor ("FGF"). Flt3-L je také vhodný stejným způsobem pro syngenní nebo allogenní transplantace.

Vynález dále zahrnuje expanzní media pro progenitorové nebo kmenové buňky, zahrnující buněčné růstové medium, autologní serum a flt3-L samotný nebo v kombinaci s cytokinem ze skupiny uvedené výše.

Vynález dále zahrnuje použití flt3-L k expanzi progenitorových nebo kmenových buněk oddělených z pupečnickové krve. Expanze může být provedena s flt3-L samotným nebo postupně nebo současně v kombinaci s cytokinem z výše uvedené skupiny.

Vynález dále zahrnuje použití flt3-L v genové terapii. Flt3-L umožňuje proliferaci a kultivaci časných hematopoietických progenitorových nebo kmenových buněk, které mají být transfektovány exogenní DNA pro použití v genové terapii. Alternativně cDNA kodující flt3-L může být transfektována do buněk za účelem konečného doručení jejího genového produktu do cílových buněk nebo tkáně.

Dále vynález zahrnuje použití flt3-L pro stimulaci produkce erythroidních buněk in vivo pro léčbu anemie. Takové použití zahrnuje podání flt3-L pacientovi v případě takové potřeby stimulace erythroidových buněk ve spojení nebo po cytoreduktivní terapii. Léčba také zahrnuje současné podání jiného růstového faktoru vybraného z cytokinů z výše uvedené skupiny. Preferované cytokiny pro použití v tomto léčení zahrnují EPO, I-3, G-CSF a GM-CSF. Takové léčení je zejména vhodné pro pacienty s AIDS a výhodně pro AIDS pacienty s AZT terapií.

Protože flt3-L stimuluje produkci kmenových buněk, mohou být jiné nehematopoietické kmenové buňky nesoucí flt3-L receptory ovlivněny pomocí flt3-L podle vynálezu. Flt3-L je

vhodný pro in vitro fertilizační postupy a může být použit in vivo při léčení stavů neplodnosti. Ve střevu je flt3-L ligand vhodný pro léčení intestinálních poškození vzniklých z ozařování nebo chemoterapie. Flt3-L může být také použit pro léčbu pacientů infikovaných virem lidské imunoneдостatečnosti (HIV). Takové léčení by mělo zahrnovat podání flt3-L pro stimulaci in vivo produkce, jakož i ex vivo expanze, T buněk a erythroidních buněk. Takové ošetření může bránit nedostatku T buněk, zejména CD4-pozitivních T buněk a může zvyšovat pacientovu imunitní odezvu na virus, čímž se zlepšuje kvalita pacientova života. Flt3-L může být použit pro stimulaci kmenových buněk, což vede k vývoji vlasových folikul a napomáhá se tak růstu vlasů.

Dále může být flt3-L navázán k pevné fázové matici a použit k afinitnímu čištění nebo dělení buněk, které exprimují flt3-L na svém buněčném povrchu. Vynález zahrnuje dělení buněk, majících flt3-L receptor na svém povrchu ze směsi buněk v roztoku, které zahrnuje kontakt buněk ve směsi s kontaktním povrchem, majícím na sobě flt3-L vázající molekulu a oddělení kontaktního povrchu a roztoku. Jakmile jsou odděleny, mohou být buňky expandovány ex vivo za použití flt3-L a podány pacientovi.

cDNA kodující myší flt3-L byla izolována a je popsána v SEQ ID NO:1. cDNA kodující lidský flt3-L byla také izolována a je popsána v SEQ ID NO:5. Tento objev cDNA, kodujících myší a lidský flt3-L umožňuje konstrukci expresivních vektorů, obsahujících cDNA, kodující flt3-L; hostitelské buňky transfektované nebo transformované expresivními vektory; biologicky aktivní myší a lidský flt3-L jako homogenní proteiny a protilátky imunoreaktivní s myším a lidským flt3-L.

Flt3-L je vhodný pro posílení, stimulaci, proliferaci buněk, exprimujících flt3-L receptor, zahrnujících ne-hematopoietické buňky. Protože flt3 receptor je nacházen v mozku, placentě a tkáních nervového a hematopoietického původu, a jeho distribuce byla zjištěna ve varlatech, vaječnicích, lymfatických žlázách, slinivce, thymu a fetálních játrech, je tak možná léčba různých stavů spojených s poškozením tkání. Pokud není uvedeno jinak, výhodná použití flt3-L jsou ta, která byla zde již uvedena.

Jak je zde použit, označuje výraz "flt3-L" rod polypeptidů, které se vážou a komplexují s flt3-L receptorem nalezeným na progenitorových a kmenových buňkách. Výraz "flt3-L" zahrnuje aminokyselinové sekvence 1 až 231 ze SEQ ID NO:6 jakož i takové proteiny, které mají vysoký stupeň podobnosti nebo vysoký stupeň identity s aminokyselinovou sekvencí 1 až 231 ze SEQ ID NO:2 nebo aminokyselinovou sekvencí 1 až 235 ze SEQ ID NO:6, a tyto proteiny jsou biologicky aktivní a vážou flt3-L receptor. Dále výraz označuje biologicky aktivní genové produkty DNA ze SEQ ID NO:1 nebo SEQ ID NO:5. Dále zahrnuje výraz "flt3-L" membránou vázané proteiny (které obsahují intracelulární region, membránový region a extracelulární region), a rozpustné nebo zkrácené proteiny, které obsahují v první řadě extracelulární část proteinu, uchovávají si biologickou aktivitu a jsou schopny být sekretovány. Specifické příklady takových rozpustných proteinů jsou ty, které zahrnují sekvence aminokyselin 28-163 ze SEQ ID NO:2 a aminokyseliny 28-160 z SEQ ID NO:6.

Výraz "biologicky aktivní", týká-li se flt3-L znamená, že flt3-L je schopen se vázat k flt3. Alternativně "biologicky aktivní" znamená, že flt3-L je schopen předání stimulačního

signálu buňce přes membránu vázaný flt3.

"Izolovaný" znamená, že flt3-L je prostý spojení s jinými proteiny nebo polypeptidy, například jako produkt čištění rekombinantní hostitelské kultury nebo jako čištěný extrakt.

"Flt3-L varianta" jak je zde použito, znamená polypeptid v podstatě homologní k nativnímu flt3-L, ale který má aminokyselinovou sekvenci odlišnou od sekvence nativního flt3-L (lidského, myšního nebo jiného savčího druhu) pro jednu nebo více delecí, inzercí nebo substitucí. Varianta aminokyselinové sekvence je výhodně alespoň asi z 80 % identická s nativní flt3-L aminokyselinovou sekvencí, nejvýhodněji alespoň z asi 90 % identická. Procenta identity mohou být, například, stanovena porovnáním informace o sekvenci za použití GAP počítačového programu, verze 6.0 popsaného Devereuxem a spol. (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) a dostupného z University of Wisconsin Genetics Group (UWGCG). GAP program využívá seřazovací metody Needlemana a Wunsche (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970) revidované Smithem a Watermanem (*Adv. Appl. Math* 2:482, 1981). Preferované parametry pro GAP program zahrnují: (1) unary srovnávací matici (obsahující hodnotu 1 pro shody a 0 pro neshody) pro nukleotidy a hmotnostně srovnávací matici podle Gribskova a Burgesse, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, jak popsali Schwartz a Dayhoff, vyd., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, str.353-358, 1979; (2) trestný bod pro každou mezeru a dalších 0,10 trestného bodu pro každý symbol v každé mezeře a (3) žádný trestný bod pro konec mezer. Varianty mohou obsahovat konzervativně substituované sekvence, což znamená, že uvedený aminokyselinový zbytek je nahrazen zbytkem majícím podobné fyziologické charakteristiky. Příklady konzervativních substitucí zahrnují

náhradu jednoho alifatického zbytku druhým jako Ile, Val, Leu nebo Ala vzájemně nebo náhrady jednoho polárního zbytku jiným, jako mezi Lys a Arg; Glu a Asp; nebo Gin a Asn. Jiné takové konzervativní substituce, například náhrady celých regionů, majících podobné charakteristiky hydrofobicity, jsou dobře známé. Přírodně se vyskytující flt3-L varianty jsou také zahrnuty do vynálezu. Příklady takových variant jsou proteiny, které vznikají z alternativ mRNA střihů nebo z proteolytického štěpení flt3-L proteinu, kde flt3-L vazebná vlastnost je zachována. Alternativní střih mRNA může vést ke zkrácenému, ale biologicky aktivnímu flt3-L proteinu, jako je například přírodně se vyskytující rozpustná forma proteinu. Variace, které lze přiřadit proteolýze zahrnují, například, rozdíly v N- nebo C- konci po expresi v různých typech hostitelských buněk, způsobené proteolytickým odstraněním jedné nebo více terminálních aminokyselin z flt3-L proteinu (obecně od 1 do 5 koncových aminokyselin).

Výraz "autologní transplantace" je popsán v US patentu č. 5199942, který je zde zahrnut jako odkaz. Stručně, výraz znamená způsob provedení autologní transplantace progenitorových nebo kmenových buněk, zahrnující: (1) oddělení hematopoietických buněk nebo kmenových buněk od pacienta před cytoreduktivní terapií; (2) expanzi hematopoietických progenitorových buněk nebo kmenových buněk ex vivo s flt3-L pro poskytnutí celulárního přípravku, obsahujícího zvýšený počet hematopoietických progenitorových buněk nebo kmenových buněk a (3) podání buněčného přípravku pacientovi ve spojení s nebo po cytoreduktivní terapií. Progenitorové a kmenové buňky mohou být získány z periferní krve nebo explantátů kostní dřeně. Popřípadě může být jeden nebo více cytokinů, vybraných ze skupiny uvedené výše, kombinován s flt3-L za účelem proliferace určitých typů hematopoietických buněk nebo

pro ovlivnění buněčné funkce výsledné proliferační hematopoietické buněčné populace. Vzhledem k uvedenému jsou tedy preferovány SF, IL-1, IL-3, EPO, G-CSF, GM-CSF a GM-CSF/IL-3 fúze a zejména jsou preferovány G-CSF, GM-CSF a GM-CSF/IL-3 fúze. Výraz "alogenní transplantace" označuje metodu, ve které se buňky kostní dřeně nebo periferní krevní progenitorové buňky nebo kmenové buňky odstraní ze savce a podají jinému savci téhož druhu. Výraz "syngenní transplantace" znamená transplantaci mezi geneticky identickými savci.

Transplantační metoda podle vynálezu popsaná výše popřípadě zahrnuje předcházející in vivo postup, zahrnující podání flt3-L samotného nebo v následně či současně kombinaci s recruitmentem růstového faktoru pacientovi pro odvedení hematopoietických buněk do periferní krve před jejich odebráním. Vhodné recruitment faktory jsou uvedeny výše a preferovanými recruitment faktory jsou flt3-L, SF, IL-1 a IL-3.

Metoda podle vynálezu popsaná výše popřípadě zahrnuje následující in vivo postup, zahrnující podání flt3-L samotného nebo následně nebo v kombinaci s růstovým faktorem transplantátu pacientovi po transplantaci celulárního preparátu pro usnadnění uchycení a rozšíření proliferace transplantovaných hematopoietických progenitorových nebo kmenových buněk z celulárního preparátu. Vhodné transplantátové faktory jsou uvedeny výše a v preferovaném provedení jsou takovými faktory GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-1, EPO a GM-CSF/IL-3 fúze.

Vynález dále zahrnuje expanzní media progenitorových nebo kmenových buněk, obsahující buněčné růstové medium, autologní

sérum a flt3-L samotný nebo v kombinaci s cytokinovým růstovým faktorem jak je uveden výše. Preferované růstové faktory jsou SF, GM-CSF, IL-3, IL-1, G-CSF, EPO a GM-CSF/IL-3 fúze.

Zejména může být flt3-L použit pro stimulaci proliferace hematopoietických a nehematopoietických kmenových buněk. Taková stimulace je přínosem, jestliže se v takové tkáni objevilo specifické poškození. Jako takový může být flt3-L vhodný při léčení neurologického poškození a může být růstovým faktorem pro nervové buňky. Je pravděpodobné, že flt3-L by mohl být použit v in vitro oplodňovacích procesech a pravděpodobně použit in vivo v léčbě stavů neplodnosti. Flt3-L by mohl být vhodný při léčbě intestinálních poškození vzniklých následkem ozařování nebo chemoterapie. Protože flt3-L receptor je distribuován na kmenových buňkách, což vede toto k vývoji vlasových folikulí, mohl by flt3-L být vhodný pro promotování růstu vlasů.

Protože flt3-L byl zjištěn jako stimulující proliferaci T buněk i erythrocytů (viz příklady, infra). nachází flt3-L použití při léčbě pacientů infikovaných virem lidské imunonedostatečnosti (HIV). Takové léčení by mělo zahrnovat podání flt3-L pro stimulaci in vivo produkce, jakož i ex vivo expanze. Dále může flt3-L bránit nedostatku CD4⁺T buněk. Taková léčba může zvyšovat nebo udržovat pacientovu imunitní odezvu proti viru a tím zlepšovat nebo udržovat kvalitupacientova života. Dále by takové in vivo léčení mohlo stimulovat buňky erythroidové rodiny a tím zlepšovat pacientovy hematokritové a hemoglobinové hladiny. Flt3-L může být podán v tomto způsobu samotný nebo v následné nebo současné kombinaci s cytokiny, vybranými ze skupiny uvedené výše.

Flt3-L je použitelný v genové terapii pro svoji specifitu pro progenitorové a kmenové buňky. Genová terapie zahrnuje podání exogenní DNA-transfektovaných buněk hostiteli, kde jsou ponechány se ujmout. Viz např. Boggs, *International J. Cell Cloning*, 8:80-96(1990); Kohn a spol., *Cancer Invest.* 7(2):179-192 (1989); Lehn, *Bone Marrow Transpl.*, 5:287-293(1990) a Verma, *Scientific American*, str. 68-84(1990). Použití metod genové terapie známých v oboru, metoda přenesení genu do savce, zahrnuje stupně a) kultivace časných hematopoietických buněk v mediu, obsahujícím flt3-L samotný nebo v následné nebo současné kombinaci s cytokinem vybraným ze skupiny uvedené výše; (b) transfekci kultivovaných buněk ze stupně (a) exogenním genem a (c) podání transfektovaných buněk savci. V této metodě je nová metoda transfekce progenitorových nebo kmenových buněk genem, zahrnující stupně (a) a (b) výše. Dále použitím stejných nebo podobných metod může být cDNA, kodující flt3-L transfektována do takových buněk pro dodání, které dodají flt3-L genový produkt i cílové tkáni.

Příklad 1 popisuje konstrukci nového flt3:Fc fuzního proteinu použitého ve screeningu flt3-L. Jiné protilátkové Fc regiony mohou nahradit lidský IgG1 Fc region popsany v příkladu 1. Jiné vhodné Fc regiony jsou ty, které se mohou vázat s vysokou afinitou k proteinu A nebo proteinu G a zahrnují Fc region lidského IgG1 nebo fragmentů lidského nebo myšského IgG1 Fc regionu, např. fragmenty, obsahující alespoň pantový region takže se budou vytvářet meziřetězcové disulfidové vazby. flt3Fc fuzní protein má tu výhodu, že je snadno čistitelný. Dále disulfidové vazby tvoří mezi Fc regiony dva oddělené fuzní proteinové řetězce, vytvářející dimery. Dimerní flt3:Fc receptor byl zvolen pro potenciální výhodu vyšší afinity vazby flt3-L vzhledem k možnosti, že

vyhledávaný ligand by mohl být multimerní.

Jak je popsáno výše, aspektem vynálezu jsou rozpustné flt3-L polypeptidy. Rozpustné flt3-L polypeptidy zahrnují všechny části extracelulární domény nativního flt3-L, ale postrádají transmembránový region, který by mohl vyvolat retenci polypeptidu na buněčné membráně. Rozpustné flt3-L polypeptidy výhodně obsahují nativní (nebo heterologní) signální peptid, když jsou na počátku syntetizovány pro přemotování sekrece, ale signální peptid se odštěpí po sekreci flt3-L z buňky. Rozpustné flt3-L polypeptidy zahrnuté vynálezem si zachovávají schopnost vázat flt3 receptor. Ve skutečnosti rozpustný flt3-L může také obsahovat část transmembránového regionu nebo část cytoplasmické domény nebo jiných sekvencí s tou podmínkou, že rozpustný flt3-L protein může být sekretován.

Rozpustný flt3-L může být identifikován (a odlišen od svých nerozpustných na membráně navázaných protějšků) oddělením intaktních buněk, které exprimují požadovaný protein z kultivačního media, např. odstředěním, a vyhodnocením media (supernatantu) na přítomnost požadovaného proteinu. Přítomnost flt3-L v mediu znamená, že protein byl sekretován z buněk a toto je rozpustná forma požadovaného proteinu.

Rozpustné formy flt3-L vykazují mnoho výhod proti nativnímu vázanému flt3-L proteinu. Čištění proteinů z rekombinantních hostitelských buněk je snadné, protože rozpustné proteiny jsou sekretovány z buněk. Dále jsou rozpustné proteiny obecně mnohem vhodnější pro intravenózní podání.

Příklady rozpustných flt3-L polypeptidů zahrnují ty,

které obsahují podstatnou část extracelulární domény nativního flt3-L proteinu. Takové rozpustné savčí flt3-L proteiny zahrnují aminokyseliny 28 až 188 ze SEQ ID NO:2 nebo aminokyseliny 28 až 182 ze SEQ ID NO:6. Navíc, zkrácené rozpustné flt3-L proteiny, obsahující méně než celou extracelulární doménu, jsou zahrnuty ve vynálezu. Takové zkrácené rozpustné proteiny jsou reprezentovány sekvencí aminokyselin 28-163 ze SEQ ID NO:2 a aminokyselin 28-160 ze SEQ ID NO:6. Je-li na počátku exprimován v hostitelské buňce, může rozpustný flt3-L dále obsahovat jeden z heterologních signálních peptidů popsaných dále, který je funkční v použitých hostitelských buňkách. Alternativně může protein obsahovat nativní signální peptid, takže savčí flt3-L obsahuje aminokyseliny 1 až 188 ze flt3-L2 nebo aminokyseliny 1 až 182 ze SEQ ID NO:6. V jednom provedení vynálezu byl rozpustný flt3-L exprimován jako fuzní protein, obsahující (od N- do C-konce) kvasinkový α faktor signální peptid, FLAG^R peptid popsaný dále a v US patentu č. 5011912 a rozpustný flt3-L, obsahující aminokyseliny 28 až 188 ze SEQ ID NO:2. Tento rekombinantní fuzní protein je exprimován a sekretován z kvasinkových buněk. FLAG^R peptid usnadňuje čištění proteinu a následně může být štěpen z rozpustného flt3-L za použití mukosální enterokinázy. Izolované DNA sekvence kodující flt3-L proteiny jsou zahrnuty ve vynálezu.

Zkrácený flt3-L, zahrnující rozpustné polypeptidy, může být připraven jakoukoliv z běžných technik. Požadovaná FNA sekvence může být chemicky syntetizována za použití technik známých per se. DNA fragmenty mohou být také produkovány štěpením restriční endonukleásou úplné délky klonované DNA sekvence a izolovány elektroforézou na agarosovém gelu. Linkery, obsahující restriční endonukleásová místa štěpení (místo) mohou být použity pro inzert požadovaného DNA

fragmentu do expresivního vektoru, nebo fragment může být štěpen v místech štěpení, která jsou v něm přirozeně přítomna. Postup dobře známé polymerásové řetězové reakce může být také použit pro amplifikaci DNA sekvence, kodující požadovaný proteinový fragment. Jako další alternativa mohou být použity známé techniky mutagenese pro inzert stop kodonu na požadované místo, např. bezprostředně po směru kodonu pro poslední aminokyselinu extracelulární domény.

V jiném přiblížení může být použito enzymatické zpracování (např. za použití Bal 31 exonukleázy) pro delecii terminálních nukleotidů z DNA fragmentu pro získání fragmentu, majícího výhodný požadovaný konec. Z mnoha komerčně dostupných linkerů jsou to ty, které mohou být ligovány k tupým koncům produkovaným Bal 31 štěpením a které obsahují místo (místa) pro restriční endonukleásové štěpení. Alternativně mohou být syntetizovány oligonukleotidy, které rekonstruuji N- nebo C-konec DNA fragmentu k požadovanému bodu a mohou být ligovány k DNA fragmentu. Syntetizované oligonukleotidy mohou obsahovat restriční endonukleásové štěpící místo proti směru požadované kodující sekvence a polohu iniciačního kodonu (ATG) na N-konci kodující sekvence.

Jak je uvedeno výše, vynález poskytuje izolované nebo homogenní flt3-L polypeptidy, jak rekombinantní tak nerekombinantní. Varianty a deriváty nativních flt3-L proteinů, které si udržují požadovanou biologickou aktivitu (např. schopnost vázat flt3-L) mohou být získány mutacemi nukleotidových sekvencí, kodujících nativní flt3-L polypeptidy. Změny nativní aminokyselinové sekvence mohou být provedeny jakoukoliv z mnoha známých metod. Mutace mohou být zavedeny do určitého místa syntézou oligonukleotidů, obsahujících mutantní sekvenci, lemovanou restričními místy

umožňujícími ligaci k fragmentům nativní sekvence. Po ligaci výsledná rekonstruovaná sekvence koduje analog, mající požadovanou aminokyselinovou inzerci, substituci nebo deleci.

Alternativně postupy oligonukleotid-místně řízené-specifické mutagenese mohou být použity pro poskytnutí změněného genu, kde předem stanovené kodony byly změněny substitucí, delecí nebo inzercí. Příklady metod provedení změn uvedených výše, jsou popsány Walderem a spol. (*Gene* 42:133, 1986); Bauerem a spol. (*Gene* 37:73, 1985); Craikem (*BioTechniques*, leden 1985, 12-19); Smithem a spol. (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); Kunkelem (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985); Kunkelem a spol. (*Methods in Enzymol.* 154:367, 1987) a-US patenty č. 4518584 a 4737462, které zde jsou popsány jako odkaz.

Flt-L může být modifikován pro vytvoření flt3-L derivátů tvorbou kovalentních nebo agregativních konjugátů s jinými chemickými skupinami jako jsou glykosylové skupiny, lipidy, fosfáty, acetylové skupiny a podobně. Kovalentní deriváty flt3-L mohou být připraveny spojením chemických skupin s funkčními skupinami na flt3-L aminokyselinové postranních řetězcích nebo na N-konci nebo C-konci flt3-L polypeptidu nebo jeho extracelulární domény. Jiné deriváty flt3-L v rozsahu tohoto vynálezu zahrnují kovalentní nebo agregativní konjugáty flt3-L nebo jeho fragmentů s jinými proteiny nebo polypeptidy, jako při syntéze v rekombinantní kultuře jako N-terminální nebo C-terminální fuze. Například konjugát může obsahovat signální nebo leader polypeptidovou sekvenci (např. α -faktor leader sekvenci *Saccharomyces*) na N-konci flt3-L polypeptidu. Signální nebo leader peptid ko-translačně nebo post-translačně řídí transfer konjugátu z místa jeho syntézy do místa uvnitř nebo mimo buněčnou membránu nebo buněčnou stěnu.

Flt3-L polypeptidové fúze mohou obsahovat peptidy přidané pro usnadnění čištění a identifikaci flt3-L. takové peptidy zahrnují, například poly-His nebo antigenní identifikační peptidy popsané v US patentu č. 5011912 a v práci Hoppa a spol., *BiolTechnology* 6:1204, 1988.

Vynález dále zahrnuje flt3-L polypeptidy s nebo bez asociovaného nativního typu glykosylace. Flt3-L exprimovaný v savčím expresivním systému (např. COS-7 buňky) může být podobný nebo se může lišit od nativního flt3-L polypeptidu molekulovou hmotností a typem glykosylace v závislosti na volbě expresivního systému. Expresie flt3-L polypeptidů v bakteriálních expresivních systémech, jako je *E.coli*, poskytuje neglykosylované molekuly.

Ekvivalentní DNA konstrukty, které kodují různé adice nebo substituce aminokyselinových zbytků nebo sekvencí, nebo delece terminálních nebo vnitřních zbytků nebo sekvence ne nezbytné pro biologickou aktivitu nebo vazbu, jsou zahrnuty do vynálezu. Například N-glykosylační místa v flt3-L extracelulární doméně mohou být modifikována pro zabránění glykosylace, což umožní expresi redukovaného karbohydrátového analogu vsavčích a kvasinkových expresivních systémech. N-glykosylační místa v eukaryotických polypeptidech jsou charakterizována aminokyselinovým tripletem Asn-X-Y, kde X je jakákoliv aminokyselina s výjimkou Pro a Y je Ser nebo Thr. Myší a lidské flt3-L proteiny každý mohou obsahovat dva takové triplety, při aminokyselinách 127-129 a 152-154 SEQ ID NO:2 a při aminokyselinách 126-128 a 150-152 SEQ ID NO:6. Vhodné substituce, adice nebo delece nukleotidové sekvence, kodující tyto triplety budou vést k ochraně před připojením karbohydrátových zbytků na Asn postranní řetězce. Změna jednotlivého nukleotidu, zvolená tak, že se Asn nahradí například odlišnou aminokyselinou, je dostačující k inaktivaci

N-glykosylačního místa. Známé postupy pro inaktivaci N-glykosylačních míst zahrnují ty, které jsou popsány v US patentu č. 5071972 a EP 276846, které zde jsou zahrnuty jako odkazy.

V jiném případě, sekvence, kodující Cys zbytek, které nejsou podstatné pro biologickou aktivitu, mohou být změněny tak, že Cys zbytky budou deletovány nebo nahrazeny jinými aminokyselinami, což brání tvorbě nesprávných intramolekulárních disulfidových můstků po renaturaci. Jiné ekvivalenty jsou připraveny modifikací přilehlých dibázických aminokyselinových zbytků pro zvýšení exprese ve kvasinkových systémech, ve kterých je přítomna KEX2 proteasová aktivita. EP 212914 popisuje použití místně specifické mutagenese pro inaktivaci KEX2 proteasou pracovaných míst v proteinu. KEX2 proteasová místa pro úpravu jsou inaktivována delecí, adicí nebo substitucí zbytků pro změnu Arg-Arg, Arg-Lys a Lys-Arg párů pro odstranění výskytu těchto přiléhajících bázičických zbytků. Lys-Lys páry jsou považovány za méně náchylné k KEX2 štěpení a konverze Arg/Lys nebo Lys/Arg na Lys/Lys představuje konzervativní a preferované přiblížení k inaktivaci KEX2 míst. Jak myši tak lidský flt3-L obsahuje dvě KEX2 proteasová místa pro úpravu u aminokyselin 216-217 a 217-218 v SEQ ID NO:2 a při aminokyselinách 211-212 a 212-213 v SEQ ID NO:6.

Nukleokyselinové sekvence v rozsahu vynálezu zahrnují izolované DNA a RNA sekvence, které hybridizují k nativním flt3-L nukleotidovým sekvencím popsaným zde za mírných nebo ostrých podmínek a které kodují biologicky aktivní SEQ ID NO:.. Podmínky mírné hybridizace, jak je definována Sambrookem a spol. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.vyd.sv.1 str.1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), zahrnují použití předpromývacího roztoku 5 X SSC, 0,5% SDS,

1,0 mM EDTA (pH 8,0) a hybridizační podmínky asi 55 °C, 5 X SSC, přes noc. Podmínky přísné hybridizace zahrnují vyšší teploty hybridizace a promývání. Odborníkům v oboru bude zřejmé, že teplota a koncentrace promývacího roztoku mohou být upraveny podle potřeby v závislosti na takových faktorech jako je délka sondy. Díky známé degeneraci genetického kodu, kdy více než jeden kodon může kodovat stejnou aminokyselinu, může se DNA sekvence lišit od té, která je uvedena v SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:5 a ještě kodovat flt3-L protein, mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:6. Taková varianta DNA sekvence může vzniknout z tichých mutací (např. objevujících se během PCR amplifikace), nebo může být produktem uvážené mutagenese nativní sekvence.

Vynález poskytuje ekvivalentní izolované DNA sekvence, kodující biologicky aktivní flt3-L, vybrané z: (a) DNA odvozené od kodujícího regionu nativního flt3-L genu; (b) cDNA, obsahující nukleotidovou sekvenci přítomnou v SEQ ID NO:1 nebo SEQ ID NO:5; (c) DNA schopnou hybridizace k DNA z (a) za mírně přísných podmínek a která koduje biologicky aktivní flt3-L; a (d) DNA, která je degenerována jako výsledek genetického kodu k DNA definované v (a), (b) nebo (c) a která koduje biologicky aktivní flt3-L. Flt3-L proteiny kodované takovými DNA ekvivalentními sekvencemi jsou zahrnuty ve vynálezu.

DNA, které jsou ekvivalentní k DNA sekvenci SEQ ID NO:1 nebo SEQ ID NO:5 budou hybridizovat za mírně přísných podmínek k nativní DNA sekvenci, která koduje polypeptidy, zahrnující aminokyselinové sekvence 28 až 163 ze SEQ ID NO:2 nebo 28 až 160 ze SEQ ID NO:6. Příklady flt3-L proteinů, kodovaných takovými DNA zahrnují, ale nejsou tak omezeny, flt3-L fragmenty (rozpuštěné nebo membránově vázané) a flt3-L

proteiny, obsahující inaktivovaná N-glykosylační místo(a), inaktivovaná KEX2 proteásová upravovací místa, nebo konzervativní substituci(e) aminokyselin, jak jsou popsány výše. Flt3-L proteiny kodované DNA získanou ze savčích druhů, kde DNA bude hybridizovat k cDNA ze SEQ ID NO:1 nebo SEQ ID NO:5, jsou také zahrnuty do rozsahu vynálezu.

Varianty umožňující potřebnou schopnost vázat flt3-L receptor mohou být identifikovány jakoukoliv vhodnou zkouškou. Biologická aktivita flt3-L může být stanovena, například, kompeticí o navázání k liganové vazebné doméně flt3-L receptoru (tj. kompetitivní vazebnou zkouškou).

Jeden typ kompetitivní vazebné zkoušky pro flt3-L polypeptid využívá radioaktivně značeného, rozpustného lidského flt3-L a intaktních buněk exprimujících buněčné povrchové flt3-L receptory. Místo intaktních buněk by mohly být nahrazeny rozpustné flt3-L receptory (jako je flt:Fc fuzní protein) navázané k pevné fázi přes interakci proteinu A, proteinu G nebo protilátek k flt3 nebo Fc částem molekuly, Fc regionem fuzního proteinu. Jiný typ kompetitivní vazebné zkoušky využívá radioaktivně značené rozpustné flt3 receptory jako je flt3:Fc fuzní protein a intaktní buňky, exprimující flt3-L. Alternativně by mohly být flt3-L navázány k pevné fázi k pozitivnímu výběru flt3 exprimujících buněk.

Kompetitivní vazebné zkoušky mohou být provedeny za použití následující běžné metodiky. Například může být radioaktivně značený flt3-L použit pro soutěž s domnělým flt3-L homologem pro zkoušku vazebné aktivity proti povrchově navázaným flt3-L receptorům. Kvalitativní výsledky mohou být získány kompetitivní autoradiografickou plotnovou vazebnou zkouškou, nebo mohou být použity Scatchardovy grafy pro

generování kvantitativních výsledků.

Alternativně, flt3-L vazebné proteiny jako je flt3-L a anti-flt3 protilátky, mohou být navázány k pevné fázi jako je matrice ve sloupcové chromatografii nebo podobný substrát vhodný pro identifikaci, separaci nebo čištění buněk, které exprimují flt3 receptor na svém povrchu. Navázání flt3-L vazebných proteinů k pevnému fázovému kontaktnímu povrchu může být provedeno jakýmkoliv prostředky, například, konstrukcí flt3-Fc fuzního proteinu a jeho navázáním k pevné fázi přes interakci proteinu A nebo proteinu G. Různé jiné prostředky pro fixaci proteinů k pevné fázi jsou v oboru dobře známé a jsou vhodné pro použití v předloženém vynálezu. Například mohou být magnetické mikrosféry potaženy flt3-vazebnými proteiny a udržovány v inkubační nádobě v magnetickém poli. Suspenze buněčných směsí, obsahující hematopoietické progenitorové nebo kmenové buňky jsou uvedeny do kontaktu s pevnou fází, která má na sobě flt3-vazebné proteiny. Buňky, mající flt3 receptor na svém povrchu se vážou k fixovanému flt3 vazebnému proteinu a nenavázané buňky se odstraní promytím. Tato afinitní vazebná metoda je vhodná pro čištění, screening nebo separaci takových flt3-exprimujících buněk z roztoku. Způsoby uvolnění pozitivně vybraných buněk z pevné fáze jsou v oboru známé a zahrnují, například, použití enzymů. Takové enzymy jsou výhodně netoxické a nepoškozující buňky a jsou výhodně řízeny na štěpení vazebného partnera buněčného povrchu. V případě flt3:flt3-L interakcí by měl enzym výhodně štěpit flt3 receptor a tím uvolnit výslednou buněčnou suspenzi z "cizího" flt3-L materiálu. Čištěná buněčná populace pak může být expandována ex vivo před transplantací pacientovi v množství dostačujícím k rekonstituci pacientova hematopoietického a imunitního systému.

Alternativně mohou být směsi buněk, o kterých se předpokládá, že obsahují flt3⁺ buňky, nejprve inkubovány s biotinylovaným flt3-vazebným proteinem. Inkubační periody jsou typicky trvají alespoň jednu hodinu pro dosažení dostatečného navázání k flt3. Výsledná směs pak projde kolonou naplněnou avidinem potaženými kuličkami, přičemž vysoká afinita biotinu k avidinu poskytne navázání buněk ke kuličkám. Použití avidinem potažených kuliček je v oboru známé. Viz Berenson a spol. *J.Cell.Biochem.*, 10D:239 (1986). Vymytí nenavázaného materiálu a uvolnění navázaných buněk se provede za použití konvenčních metod.

V metodách popsaných výše jsou vhodné flt3-vazebné proteiny flt3-L, anti-flt3 protilátky a jiné proteiny, které jsou schopné vysoce afinitní vazby flt3. Preferovaným flt3-vazebným proteinem je flt3-L.

Jak je popsáno výše, může být flt3-L podle vynálezu použit k oddělení buněk, exprimujících flt3 receptory. V alternativní metodě mohou být flt3-L nebo jejich extracelulární doména nebo fragment konjugovány k detegovatelné skupině jako je ¹²⁵I pro detekci flt3 exprimujících buněk. Radioaktivní značení s ¹²⁵I může být provedeno jakoukoliv ze známých metod, které poskytnou funkční ¹²⁵I-flt3-L molekulu značenou k vysoké specifické aktivitě. Nebo může být použit jodovaná nebo biotinylovaná protilátka vůči flt3 regionu nebo Fc regionu molekuly. Jiná detegovatelná skupina jako je enzym, který může katalyzovat kolorimetrickou nebo fluorometrickou reakci, biotin nebo avidin, může být použit. Buňky, které jsou testovány na flt3 receptorovou expresi mohou být kontaktovány se značeným flt3-L. Po inkubaci se nenavázaný flt3-L odstraní a navázání se měří použitím detegovatelné skupiny.

Vazebné charakteristiky flt3-L (včetně variant) mohou být také stanoveny za použití konjugovaných, rozpustných flt3 receptorů (například ^{125}I -flt3:Fc) v kompetiční zkoušce podobné té, která je popsána výše. V tomto případě se intaktní buňky, exprimující flt3 receptor, nebo rozpustné flt3 receptory navázané k pevnému substrátu, použijí k měření rozsahu, v jakém vzorek, obsahující domnělou flt3-L variantu soutěží v navázání s konjugovaným rozpustným flt3 k flt3-L.

Jiné způsoby zkoušení flt3-L zahrnují použití anti-flt3-L protilátek, buněčných linií, které proliferují v odpovědi na flt3-L, nebo rekombinantních buněčných linií, které exprimují flt3 receptor a proliferují za přítomnosti flt3-L. Například BAF/BO3 buněčná linie postrádá flt3 receptor a je IL-3 závislá (viz Hatakeyama a spol., *Cell*, 59:837-845 (1989)). BAF/BO3 buňky transfektované s expresivním vektorem, obsahujícím flt3 receptor gen proliferují v odpovědi buď na IL-3 nebo flt3-L. Příkladem vhodného expresivního vektoru pro transfekci flt3 je pCAV/NOT plasmid, viz Moosley a spol., *Cell*, 59:335-348(1989).

Flt3-L polypeptidy mohou existovat jako oligomery, to jest jako kovalentně navázané nebo nekovalentně navázané dimery nebo trimery. Oligomery mohou být navázaný disulfidovými vazbami vytvořenými mezi cysteinovými zbytky na různých flt3-L polypeptidech. V jednom provedení vynálezu je flt3-L dimer vytvořen fuzováním flt3-L k Fc regionu protilátky (např. IgG) způsobem, který neinterferuje s vazbou flt3-L k flt3-ligand-vazebné doméně. Fc polypeptid je výhodně fuzován k C-konci rozpustného flt3-L (obsahujícího pouze extracelulární doménu). Obecná příprava fuzních proteinů, obsahujících heterologní polypeptidy fuzované k různým částem z protilátek odvozených polypeptidů (včetně Fc domény) byla popsána např. Ashkenazim a spol. (*PNAS USA* 88:10535, 1991) a

Byrnem a spol. (*Nature* 344:677, 1990) - práce je zde uvedena jako odkaz. Genová fuze, kodující flt3-L:Fc fuzní protein je inzertována do vhodného expresivního vektoru. Flt-L:Fc fuzní proteiny jsou ponechány k vytvoření molekul podobnějších protilátce, přičemž se vytvoří mezi meziřetězcové disulfidové vazby mezi Fc polypeptidy, za vzniku divalentního flt3-L. Jsou-li fuzní proteiny vyrobeny s oběma těžkými a lehkými řetězci protilátky, je možné vytvořit flt3-L oligomer s až čtyřmi flt3-L extracelulárními regiony. Alternativně je možno spojit dvě rozpustné flt3-L domény s peptidovým linkerem.

Rekombinantní expresivní vektory, obsahující DNA, kodující flt3-L mohou být připraveny za použití známých metod. Expresivní vektory zahrnují flt3-L DNA sekvenci operabilně připojenou ke vhodným transkripčním nebo translačním regulátorovým nukleotidovým sekvencím, jako jsou ty, které jsou odvozeny ze savčích, mikrobiálních, virálních nebo hmyzích genů. Příklady regulátorových sekvencí zahrnují transkripční promotory, operátory nebo enhancery, mRNA ribosomální vazebné místo a vhodné sekvence, které kontrolují transkripční a translační iniciaci a terminaci. Nukleotidové sekvence jsou "operabilně připojeny", když se regulátorová sekvence funkčně vztahuje k flt3-L DNA sekvenci. Tak je promotorová nukleotidová sekvence operabilně připojena k flt3-L DNA sekvenci, když promotorová nukleotidová sekvence kontroluje transkripci flt3-L DNA sekvence. Schopnost se replikovat v požadovaných hostitelských buňkách, obvykle propůjčená počátkem replikace a výběrem genu, kterým jsou transformanty identifikovány, může být dále inkorporována do expresivního vektoru.

Dále, sekvence, kodující vhodné signální peptidy, které nejsou přirozeně spojené s flt3-L mohou být inkorporovány do

specifický k maturovaným B buňkám ; S7 (CD43) marker, který je marker časných B buněk; antigen-1 kmenových buněk (Stem Cell Antigen-1 - SCA-1) marker, který je markerem aktivovaných T buněk a B buněk; CD4, který je markerem pro helper T buňky a některé kmenové buňky; a Mac-1 marker, který je specifický k makrofágům, za použití známých protilátek proti takovým markerům. Následující tabulka IV ukazuje údaje získané ze screeningu kostní dřene. Dvě transgenní myši ze stejného vrhu byly analyzovány proti normální myši ze stejného vrhu (kontrola) a nepříbuzné normální myši (kontrola).

Tabulka IV

Vliv flt3-L nadměrné exprese v transgenní myši

marker	Procenta pozitivních buněk			
	nepříbuzný kontrola	stejný vrh kontrola	transgenní #1	transgenní #2
B220	30,64	27,17	45,84	48,78
sIgM	3,54	2,41	1,94	1,14
S7(CD43)	54,43	45,44	46,11	50,59
SCA-1	10,92	11,74	19,45	27,37
CD4	6,94	8,72	12,21	14,05
Mac-1	36,80	27,15	21,39	18,63

Výše uvedená data indikují, že flt3-L nadměrná exprese v myši vede ke zvýšení počtu B buněk, jak je indikováno zvýšení B220⁺ buněk a SCA-1⁺ buněk. Analýza B220⁺ buněk pomocí FACS indikuje zvýšení v proB buňkách (HSA⁻, S7⁺). Zvýšení v CD4⁺ buňkách představuje přibližně dvojnásobné zvýšení v T buňkách a kmenových buňkách. Snížení v buňkách, majících sIgM marker indikuje, že flt3-L nestimuluje proliferaci maturovaných B buněk. Tyto údaje indikují, že flt3-L zvyšuje buňky s fenotypem kmenových buněk, T buněk nebo časných B buněk a

Tabulka III

Erythroidová buněčná proliferace v flt3-L nadměrně exprimující slezině transgenní myši

Mys	životoschopné buňky celkem (milion buněk/ml)	bílé krvinky celkem (milion buněk/ml)	červené krvinky celkem (milion buněk/ml)
kontr.1	29,7	27	2,7
kontr.2	31	24,6	6,4
trans- genní 1	44,7	25,6	19,1
trans- genní 2	37,3	28,4	8,9

Z tabulky III je zřejmé, že počty bílých krvinek na mililitr byly přibližně stejné jako u kontrolní myši. Počty červených krvinek ze sleziny dvou transgenních myši však byly přibližně dva až trojnásobně větší než byly zjištěny u kontrolní myši. Flt3-L stimuluje zvýšení buněk erythroidní linie, možná přes stimulaci erythroidních progenitorových buněk, stimulaci buněk, které produkují erythropoietin nebo blokováním mechanismu, který inhibuje erythropoiesis.

Příklad 11

Flt3-L stimuluje proliferaci T buněk a časných B buněk

Kostní dřen 9 týdnů staré transgenní myši generované podle příkladu 9 byla screenována na přítomnost různých T a B buněčných fenotypových markerů za použití protilátek, které jsou imunoreaktivní s takovými markery. Hodnoceny byly následující markery: B220 marker, který je specifický k B-buněčné rodině, povrchový IgM marker (sIgM), který je

den p.c. pseudopregnantní samice. Výhodně se používají první dvě možnosti protože vylučují in vitro kulturu a výhodně přibližně 20-30 mikroinjektovaných vajíček by mělo být transferováno pro vyloučení malých vrhů.

Příklad 10

Flt3-L stimulovaná proliferace erythroidových buněk ve slezině

Tento příklad popisuje vliv flt3-L na produkci erythroidních buněk ve slezině transgenní myši. Transgenní myši byly generovány podle postupu v příkladu 9. Myši byly usmrceny a každá netknutá slezina byla zpracována na jednu buněčnou suspenzi. Suspendované buňky byly odstředěny a resuspendovány v 10 ml media, obsahujícího PBS + 1 % fetálního bovinního séra. Počty buněk byly pak stanoveny pomocí hemocytometru. Každý buněčný vzorek byl počítán s Trypan Blue vybarvením pro získání celkového počtu životaschopných buněk na mililitr media podle následujícího vzorce: $(RBC + WBC)/ml$, kde RBC je počet červených krvinek a WBC znamená počet bílých krvinek. Každý vzorek pak byl spočítán s Turkovým vybarvením pro získání celkového počtu bílých krvinek na mililitr media. Celkový počet červených krvinek na mililitr byl vypočten pro každý vzorek odečtením celkového počtu bílých krvinek na mililitr od celkového počtu žijících buněk na mililitr. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce III.

který je řezán Asp718-NotI.

Flt3-L:Fc fuzní proteiny jsou syntetizovány v rekombinantní savčí buněčné kultuře. Flt3-L:Fc fúzi obsahující expresivní vektor je pak transfektován do CV-1 buněk (ATCC CCL 70) nebo COS-7 buněk (ATCC CRL 1651). Exprese ve 293 buňkách (transformovaných primárních lidských embryonálních ledvinových buňkách, ATCC CRL 1573) je také proveditelná.

293 buněk transfektovaných s pCAV/NOT/flt3-L:Fc vektorem se kultivuje v otočných nádobách pro umožnění přechodné exprese fuzního proteinu, který je sekretován do kultivačního media přes flt3-L signální peptid. fuzní protein může být čištěn na protein a sepharose kolonách.

Příklad 9

Generování transgenní myši, která nadměrně exprimuje flt3-L

Tento příklad popisuje postup použitý pro získání transgenní myši, která nadměrně exprimuje flt3-L. flt3-L-nadměrně exprimující myši byly studovány pro stanovení biologických účinků nadměrné exprese. Myši (B16/1) pronuklea byla mikroinjektována s flt3-L Dna podle metody popsané Gordonem a spol., *Science* 214:1244-1246 (1986). Obecně oplodněná myš vajíčka mající viditelný pronukleus byla nejprve umístěna do injekční komůrky a držena na místě malou pipetou. Injekční pipeta pak byla použita pro onjektování genu kodujícího flt3-L (klon #6C) do pronuklea vajíčka. Injektovaná vajíčka byla pak buď (i) transferována do vejcovodu 0,5 den p.c. pseudopregnantní samice; (ii) kultivována in vitro do dvoubuněčného stadia (přes noc) a přenesena do vejcovodu 0,5 den p.c. pseudopregnantní samice, nebo (iii) kultivována in vitro do blastocytového stadia a transferována do dělohy 2,5

Fc region lidské IgG1 protilátky je klonována do SpeI místa pBLUESCRIPT SKR vektoru, který je komerčně dostupný od Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Kalifornie. Tento plasmidový vektor je replikovatelný v E.coli a obsahuje polylinkerový segment, který zahrnuje 21 unikátních restrikčních míst. Unikátní BglII místo se pak zavede blízko 5' konce inzertované Fc kodující sekvence, takže BglII místo zahrnuje kodony pro aminokyseliny tři a čtyři Fc polypeptidu.

Kodovaný Fc polypeptid se rozkládá od N-terminální pantové oblasti k nativnímu C-konci, tj. má v podstatě plnou délku protilátkového Fc regionu. Fragmenty Fc regionů, např. ty, které jsou zkráceny na C-terminálním konci, mohou být také použity. Fragmenty výhodně obsahují násobné cysteinové zbytky (alespoň cysteinové zbytky v pantovém regionu) pro zprostředkování vytvoření meziřetězcových disulfidových vazeb mezi Fc polypeptidovou částí dvou separátních flt3-L:Fc fuzních proteinů za tvorby dimerů.

Asp718-StuI parciální cDNA z flt3-L v pCAV/NOT může být klonována do Asp718-SpeI místa pBLUESCRIPT SKR vektoru, obsahujícího Fc cDNA, takže je flt3-L cDNA umístěna proti směru Fc cDNA. Sekvence jednořetězcové DNA získané z výsledné genové fúze může být uskutečněna templáty řízenou mutagenezí popsanou Kunkelem (*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:488, 1985) a Kunkelem a spol (*Methods in Enzymol.* 154:367, 1987) za účelem perfektní fúze celé extracelulární domény flt3-L k Fc sekvenci. Výsledná DNA může pak být sekvencována pro potvrzení, že jsou odstraněny správné nukleotidy (tj. transmembránový region a částečně cytoplasmické doménová DNA jsou vypuštěny) a že flt3-L a Fc sekvence jsou ve stejném čtecím rámci. Fúzní cDNA se pak vyřízne a inzertuje za použití konvenčních metod do savčího expresního vektoru pCAV/NOT,

Tabulka II

Vliv proliferace flt3-L a IL-3 na proliferaci c-kit⁺buněk

	faktor			
	kontrola (samotný vektor)	flt3-L	IL-3	flt3-L+IL-3
[³ H]-thymidinová inkorporace (CPM)	100	1800	3000	9000

Kultivační supernatanty z CV1/EBNA buněk transfektovaných s flt3-L cDNA stimulují proliferaci c-kit⁺ kmenových buněk přibližně 18krát více než kultivační supernatant CV1/EBNA buněk transfektovaných se samotným expresivním vektorem. Přídavek IL-3 k flt3-L obsahujícímu supernatantu vykazuje sanergický účinek s pozorovaným přibližně dvojnásobným stupněm proliferace než by bylo možno očekávat při aditivních vlivech.

Příklad 8

Konstrukce flt3:Fc fuzního proteinu

Tento příklad popisuje způsob konstrukce fuzního proteinu, obsahujícího extracelulární region flt3-L a Fc doménu lidského imunoglobulinu. Způsoby jsou v podstatě stejné jak byly popsány v příkladu 1 pro konstrukci flt3:Fc proteinu.

Před fuzováním cDNA k N-konci cDNA kodující Fc část molekuly lidského IgG1 cDNA fragment je inzertován do Asp718-NotI místa pCAV/NOT, popsaného v PCT přihlášce WO 90/0513. DNA, kodující jediný řetězec polypeptidu, obsahující

Zkouška hematopoiesis

Proliferace c-kit⁺ kmenových buněk; fetálních jaterních buněk AA4.1⁺ buněk byla zkoušena pomocí [³H]-thymidinové inkorporace v podstatě jak popsal DeVries a spol., *J. Exp. Med.*, 173:1205-1211, 1991. Čištěné c-kit⁺ kmenové buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře s nasycenou vlhkostí 6,5 % CO₂ a 7 % O₂ ve vzduchu po 96 hodin. Myší rekombinantní IL-3 byl použit k konečné koncentraci 100 ng/ml. Potom byly buňky pulzovány se 3 μCi na jamku [³H]-thymidinu (81 Ci/mmol; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) a inkubovány dalších 24 hodin. AA4.1⁺ buňky (přibližně 20000 buněk/jamka) byly inkubovány v IL-7, flt3-L a flt3-L1 +IL-7 48 hodin s následujícím [³H]-thymidinovým pulzem po šest hodin. Výsledky flt3-L a IL-7 jsou uvedeny v tabulce I a výsledky flt3-L a IL-3 jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka I

Vliv flt3-L a IL-7 na proliferaci AA4.1+fetálních jaterních buněk

	faktor			
	kontrola	flt3-L	IL-7	flt3-L+IL-7
[³ H]-thymidinová inkorporace (CPM)	100	1000	100	4200

Kombinace flt3-L a IL-7 produkuje odezvu, která byla přibližně čtyřikrát větší než flt3-L samotného a přibližně 40krát větší než u IL-7 samotného.

pak promyty intenzivně PBS plus 1 % FBS před použitím. Jediná suspenze jaterních buněk byla přidána v množství 10^7 buněk/miska v PBS plus 1 % FBS a ponechána adherovat k plotnám po dvě hodiny při 4 °C. Plotny byly intenzivně promyty a adherované buňky byly sklizeny seškrábáním pro analýzu nebo další použití v hematopoietické zkoušce popsané dále. FACS analýza za použití AA4.1 protilátky demonstruje > 95 % AA4.1⁺ buněčné populace.

C-kit⁺ pluripotentní kmenové buňky byly čištěny z kostní dřevě dospělé myši (de Vries a spol., *J. Exp. Med.*, 176:1503-1509, 1992 a Visser a de Vries, *Methods in Cell Biol.*, 1993). Nízkohustotní buňky ($\leq 1,078$ g/cm³) pozitivní pro-~~lektinový~~ aglutinin⁻pšeničných kličků a negativní pro antigeny rozpoznávané B220 a 15-1.4.1 (Visser a spol., *Meth. in Cell Biol.*, 33:451-468, 1990) monoklonální protilátky mohly být rozděleny do subpopulací buněk které exprimují a neexprimují c-kit za použití biotinylovaného Steel faktoru. c-kit⁺ frakce byla zjištěna jako obsahující pluripotentní hematopoietické kmenové buňky (de Vries a spol., *Science* 255:989-991, 1992; Visser a de Vries, *Methods in Cell Biol.*, 1993 a Ware a spol., 1993).

AA4.1⁺ fetální jaterní buňky byly kultivovány v rekombinantním IL-7 (US patent č. 4965195) při 100 ng/ml a rekombinantním flt3-L při 250 ng/ml. Flt3-L byl použit ve třech různých formách v pokusech: (1) jako přítomný na fixovaných, flt3-L transfektovaných CV1/EBNA buňkách, (2) jako koncentrované kulturní supernatanty ze stejných flt3-L transfektovaných CV1/EBNA buněk a (3) jako čištěný a izolovaný polypeptidový přípravek z kvasinkového supernatantu jak je popsán v příkladu 5.

buněk.

Hybridomové buňky jsou screenovány ELISA na reaktivitu průti čistěnému flt3-L adaptací technik popsaných v Engvall a spol. Immunochem, 8:871,1971 a v US patentu 4703004. Preferovanou technikou je technika čepičkování protilátky popsaná Beckmannem a spol. (*J.Immunol.* 144:4212, 1990). Pozitivní hybridomové buňky mohou být injektovány intraperitoneálně do syngenní BALB/c myši pro produkci ascitů, obsahujících vysoké koncentrace anti-flt3-L monoklonálních protilátek. Alternativně mohou hybridomové buňky růst in vitro v baňkách nebo rotačních nádobách za různých technik. Monoklonální protilátky produkované v myších ascitech mohou být čištěny srážením síranem amonným s následující gelovou vylučovací chromatografií. Alternativně může být také použita afinitní chromatografie založená na vazbě protilátek k proteinu A nebo proteinu G, i afinitní chromatografie založená na vazbě k flt3-L.

Příklad 7

Použití flt3-L samotného a v kombinaci s IL-7 nebo IL-3

Tento příklad demonstruje stimulaci a proliferaci AA4.1⁺ fetálních jaterních buněk kompozicemi, obsahujícími flt3-L a IL-7 jakož i stimulaci a proliferaci c-kit-pozitivních (c-kit⁺) buněk kompozicemi, obsahujícími flt3-L a IL-3.

AA4.1-pozitivní (AA4.1⁺) exprimující buňky byly izolovány z jater čtrnáctý den fetální C57BL/6 myši umístěním buněk v Outilux 100 mm plastových Petriho miskách (Falcon č. 1001, Oxnard, CA). Plotny byly potaženy přes noc při 4 °C v PBS plus 0,1% fetálním hovězím sérem (FBS), obsahujícím 10 µg/ml AA4.1 protilátky (McKearn a spol, *J.Immunol.*, 132:332-339, 1984) a

Příklad 6

Monoklonální protilátky k flt3-L

Tento příklad ilustruje způsob přípravy monoklonálních protilátek k flt3-L. Flt3-L je exprimován v savčích hostitelských buňkách jako jsou COS-7 nebo CV-1/EBNA-1 buňky a čištěn použitím flt3:Fc afinitní chromatografie. Čištěný flt3-L, jeho fragment jako je extracelulární doména, syntetické peptidy nebo buňky, které exprimují flt3-L mohou být použity pro vytvoření monoklonálních protilátek proti flt3-L za použití konvenčních technik, například jak jsou popsány v US patentu 4411993. Stručně, myši se imunizují flt3-L jako imunogenem emulgovaným v kompletním Freudově adjuvansu a injektovaným v množstvích od 10 do 100 μg subkutánně nebo intraperitoneálně. O deset až dvanáct dní později se zvířatům podá booster dalšího flt3-L emulgovaného v nekompletním Freudově adjuvansu. Myši se periodicky upomínají po jednom až dvou týdnech imunizačního harmonogramu. Vzorky séra se periodicky odebírají retro-orbitálním odebíráním krve nebo zářezem na špičce ocasu pro testování na flt3-L protilátky pomocí "dot-blot" zkoušky, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) nebo inhibiči flt3 vazby.

PO detekci vhodného protilátkového titru je pozitivním zvířatům podána jedna poslední intravenózní injekce flt3-L v salinickém roztoku. Tři až čtyři dny poté jsou zvířata usmrcena, odebrány slezinové buňky a slezinové buňky jsou fuzovány k myši myelomové buněčné linii, např. NS1 nebo výhodně P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Fúze generují hybridomové buňky, které jsou umístěny na multiple mikrotitrační plotny v HAT (hypoxanthin, aminopterin a thymidin) selektivním mediu pro inhibiči proliferace nefuzovaných buněk, myeloma hybridů a hybridů slezinných

peptidy 26 a 27 aminokyselin); 23 aminokyselinovou transmembránovou doménu a 30 aminokyselinovou cytoplasmickou doménu. Lidský flt3-L vykazuje nad 72 % aminokyselinovou identitu a 78% aminokyselinovou podobnost s myším flt3-L. Vektor pBLUESCRIPT SK(-), obsahující lidský flt3-L cDNA klon #9 byl deponován v American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (ATCC) 6.srpna 1993 a označen přírůstkovým číslem ATCC 69382. Deponování bylo provedeno podle pravidel Budapeštské smlouvy.

Příklad 1

Expresi flt3-L ve kvasinkách

Pro expresi rozpustného flt3-L ve kvasinkách byly použity syntetické oligonukleotidové primery pro amplifikaci pomocí PCR (Mullis a Faloona, *Meth.Enzymol.* 155:335-350, 1987) celé extracelulární kodující domény flt3-L mezi konec signálního peptidu a počátek transmembránového segmentu. 5' primer (5'-AATTGGTACCTTTGGATAAAAGAGACTACAAGGACGACGATGACAAGACA-CCTGACTGTTACTTCAGCCAC-3') SEQ ID NO:7 kodující část alfa faktor leaderu a antigenního oktapeptidu FLAG sekvenci fuzovanou v rámci s předpovězeným maturovaným N-koncem flt3-L. 3' oligonukleotid (5'-ATATGGATCCCTACTGCCTGGGCCGAGCTCTGGGAG-3') SEQ ID NO:8 vytváří terminační kodon po Gln-189 právě v domnělém transmembránovém regionu. PCR-generovaný DNA fragment byl ligován do kvasinkového expresivního vektoru (pro expresi v *K.lactis*), který řídí sekreci rekombinantního produktu ve kvasinkovém mediu (Fleere a spol., *Gene*, 107:285-195 (1991)); a van den Berg a spol., *Bio/Technology* 8:135-139 (1990)). FLAG:flt3-L fuzní protein byl čištěn ze kvasinkové pudy afinitní chromatografií jak popsáno dříve (Hopp a spol., *Biotechnology*, 6:1204-1210, 1988).

Příklad 4

Klonování cDNA kodující lidský flt3-L

cDNA, kodující lidský flt3-L byla klonována z lidského klonu 22 T buněk lambdagt10 náhodně primované cDNA knihovny jak popsal Sims a spol., *PNAS*, 86:8946-8950 (1989). Knihovna byla screenována se 413 bp *Ple I* fragmentem, odpovídajícím extracelulární doméně myšičí flt3-L (nukleotidy 103-516 SEQ ID NO:1). Fragment byl náhodně primován, hybridizován přes noc ke knihovnovým filtrům při 55 °C v oligo prehybridizačním pufru. Fragment byl pak promyt při 55 °C 2x SSC/0,1% SDS po 1 hodinu, potom 1 x SSC/0,1% SDS po 1 hodinu a pak 0,5 x SSC/0,1% SDS po jednu hodinu. DNA z pozitivních fágových plaků byla extrahována a inzerty byly amplifikovány PCR za použití oligonukleotidů specifických pro fágová raménka. DNA pak byla sekvencována a sekvence pro klon #9 je uvedena v SEQ ID NO:5. Další lidská flt3-L cDNA byla izolována ze stejné lambdagt10 náhodně primované cDNA knihovny jak je popsána výše screeningem knihovny s fragmentem extracelulární domény myšičí klon #5H cDNA, obsahující cDNA sekvenci v podstatě odpovídající nukleotidům 128 až 541 SEQ ID NO:1.

Sekvencování 988 bp cDNA klon #9 odhaluje otevřený čtecí rámec 705 bp obklopených 29 bp 5' nekodující sekvence a 250 bp 3' nekodující sekvence. 3' nekodující region neobsahuje poly-A konec. V rámci nejsou žádné stop kodony po směru iniciátoru methioninu. Otevřený čtecí rámec koduje typ I transmembránového proteinu 235 aminokyselin jak je znázorněn aminokyselinami 1-235 SEQ ID NO:6. Protein má N-koncový signální peptid alternativně 26 nebo 27 aminokyselin. Je pravděpodobnější, že N-koncový peptid má 26 aminokyselin spíše než 27 aminokyselin. Signální peptid je následován 156 nebo 155 aminokyselinovou extracelulární doménou (pro signální

cDNA inzert byl sekvencován.

Nukleotid a kodovaná aminokyselinová sekvence kodujícího regionu myši flt3-L cDNA klonu #6C jsou přítomny v SEQ ID NO:1 a 2. cDNA inzert je délky 0,88 kb. Otevřený čtecí rámec v této sekvenci by měl kodovat protein 231 aminokyselin. DNA a kodované aminokyselinové sekvence pro 231-aminokyselinový otevřený čtecí rámec jsou přítomny v SEQ ID NO:1 a 2. Protein SEQ ID NO:2 je typ I transmembránového proteinu, s N-terminálním signálním peptidem (aminokyseliny 1 až 27), extracelulární doménou (aminokyseliny 28-188), transmembránovou doménou (aminokyseliny 189-211) a cytoplasmickou doménou (aminokyseliny 212-231). Předpokládaná molekulová hmotnost nativního proteinu po štěpení signální sekvence je 23,164 daltonů. Zralý protein byl hodnocen pI 9,372. Je zde 56 bp 5' nekodující sekvence a 126 bp 3' nekodující sekvence lemující kodující region, zahrnující přidané cDNA adaptéry. Výše popsany klonovací postup také produkuje myši flt3 ligand klon #5H, který je shodný s #6C klonem, začínající u nukleotidu 49 a pokračující do nukleotidu 545 (odpovídá aminokyselinové sekvenci 163) ze SEQ ID NO:1. #5H klon se zcela liší v přední části a představuje alternativní stříhový konstrukt.

Vektor sfHAV-EO410, obsahující flt3-L cDNA v E.coli DH10B buňkách byl uložen v American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) 20.dubna 1993 pod přírůstkovým číslem ATCC 69286. Uložení bylo provedeno podle Budapeštské smlouvy.

Myší anti-humánní Fc protilátka byla získána od Jackson Laboratorie. Tato protilátka ukazuje minimální vazbu k Fc proteinů, vázaným k Fc γ receptoru. Protilátka byla značena za použití Chloramin T metody. Stručně, byla připravena kolona Sephadex G-25 podle instrukcí výrobce. Kolona byla předem zpracována 10 objemy kolony PBS, obsahujícím 1 % hovězího sérového albuminu pro redukci nespecifické adsorpce protilátky ke koloně a pryskyřici. Nenávázaný hovězí sérový albumin byl pak vymyt z kolony 5 objemy PBS bez hovězího sérového albuminu. V mikroodstředivkové zkumavce bylo 10 μ g protilátky (rozpuštěné v 10 μ l PBS) přidáno k 50 μ l 50 mM pufru fosforečnanu sodného (pH 7,2) 2,0 mCi nosiče prostého Na¹²⁵I bylo přidáno a roztok byl dobře promísen. 15 μ l čerstvě připraveného roztoku chloraminu-T (2 mg/ml v 0,1M pufru fosforečnanu sodného (pH 7,2)) pak bylo přidáno a směs byla inkubována po 30 minut při teplotě místnosti a směs pak ihned byla aplikována na kolonu Sephadexu G-25. Radioaktivně značená protilátka pak byla eluována z kolony za shromažďování 100-150 μ l frakcí eluátu. Hovězí sérový albumin byl přidán k eluovaným frakcím, obsahujícím radioaktivně značenou protilátku na konečnou koncentraci 1 %. Radiojodace poskytla specifické aktivity v rozmezí 5-10 x 10¹⁵ cpm/nmol proteinu.

Pomocí sklíčkové autoradiografie bylo přibližně 1840000 cDNA screenováno v poolech přibližně 1600 cDNA dokud zkouška jednoho transfektantového poolu neukázala mnoho buněk jasně pozitivních pro flt3:Fc vazbu. Tento pool byl pak rozdělen na pooly o 500 a opět screenován sklíčkovou autoradiografií a byl identifikován pozitivní pool. Tento pool byl rozdělen na pooly 100 a opět screenován. Jednotlivé kolonie z tohoto poolu 100 byly screenovány až byl identifikován klon (klon #6C), který řídí syntézu povrchového proteinu s detegovatelnou flt3:Fc vazebnou aktivitou. Tento klon byl izolován a jeho 0,88 kb

minutách s následujícím nahrazením roztoku čerstvým kompletním médiem. Buňky byly kultivovány 2 až 3 dny pro umožnění přechodné exprese inzertovaných sekvencí.

Transfektované monovrstvy CV-1/EBNA-1 buněk byly zkoušeny na expresi flt3-L skličkovou autoradiografií v podstatě tak, jak popsal Gearing a spol. (*EMBO J.* 8:3667, 1989). Transfektované CV-1/EBNA buňky (adherované k děleným skličkům) byly promyty jednou vazebným médiem s odtučněným sušeným mlékem (BM-NFDM) (RPMI medium 1640, obsahující 25 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA), 2 mg/ml azidu sodného, 20 mM HEPES, pH 7,2 a 50 mg/ml odtučněného sušeného mléka). Buňky pak byly inkubovány s flt3:Fc v BM-NFDM (1 µg/ml) po 1 hodinu při teplotě místnosti. Po inkubaci byly buněčné monovrstvy v dělených skličkách promyty třikrát BM-NFDM pro odstranění nenavázaného flt3:Fc fuzního proteinu a pak inkubovány se 40 ng/ml ¹²⁵I- myší anti-humánní Fc protilátky (popsána dále) (ředění 1:50) po 1 hodinu při teplotě místnosti. Buňky byly promyty třikrát s BM-NFDM, potom 2krát promyty fosfátem pufovaným salinickým roztokem (PBS) pro odstranění nenavázané ¹²⁵I-myší anti-humánní Fc protilátky. Buňky byly fixovány inkubací po 30 minut při teplotě místnosti ve 2,5% glutaraldehydu v PBS, pH 7,3, promyty dvakrát v PBS a sušeny na vzduchu. Dělená sklička, obsahující buňky byla vystavena Photorimageru (Molecular Dynamics) přes noc, potom smočena Kodak GTNB-2 fotografickou emulzí (6x ředění ve vodě) a exponována ve tmě po 3-5 dnů při 4 °C v boxu za nepřístupu světla. Sklička pak byla vyvíjena přibližně 4 minuty v Kodak D19 vyvolávacím zařízení (40 g/500 ml vody), promyta vodou a fixována v Agfa G433C fixéru. Sklička byla jednotlivě hodnocena mikroskopem při 25-40násobném zvětšení a pozitivní buňky, exprimující flt3-L byly identifikovány přítomností autoradiografických stříbrných zrn na světlém pozadí.

byl titrován pro stanovení počtu k ampicilinu rezistentních kolonií. Výsledná $0,3A4$ knihovna měla 1,84 milionu klonů.

E.coli kmen DH10B buňky transfektované cDNA knihovnou v sfHAV-EO410 byly umístěny na plotně pro poskytnutí přibližně 1600 kolonií na plotně. Kolonie byly seškrábnuty z každé plotny, spojeny a z každého poolu byla připravena plasmidová DNA. Poolovaná DNA, představující asi 1600 kolonií, pak byla použita pro transfekci sub-konfluentní vrstvy CV-1/EBNA-1 buněk za použití DEAE-dextranu s následujícím ošetřením chloroquinem, podobně jako popsal Luthmann a spol., *Nucl.Acids Res.* 11:1295 (1983) a McCutchan a spol., *J.Natl.Cancer Inst.* 41:351(1986). CV-1/EBNA-1 buněčná linie (ATCC CRL10478) konstitutivně exprimuje EBV jaderný antigen-1 řízením z CMV bezprostřední-časný enhancer/promotor. CV1-EBNA-1 byl získán z buněčné linie ledvin afrických opic CV-1 (ATCC CCL 70) jak popsal McMahan a spol. (*EMBO J.* 10:2821, 1991).

Za účelem transfektování CV-1/EBNA-1 buněk cDNA knihovnou byly buňky udržovány v kompletním mediu (Dulbeccovo modifikované Eagleovo medium(DMEM), obsahujícím 10 % (obj./obj.) fetálního telecího séra (FCS), 50 j./ml penicilinu, 50 j/ml streptomycinu, 2 mM L-glutaminu) a byly umístěny v hustotě asi 2×10^5 buněk/jamka na jednojamková sklička (Lab-Tek). Sklička byla předem ošetřena s 1 ml lidského fibronektinu (10 2g/ml v PBS) po 30 minut a pak 1x promyta PBS. Media byla z adherentní buněčné vrstvy odstraněna a nahrazena 1,5 ml kompletního media, obsahujícího 66,6 μ M chloroquin-sulfátu. Dvě desetiny ml DNA roztoku (2 μ g DNA, 0.5 mg/ml DEAE-dextranu v kompletním mediu, obsahujícím chloroquin) pak byly přidány k buňkám a inkubovány 5 hodin. Po inkubaci byla media odstraněna a buňky byly šokovány přidavkem kompletního media, obsahujícího 10 % DMSO po 2,5 až 20

Vazba flt3:Fc byla pozorována na myši T-buňky a lidské T-buňky a proto byla zvolena myši T-linie (0,3A4) pro její snadnost růstu. Myši 0,3A4 cDNA knihovna v sfHAV-EO byla připravena podle McMahana a spol. (*EMBO J.*, č.10; 2821-2832 1991). sfHAV-EO je savčí expresivní vektor, který se také replikuje v *E.coli*. sfHOV-EO obsahuje počátky replikace získané z SV40, Epstein-Barr viru a pBR322 a derivátem HAV-EO popsaného Dowerem a spol., *J.Immunol.* 142:4314 (1989) sfHAV-EO se liší od HAV-EO delecí intronu přítomného v adenovirus 2 tripartitní leader sekvenci v HAV-EO. Stručně, myši T-buněčná cDNA byla klonována do Sall místa sfHOV-EO adaptorovou metodou podobnou metodě popsané Haymerlem a spol. (*Nucl.Acids Res.* 14:8615, 1986) za použití následujícího oligonukleotidového adaptérového páru:

5' TCGACTGGAACGAGACGACCTGCT 3' SEQ ID NO:3
 3' GACCTTGCTCTGCTGGACGA 5' SEQ ID NO:4

Dvojřetězcová, tupě zakončená, náhodně primovaná cDNA byla připravena z 0,3A4 poly(A)+RNA v podstatě jak popsal Gubler a Hoffman, *Gene*, 25:263-269(1983), použitím Pharmacia DNA kitu. Výše uvedené adaptéry byly přidány k cDNA jak popsáno Haymerlem a spol. Materiál s nízkou molekulovou hmotností byl odstraněn pasážíváním přes Sephacryl S-1000 při 65 °C a cDNA byla ligována do sfHAV-EO410, který byl předem nařezán s Sall a ligován ke stejnému oligonukleotidovému páru. Tento vektor byl označen jako sfHAV-EO410. DNA byla elektroporována (Dower a spol., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988) do *E.coli* DH10B a po jedné hodině růstu při 37 °C byly transformované buňky zmrazeny v jednomililitrových podílech v SOC mediu (Hanahan a spol., *J.Mol.Biol.*, 166:557-580 (1983), obsahujícím 20 % glycerolu. Jeden podíl.

považované za pozitivní na flt3:Fc vazbu.

Příklad 3

Izolace a klonování flt3-L cDNA z myši T-buněčné cDNA knihovny

Myši T-buněčná cDNA knihovna buněčné linie P7B-0,3A4 byla zvolena jako možný zdroj flt3-L cDNA. P7B-0,3A4 je myši T buněčný klon, který je Thy1.2⁺, CD4⁻, CD8⁻, TCRab⁺, CD44⁺. Původně byla klonována při buněčné hustotě 0,33 buněk/jamka za přítomnosti rHUIL-7 a imobilizována anti-CD3 MAb a pak ponechána růst v kontinuální kultuře více než 1 rok pasáží jednou týdně v mediu, obsahujícím 15 ng/ml rHUIL-7. Rodičovská buněčná linie byla získána z buněk lymfatických uzlin SJL/J myši imunizované 50 nmol PLP₁₃₉₋₁₅₁ peptidu a 100 µg *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra v nekompletním Freudově adjuvans. PLP je proteolipidová proteinová slzka myelinového pouzdra centrálního nervového systému. Peptid složený z aminokyselin 139-151 byl dříve uveden jako encefalogenní peptid v experimentální autoimunní encefalomyelitis (EAE), myši model pro roztroušenou sklerozu v SJL/J myši. (Touhy V.K., Z.Lu, R.A.Sobel, R.A.Laursen a M.B. Lees; 1989. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J.Immunol.* 142:1523). Po počátku kultivace za přítomnosti antigenu, byla rodičovská buněčná linie, označená PLP7, ponechána v kontinuální kultuře s rHuIL-7 (a bez antigenu) více než 6 měsíců před klonováním.

P7B-0,3A4 proliferuje pouze v odpovědi na velmi vysoké koncentrace PLP₁₃₉₋₁₅₁ peptidu za přítomnosti ozářených syngenních splenocytů a není encefalogenní nebo alloresponzivní. Tento klon proliferuje k imobilizovanému anti-CD3 MAb, IL-2 a IL-7 ne ale k IL-4.

70) a COS-7 buněk (ATCC CRL 1651), oboje získány z opičích ledvin. Hladina exprese flt3:Fc byla relativně vysoká jak v CV-1 tak COS-7 buňkách. Byl proveden pokus o expresi ve 293 buňkách (transformované primární lidské embryonální ledvinové buňky, ATCC CRL 1573).

293 buněk transfektovaných sfHAV-EO/flt3:Fc vektorem bylo kultivováno v rotačních lahvích pro umožnění přechodné exprese fúzního proteinu, který je sekretován do kultivačního media přes flt3 signální peptid. Fúzní protein byl čištěn na protein A Sepharose kolonách, eluován a použit pro screening buněk na schopnost vázat flt3:Fc jak je popsáno v příkladech 2 a 3.

Příklad 2

Screening buněk na navázání flt3:Fc

Přibližně 100 různých primárních buněk a buněčných linií spadajících do následujících obecných kategorií: primární myši fetální mozkové buňky, linie myších fetálních jaterních buněk, linie kryších fetálních mozkových buněk, linie lidského plicního karcinomu (fibroblastoid), linie lidských a myších lymfoidních a myeloidních buněk byly zkoušeny na flt3:Fc vazbu. Buněčné linie byly inkubovány s flt3:Fc, pak biotinylovány anti-humánní Fc protilátkou, a pak streptavidin-phycoerythrin (Becton Dickinson). Biotinylovaná protilátka byla zakoupena od Jackson Immunoresearch Laboratories. Streptavidin se váže k biotinové molekule připojené k anti-humánní Fc protilátce, která se naopak váže k Fc části flt3:Fc fúzního proteinu. Phycoerythrin je fluorescentní phycobiliprotein, který slouží jako detegovatelné značení. Hladina fluorescenčního signálu byla měřena pro každý buněčný typ použitím FACScan^R tokového cytometru (Becton Dickinson). Byly identifikovány buněčné typy

pantového regionu k nativnímu C-konci, tj. má v podstatě plnou délku protilátkového Fc regionu. Fragmenty Fc regionů, např. ty, které jsou zkráceny na C-terminálním konci, mohou být také použity. Fragmenty výhodně obsahují více cysteinových zbytků (alespoň cysteinové zbytky v pantovém regionu) pro zprostředkování vytvoření meziřetězcových disulfidových vazeb mezi Fc polypeptidovými částmi dvou separátních flt3:Fc fúzních proteinů, tvořících dimery jak je popsáno výše.

Asp718 restriční endonukleasové místo štěpení bylo zavedeno proti směru flt3 kodujícího regionu. Byl izolován Asp718-NotI fragment myši flt3 cDNA (obsahující celou extracelulární doménu, transmembránový region a malou část cytoplasmické domény). Výše popsaná Asp718-NotI flt3 částečné cDNA byla klonována do pBLUESCRIPT SK^R vektoru, obsahujícího Fc cDNA tak, že flt3 cDNA je umístěna proti směru Fc cDNA. Jednořetězcová DNA získaná z výsledné genové fúze byla mutagenizována metodou popsanou Kunkelem (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985) a Kunkelem a spol. (*Methods in Enzymol.* 154:367, 1987) za účelem dokonalé fúze celé extracelulární domény flt3 k Fc sekvenci. Mutagenizovaná DNA byla sekvencována pro ověření, že byly odstraněny správné nukleotidy (tj. transmembránový region a částečně cytoplasmická doména DNA) a že flt3 a Fc sekvence byly ve stejném čtecím rámci. Fúzní cDNA pak byla vyříznuta a inzertována do savčího expresního vektoru označeného sfHAV-EO 409, který byl rozřezán pomocí Sall-NotI a Sall a Asp718 konce ztupeny. sfHAV-EO vektor (známý také jako pDC406) je popsán McMahanem a spol. (*EMBO J.*, 10; č. 10:2821-2832 (1991)).

Flt3:Fc fúzní proteiny jsou výhodně syntetizovány v rekombinantní savčí buněčné kultuře. Flt3:Fc fúzi obsahující expresivní vektor byl transfektován do CV-1 buněk (ATCC CCL

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava fuzního proteinu flt3-L receptor:Fc

Tento příklad popisuje klonování myší flt3 cDNA a konstrukci expresivního vektoru, kodujícího rozpustný fuzní protein myší flt3-receptor:Fc pro použití při detekci cDNA klonů, kodujících flt3-L. Polymerázová řetězová reakce (PCR) klonování flt3 cDNA z myší T-buňky byla provedena použitím oligonukleotidových primerů jak je popsáno Lymanem a spol., *Oncogene*, 8:815-822 (1993) - práce je zde zahrnuta jako odkaz. cDNA sekvence a kodující aminokyselinová sekvence pro flt3 receptor je popsána Rosnetem a spol., *Oncogene*, 6:1641-1650(1991) - práce je zde zahrnuta jako odkaz. Myší flt3 protein má 542 aminokyselinovou extracelulární doménu, 21 aminokyselinovou transmembránovou doménu a 437 aminokyselinovou cytoplasmickou doménu.

Před fuzováním myší flt3 cDNA k N-konci cDNA kodující Fc podíl molekuly lidského IgG1 byl fragment amplifikované myší flt3 cDNA inzertován do Asp718-NotI místa pCAV/NOT, popsaného v PCT přihlášce WO 90/05183. DNA, kodující jediný řetězec polypeptidu, obsahující Fc region lidské IgG1 protilátky, byla klonována do SpeI místa pBLUESCRIPT SK^R vektoru, který je komerčně dostupný od Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Kalifornie. Tento plasmidový vektor je replikovatelný v *E. coli* a obsahuje polylinkerový segment, který zahrnuje 21 unikátních restrikčních míst. Unikátní BglI místo bylo zavedeno blízko 5' konce inzertované Fc kodující sekvence, takže BglI místo zahrnuje kodony pro aminokyselina tři a čtyři Fc polypeptidu.

Kodovaný Fc polypeptid se rozkládá od N-koncového

erythrocytových příznaků nebo sféroblastů. Takové kompozice budou ovlivňovat fyzický stav, rozpustnost, stabilitu, rychlost in vivo uvolnění a rychlost in vivo clearance flt3-L. Flt3-L může být také konjugován k protilátkám proti tkáňově specifickým receptorům, ligandům nebo antigenům, nebo kopulován k ligandům tkáňově specifických receptorů. Jestliže byl flt3 receptor nalezen v neoplastických buňkách může být flt3-L konjugován k toxinu, čímž se flt3-L použije k doručení toxinu ke specifickému místu, nebo může být použit k senzibilizování takových neoplastických buněk k následně podávaným antineoplastickým činidlům.

Flt3-L může být podáván topicky, parenterálně nebo inhalací. Výraz "parenterálně" zahrnuje subkutánní injekce, intravenozní, intramuskulární, intracisternální injekce nebo infuzní techniky. Tyto kompozice budou typicky obsahovat účinné množství flt3-L, samotného nebo v kombinaci s účinným množstvím jakéhokoliv účinného materiálu. Takové dávkové a požadované lékové koncentrace obsažené v kompozicích se mohou měnit v závislosti na mnoha faktorech, zahrnujících zamýšlené použití, pacientovu tělesnou hmotnost a věk a způsob podání. Předběžně se dávka stanoví testy na zvířatech a škála dávek pro podání člověku se stanoví podle praxe známé v oboru. Jestliže se vezmou v úvahu výše uvedené poznatky, mohou být typické dávky flt3-L v rozmezí od asi 10 μg na metr čtvereční. Preferované dávkové rozmezí je řádově asi 100 μg na čtvereční metr až asi 300 μg na čtvereční metr.

Následující příklady slouží k ilustraci výhodných provedení vynálezu a předložený vynález nijak neomezuje.

"Antisense" nebo "sense" oligonukleotidy také mohou být zavedeny do buňky, obsahující cílovou nukleotidovou sekvenci tvorbou konjugátu s ligand vázající molekulou, jak je popsáno ve WO 91/045753. Vhodné ligand vázající molekuly zahrnují, ale nejsou tak omezeny, buněčné povrchové receptory, růstové faktory, jiné cytokiny nebo jiné ligandy, které se vážou k buněčným povrchovým receptorům. Výhodně konjugace ligand vázající molekuly podstatně neinterferuje se schopností ligand vázající molekuly se vázat k její odpovídající molekule nebo receptoru, nebo blokovat vstup "antisense" nebo "sense" oligonukleotidu nebo jeho konjugované verze k buňce.

Alternativně "antisense" nebo "sense" oligonukleotid může být zaveden do buňky, obsahující nukleokyselinovou sekvenci tvorbou komplexu oligonukleotid-lipid, jak je popsáno ve WO 90/10448. "Antisense" nebo "sense" oligonukleotid-lipid komplex je výhodně disociován v buňce endogenní lipásou.

Flt3-L polypeptidy podle vynálezu mohou být formulovány známými metodami pro přípravu farmaceuticky použitelných kompozic. Flt3-L může být kombinován ve směsi, buď jako samotný účinný materiál nebo s jinými známými materiály, s farmaceuticky vhodnými ředidly (např. Tris-HCl, acetát, fosfát), chránícími látkami (např. Thimerosal, benzylalkohol, parabeny), emulgátory, solubilizátory, přísadami a/nebo nosiči. Vhodné nosiče a jejich formulace jsou popsány v Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.vyd.1980, Mack Publishing Co. Dále takové kompozice mohou obsahovat flt3-L komplexovaný s polyethylenglykolem (PEG), kovovými ionty, nebo být inkorporovány do polymerních sloučenin jako je kyselina polyoctová, kyselina polyglykolová, hydrogely atd., nebo inkorporovány do liposomů, mikroemulzí, micel, jednolamelárních nebo multilamelárních vesiklů,

blokování exprese flt3-L proteinů. "Antisense" nebo "sense" oligonukleotidy dále zahrnují oligonukleotidy, mající modifikované cukr-fosfodiesterové řetězce (nebo jiné cukrové vazby, jako jsou ty, které jsou popsány ve WO91/06629) a kde takové cukrové vazby jsou odolné k endogenním nukleázám. Takové oligonukleotidy s rezistentními cukrovými vazbami jsou stabilní in vivo (tj. schopné odolávat enzymatické degradaci), ale zachovávají schopnost sekvenční specifity k vazbě k cílovým nukleotidovým sekvencím. Jiné příklady "sense" nebo "antisense" oligonukleotidů zahrnují takové oligonukleotidy, které jsou kovalentně připojeny k organickým skupinám, jako jsou ty, které jsou popsány ve WO 90/10448 a jiné skupiny, které zvyšují afinitu oligonukleotidu pro cílové nukleokyselinové sekvence, jako je poly-(L-lysin). Dále ještě mohou být k "sense" nebo "antisense" oligonukleotidům připojena interkalační činidla jako je ellipticin a alkylační činidla nebo komplexy kovů pro modifikaci vazebných specifit "antisense" nebo "sense" oligonukleotidů pro cílovou nukleotidovou sekvenci.

"Antisense" nebo "sense" oligonukleotidy mohou být zavedeny do buňky, obsahující cílovou nukleokyselinovou sekvenci jakoukoliv genovo transfer metodou nebo použitím genových transfer vektorů jako je virus Epstein-Barr. "Antisense" nebo "sense" jsou výhodně zavedeny do buňky, obsahující cílovou nukleokyselinovou sekvenci inzercí "Antisense" nebo "sense" oligonukleotidu do vhodného retrovirálního vektoru, potom kontaktem buňky s retrovirus vektorem, obsahujícím inzertovanou sekvenci, buď in vivo nebo ex vivo. Vhodné retrovirální vektory zahrnují, ale nejsou tak omezeny myší retrovirus M-MuLV, N2 (retrovirus získaný z M-MuLV), nebo dvojkopiové vektory označené DCTSA, DCT5B a DCTC5C (viz PCT přihláška US 90/02656).

mohou být rozrušeny jakoukoliv běžnou metodou, zahrnující cykly zmražení-tání, sonifikaci, mechanické rozrušení nebo použití buňky lyzujících činidel.

Transformované kvasinkové hostitelské buňky jsou obvykle používány pro expresi flt3-L jako sekretovaného polypeptidu za účelem zjednodušení čištění. Sekretovaný rekombinantní polypeptid z fermentace kvasinek jako hostitelských buněk může být čištěn metodami analogickými metodám popsaným Urdalem a spol. (*J.Chromatog.* 296:171, 1984). Urdal a spol. popisují dvapostupné stupně HPLC s reverzní fází pro čištění rekombinantního IL-2 na preparativní HPLC koloně.

"Antisense" nebo "sense" oligonukleotidy, obsahující jednořetězcovou nukleokyselinovou sekvenci (buď RNA nebo DNA) schopné navázání k cílové flt3-L mRNA sekvenci (za tvorby dvoušroubovice) nebo k flt3-L sekvenci ve dvojřetězcovém DNA helixu (za tvorby trojitého helixu) mohou být připraveny podle vynálezu. "Antisense" nebo "sense" oligonukleotidy podle předloženého vynálezu obsahují fragment kodujícího regionu flt3-L cDNA. Takový fragment obecně obsahuje alespoň asi 14 nukleotidů, výhodně od asi 14 do asi 30 nukleotidů. Schopnost vytvořit "antisense" nebo "sense" oligonukleotidy založené na cDNA sekvenci pro daný protein je popsána například Steinem a Cohenem, *Cancer Res.* 48:2659, 1988 a van der Krolem a spol., *BioTechniques* 6:958, 1988.

Vazba "antisense" nebo "sense" oligonukleotidů k cílovým nukleokyselinovým sekvencím vede ke tvorbě komplexů, které blokují translaci (RNA) nebo transkripci (DNA) jedním z několika způsobů, zahrnujících zvýšenou degradaci duplexů, prematurovanou terminaci transkripce nebo translace nebo jiné způsoby. "Antisense" oligonukleotidy tak mohou být použity ke

akrylamidového, agarosového, dextranového, celulozového nebo jiného typu obvykle používaného v čištění proteinu. Alternativně může být použit stupeň kationtové výměny. Vhodné kationtové měniče zahrnují různé nerozpustné matrice, zahrnující sulfopropylové nebo karboxymethylové skupiny. Preferovány jsou sulfopropylové skupiny. Nakonec je možno pro další čištění flt3-L použít jednoho nebo více stupňů vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) za použití RP-HPLC media (např. silikagelu, majícího připojené methylové nebo jiné alifatické skupiny. Některé nebo všechny z uvedených stupňů čištění, v různých kombinacích, jsou dobře známé a mohou být použity pro poskytnutí v podstatě homogenního rekombinantního proteinu.

Je možno použít afinitní kolonu, obsahující ligand vazebnou doménu flt3 receptorů k afinitnímu čištění exprimovaných flt3-L polypeptidů. Flt-3 polypeptidy mohou být odstraněny z afinitní kolony použitím konvenčních technik, např. elucí vysoce solným pufrům a pak být dialyzovány do nižšího solného pufru pro použití nebo změnou pH nebo jiných složek v závislosti na afinitě použité matrice. Alternativně může afinitní kolona obsahovat protilátku, která váže flt3-L. Příklad 6 popisuje postup použití flt3-L podle vynálezu pro generování monoklonálních protilátek řízených proti flt3-L.

Rekombinantní protein produkovaný v bakteriální kultuře je obvykle izolován počátečním rozbitím hostitelských buněk, odstředěním, extrakcí z buněčných pelet, je-li peptid nerozpustný nebo z kapaliny supernatantu je-li polypeptid rozpustný s následujícím jedním nebo více stupni zahuštění, vysolení, iontové výměny, afinitního čištění nebo chromatografie dělicí podle velikosti. Nakonec může být použita RP-HPLC pro konečné stupně čištění. Mikrobiální buňky

popsaná Cosmanem a spol., *Nature* 312:768 (1984); IL-4 signální peptid popsáný v EP 367566; typ I IL-1 receptorového signálního peptidu popsáného v US patentu 4968607 a typ II IL-1 receptorového signálního peptidu popsáný v EP 460846.

Flt3-L jako izolovaný nebo homogenní protein podle vynálezu může být produkován rekombinantními expresními systémy jak jsou popsány výše nebo čištěn z přirozeně se vyskytujících buněk. Flt-3 může být čištěn v podstatě do homogenity, jak je indikováno jediným proteinovým pruhem při analýze pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE).

Jeden způsob výroby flt3-L zahrnuje kultivaci hostitelské buňky transformované expresním vektorem, obsahujícím DNA sekvenci, která koduje flt3-L za podmínek, dostačujících k promotování exprese flt3-L. Flt3-L se pak získá z kultivačního media nebo buněčných extraktů, v závislosti na použitém expresním systému. Jak je známo odborníkům v oboru, postupy pro čištění rekombinantního proteinu se budou měnit podle takových faktorů jako je typ použitých hostitelských buněk a je-li nebo není rekombinantní protein sekretován do kultivačního media.

Například jestliže se použijí expresní systémy, které sekretují rekombinantní protein, musí být kultivační medium nejprve zahuštěno použitím komerčně dostupného proteinového koncentračního filtru, například ultrafiltrační jednotky Amicon nebo Millipore Pellicon. Po stupni zahuštění může být koncentrát aplikován na čistící matici jako je gelové filtrační medium. Alternativně může být použita aniontovýměnná pryskyřice, například matrice nebo substrát, mající připojené diethylaminoethylové (DEAE) skupiny. Matrice může být

Transkripční a translační kontrolní sekvence pro expresivní vektory savčích hostitelských buněk mohou být vyříznuty z virových genomů. Obvykle použité promotorové sekvence a enhancerové sekvence jsou odvozeny od polyoma viru, adenoviru 2, opičího viru 40 (SV40) a lidského cytomegaloviru. DNA sekvence získané ze SV40 virového genomu, například SV40... původu, časného a pozního promotoru, enhanceru, spojovací a polyadenylační místa mohou být použita pro poskytnutí genetických elementů pro expresi strukturální genové sekvence v savčí hostitelské buňce. Virové časné a pozdní promotory jsou zejména vhodné protože oboje jsou snadno získatelné z virového genomu jako fragment, který může také obsahovat virální počátek replikace (Fiers a spol., *Nature* 273:113, 1978). Menší nebo větší SV40 fragmenty mohou být také použity, za předpokladu, že zahrnují přibližně 250 bp sekvenci prostírající se od *Hind* III místa ke *Bgl* I místu umístěnému v SV40 virálním počátku replikace.

Příklady expresivních vektorů pro použití v savčích hostitelských buňkách mohou být konstruovány jak je popsáno Okayama-ou a Bergem (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983). Vhodný systém pro stabilní vysokou hladinu exprese savčích cDNA v C127 epitheliálních buňkách myši mléčné žlázy mohou být konstruovány v podstatě jak je popsáno Cosmanem a spol. (*Mol. Immunol.* 23:935, 1986). Vhodný vysoce expresivní vektor, PMLSV N1/N4, popsáný Cosmanem a spol., *Nature* 312:768, 1984 byl uložen jako ATCC 39890. Další vhodné savčí expresivní vektory jsou popsány v EP-A-0367566 a v US patentové přihlášce č. 07/701415, podané 16. května 1991, která je zde zahrnuta jako odkaz. Vektory mohou být získány z retrovirů. Místo nativní signální sekvence může být přidána heterologní signální sekvence, jako je signální sekvence pro IL-7 popsaná v US patentu 4965195; signální sekvence pro IL-2 receptor

nebo více restričních míst. Toto bude usnadňovat fuzi leader sekvence ke strukturálnímu genu.

Kvasinkové transformační protokoly jsou známy odborníkům v oboru. Takový protokol je popsán Hinnenem a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978. Hinnen a spol. podle protokolu vybírají Trp^r transformanty v selektivním mediu, kde selektivní medium obsahuje 0,67 % kvasnicové dusíkaté báze, 0,5 % casaminokyselin, 2 % glukózy, 10 µg/ml adeninu a 20 µg/ml uracilu.

Kvasinkové hostitelské buňky transformované vektory obsahujícími ADH2 promotor sekvenci mohou růst pro vyvolání exprese v "bohatém" mediu. Příkladem bohatého media je medium, které obsahuje 1 % kvasnicového extraktu, 2 % peptonu a 1 % glukózy, doplněné 80 µg/ml uracilu. Dereprese ADH2 promotoru se objevuje tehdy, když je glukóza vyčerpána z media.

Systémy savčích nebo hmyzích hostitelských buněčných kultur mohou být také použity pro exprimování rekombinantních flt3-L polypeptidů. Bakulovirové systémy pro produkci heterologních proteinů ve hmyzích buňkách jsou popsány Luckowem a Summersem, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Mohou být také použity v zavedených buněčných liniích savčího původu. Příklady vhodných savčích hostitelských buněčných linií zahrnují COS-7 linii buněk opičích ledvin (ATCC CRL 1651) (Gluzman a spol., *Cell* 23:175, 1981), L-buňky, C127 buňky, 3T3 buňky (ATCC CCL 163), buňky vaječníků čínského křečka (CHO), HeLa buňky a BHK (ATCC CRL 10) buněčná linie a CV-1/EBNA-1 buněčná linie získaná z buněčné linie afrických opic CV1 (African green monkey) (ATCC CCL 70) jak je popsána McMahanem a spol. (*EMBO J.* 10:2821, 1991).

Kvasinkové vektory budou často obsahovat počátek replikační sekvence ze 2 μ kvasinkového plasmidu, autonomně se replikující sekvenci (ARS), promotor region, sekvence pro polyadenylaci, sekvence pro transkripční terminaci a selektující marker gen. Vhodné promotorové sekvence pro kvasinkové vektory zahrnují, mezi jinými, promotory pro metallothionein, 3-fosfoglycerát kinázu (Hizeman a spol., *J.Biol.Chem.* 255:2073, 1980) nebo jiné glykolytické enzymy (Hess a spol., *J.Adv.Enzyme Res* 7:149, 1968 a Holland a spol., *Biochem.* 17:4900, 1978), jako je enoláza, glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, hexokináza, pyruvát-dekarboxyláza, fosfofruktokináza, glukosa-6-fosfát-isomeráza, 3-fosfoglycerát mutáza, pyruvát kináza, triosefosfát isomeráza, fosfoglukosa isomeráza a glukokináza. Jiné vhodné vektory a promotory pro použití ve kvasinkové expresi jsou blíže popsány v práci Hitzemana EPA-73657 nebo Fleera a spol., *Gene*, 107:285-195 (1991); a van den Bergem a spol. *Bio/Technology*, 8:135-139 (1990). Jinou alternativou je glukosa-represibilní ADH2 promotor popsáný Russellem a spol., (*J.Biol.Che.* 258:2674, 1982) a Beierem a spol. (*Nature* 300:724, 1982). Shuttle vektory replikovatelné jak ve kvasinkách tak v *E.coli* mohou být konstruovány inzercí DNA sekvencí z pBR322 pro selekci a replikaci v *E.coli* (Amp^r gen a počátek replikace) do výše popsaných kvasinkových vektorů.

Kvasinková α -faktor leader sekvence může být použita pro přímou sekreci flt3-L polypeptidu. α -faktor leader sekvence je často inzertována mezi promotor sekvencí a sekvencí strukturálního genu. Viz např. Kurjan a spol., *Cell* 30:933, 1982; Bitter a spol., *Proc.Natl.Acad.Sci.*, USA 81:5330, 1984; US patent 4546082 a EP 324274. Další Leader sekvence vhodné pro usnadnění sekrece rekombinantních polypeptidů ze kvasinkových hostitelů jsou známé odborníkům v oboru. Leader sekvence může být modifikována blízko svého 3' konce, aby obsahovala jedno

marker gen je například gen, kodující protein, který udílí antibiotickou rezistenci nebo který dodává autotrofický požadavek. Příklady vhodných expresivních vektorů pro prokaryotické hostitelské buňky zahrnují ty, které jsou získány z komerčně dostupných plasmidů jako je klonovací vektor pBR322 (ATCC 38017). pBR322 obsahuje geny pro ampicilinovou a tetracyklinovou rezistenci a tak poskytuje jednoduché prostředky pro identifikaci transformovaných buněk. Pro konstrukt expresivního vektoru za použití pBR322, se vhodný promotor a flt3-L DNA sekvence inzertují do pBR322 vektoru. Jiné komerčně dostupné vektory zahrnují, například, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švédsko) a pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

Promotorové sekvence běžně používané pro rekombinantní expresivní vektory pro prokaryotické hostitelské buňky zahrnují β -laktamáza (penicilináza), laktosa promotor systém (Chang a spol. *Nature* 275:615, 1978; a Goeddel a spol., *Nature* 281:544, 1979) tryptofan (trp) promotor systém (Goeddel a spol., *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980; a EP-A-36776) a tac promotor (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, str. 412, 1982). Zvláště vhodný expresivní systém prokaryotických hostitelských buněk využívá lambda P_L promotor a cI857ts termolabilní represor sekvenci. Plasmidové vektory dostupné z American Type Culture Collection, které inkorporují deriváty lambda P_L promotor zahrnuje plasmid pHUB2 (rezident v *E. coli* kmenu JMB9 (ATCC 37092)) a pPLc28 (rezident v *E. coli* RRI (ATCC 53082)).

Flt3-L polypeptidy alternativně mohou být exprimovány v kvasinkových hostitelských buňkách, výhodně rodu *Saccharomyces* (např. *S. cerevisiae*). Jiné rody kvasinek jako je *Pichia*, *K. lactis* nebo *Kluyveromyces*, mohou být také použity.

expresivních vektorů. Například DNA sekvence pro signální peptid (sekreční leader) může být fuzována v rámci k'flt3-L sekvenci tak, že flt3-L je na počátku translatována jako fuzní protein, obsahující signální peptid. Signální peptid, který je funkční v zamýšlených hostitelských buňkách zvyšuje extracelulární sekreci flt3-L polypeptidu. Signální peptid může být odštěpen z flt3-L polypeptidu po sekreci flt3-L z buňky.

Vhodné hostitelské buňky pro expresi flt3-L polypeptidu zahrnují prokaryoty, kvasinky nebo vyšší eukaryotické buňky. Vhodné klonovací a expresivní vektory pro použití s bakteriálními, fungálními, kvasinkovými a savčími buněčnými hostiteli jsou popsány, například, v práci Pouwelse a spol. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985). Buněk prosté translační systémy mohou být také využity pro produkci flt3-L polypeptidů za použití RNA získaných ze zde popsaných DNO konstruktů.

Prokaryoty zahrnují gram-negativní nebo gram-positivní organismy, například *E.coli* nebo *Bacilli*. Vhodné prokaryotické hostitelské buňky pro transformaci zahrnují, například, *E.coli*, *Bacillus substilis*, *Salmonella typhimurium* a různé jiné druhy rodů *Pseudomonas*, *Streptomyces* a *Staphylococcus*. V prokaryotické hostitelské buňce jako je *E.coli*, může flt3-L polypeptid obsahovat N-koncový methioninový zbytek pro usnadnění exprese rekombinantního polypeptidu v prokaryotické hostitelské buňce. N-koncový Met může být odštěpen z exprimovaného rekombinantního flt3-L polypeptidu.

Expresivní vektory pro použití v prokaryotických hostitelských buňkách obecně obsahují jeden nebo více fenotypicky selektujících marker genů. Fenotypicky selektující

nestimuluje proliferaci maturovaných B buněk nebo makrofágů.

Příklad 12

Analýza thymu z flt3-L naměrně exprimující myši

Tento příklad popisuje analýzu thymu z transgenní myši připravené postupem podle příkladu 9. Šest dospělých myši, každá přibližně ve stáří tří měsíců, bylo usmrceno. Thymus každé myši byl vyňat a připravena jediná buněčná suspenze.

FACS analýza demonstruje, že se neobjevila žádná celková změna v počtu buněk, a že myši nevykazují žádnou změnu v poměrech zrání thymocytů za použití markerů: CD4 vs. CD8; CD3 vs. $\alpha\beta$ TCR (T buněčný receptor) a CD3 vs. $\gamma\delta$ TCR (T buněčný receptor). Nicméně se objevila změna v poměrech určitých buněčných typů v CD4⁻ a CD8⁻ kompartmentu (tj. nejčasnějších buňkách vzhledem k vývoji; které představují přibližně 2 % až 3 % celkových buněk thymu). Speciálně CD4⁻ a CD8⁻ buňky se v thymu vyvíjejí ve třech stádiích. Stadium 1 představuje buňky, mající Pgp-1⁺⁺, HSA⁺ a IL-2 receptor-negativní ("IL-2R") markery. Po 1. stadiu se thymové buňky vyvíjejí do stadia 2, zahrnujícího buňky mající Pgp-1⁺, HSA⁺⁺ a IL-2R⁺⁺ markery a pak do stadia 3 charakterizovaného buňkami, majícími Pgp-1^{+/-}, HSA⁺⁺ a IL-2R⁻ markery. Thymové buňky ve stadiu 2 transgenní myši byly redukovány na asi 50 %, zatímco populace buněk ve stadiu 3 byla úměrně zvýšena. Tyto údaje naznačují, že flt3-L posouvá thymové buňky ze stadia 2 do stadia 3 vývoje, což znamená, že flt3-L je aktivní v časných T buňkách.

Příklad 13

Použití flt3-L v transplantaci periferních kmenových buněk

Tento příklad popisuje metodu použití flt3-L v autologní transplantaci periferních kmenových buněk (PSC) nebo periferních krevních progenitorových buněk (PBPC). Typicky se PBPC a PSC transplantace provede na pacientech, jejichž kostní dřeň je nevhodná pro odebrání například z důvodů dřevné abnormality nebo malignance.

Před odebráním buněk může být žádoucí mobilizovat nebo zvýšit počty obíhajících PBPC a PSC. Mobilizace může zlepšit odebrání PBPC a PSC a je dosažitelná intravenózním podáním flt3-L pacientům před odběrem takových buněk. Postupně nebo současně s flt3-L v kombinaci mohou být podány jiné růstové faktory jako je CSF-1, GM-CSF, SE, G-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, GM-CSF/IL-3 fuzní proteiny, LIF, FGF a jejich kombinace. Mobilizované nebo nemobilizované PBPC a PSC jsou odebrány za použití aferézních postupů známých v oboru. Viz například Bishop a spol., *Blood*, sv. 83, č. 2, str. 610-616 (1994). Stručně, PBPC a PSC se odeberou za použití konvenčních zařízení, například Haemonetics Model V50 aferézní zařízení (Haemonetics, Braintree, MA). Čtyřhodinové odběry se provádějí typicky ne více než pětkrát týdně až je shromážděno přibližně $6,5 \times 10^8$ mononukleárních buněk (MNC)/kg pacienta. Podíly odebraných PBPC a PSC jsou zkoumány na obsah granulocyt-makrofág kolonie tvořící jednotky (CFU-GM) ředěním přibližně 1:6 Hankovým vyváženým solným roztokem bez vápníku nebo hořčiku (HBSS) a navrstevy na lymfocytové separační medium (Organon Teknika, Durham, Severní Karolína). Po odstředění se na styčné ploše MNC oddělí, promyjí a resuspendují v HBSS. Jednomililitrové podíly, obsahující

přibližně 300000 MNC, modifikované McCoyovo 5A medium, 0,3 % agaru, 200 j/ml rekombinantního lidského GM-CSF, 200 j/ml rekombinantního lidského IL-3 a 200 j/ml rekombinantního lidského G-CSF se kultivují při 37 °C v 5% CO₂ ve vzduchu nasyceném vlhkostí 14 dnů. Popřípadě mohou být ke kulturám přidány flt3-L nebo GM-CSF/IL-3 fuzní molekuly (PIXY 321). Tyto kultury se vybarví Wrightovým barvivem a spočtou se CFU-GM kolonie za použití mikroskopu (Ward a spol., *Exp.Hematol.*, 16:358(1988)). Alternativně mohou být CFU-GM kolonie zkoušeny použitím CD34/CD33 tokové cytometrické metody podle Sieny a spol., *Blood*, sv.77,č.2 str. 400-409 (1991) nebo jakékoliv jiné metody známé v oboru.

CFU-GM obsahující kultury se vymrazí v mrazničce s řízenou rychlostí mrazení (např. CryoMed, Mt.Clemens, MI), potom se uchovávají v parní fázi kapalného dusíku. Deset procent dimethylsulfoxidu může být použito jako kryoprotektant. Po provedení všech odběrů od pacienta se kultury, obsahující CFU-GM nechají roztát a spojí se. Roztáté odebrané buňky se buď reinfuzují intravenózně pacientovi nebo expandují ex vivo před reinfuzí. Ex vivo expanze spojených buněk může být provedena použitím flt3-L jako růstového faktoru samotného, postupně nebo současně v kombinaci s jinými cytokiny uvedenými výše. Způsoby takové ex vivo expanze jsou dobře známé v oboru. Buňky buď expandované nebo neexpandované, jsou reinfuzovány intravenózně pacientovi. Pro usnadnění uchycení transplantovaných buněk se podává flt3-L současně s nebo po reinfuzi. Takové podání flt3-L se provádí se samotným flt3-L, postupně nebo současně v kombinaci s jinými cytokiny vybranými ze seznamu uvedeného výše.

Příklad 14

Čištění hematopoietických progenitorových a kmenových buněk
použitím flt3-L

Tento příklad popisuje metodu pro čištění hematopoietických buněk a kmenových buněk ze suspenze, obsahující směs buněk. Buňky z kostní dřeně a buňky periferní krve se odeberou konvenčními postupy. Buňky se suspendují ve standardním mediu a pak se odstředí pro odstranění červených krvinek a neutrofilů. Buňky umístěné na rozhraní mezi dvěma fázemi (také známé jako "buffy coat") se odeberou a resuspendují. Tyto buňky jsou převážně mononukleární a představují podstatný podíl časných hematopoietických progenitorových a kmenových buněk. Výsledná buněčná suspenze se pak inkubuje s biotinylovaným flt3-L po dostatečnou dobu pro umožnění podstatné flt3:flt3-L interakce. Typicky jsou doby inkubace alespoň jedna hodina dostatečné. Po inkubaci buněčná suspenze projde, gravitační silou, kolonou naplněnou avidinem potaženými kuličkami. Takové kolony, jsou dobře v oboru známe, viz Berenson a spol., *J.Cell.Biochem.*, 10D:239(1986). Kolona je promyta PBD roztokem pro odstranění nenavázaného materiálu. Cílové buňky pak mohou být uvolněny z kuliček a z flt3-L použitím konvenčních metod.

Seznam sekvencí

(I) Obecná informace:

(i) přihlašovatel: Lyman, Stewart D.

Beckmann, M. Patricia

(ii) Název vynálezu: Ligandy flt3-L receptorů

(iii) Počet sekvencí: 8

(iv) příslušná adresa:

(A) Adresa: Stephen L.Malaska, Immunex Corporation

(B) ulice: 51 University Street

(C) město: Seattle

(D) stát: Washington

(E) země: USA

(F) ZIP: 98101

(v) počítačově čitelná forma:

(A) typ media: floppy disk

(B) počítač: Apple Macintosh

(C) operační systém: Macintosh 7.0.1

(D) software: Microsoft Word, Version #5.1

(vi) současná data přihlášky:

(A) číslo přihlášky: - bude přiděleno-

(B) datum podání: 7.březen 1994

(C) klasifikace:

(vii) data předchozí přihlášky:

(A) číslo přihlášky: 08/162407

(B) datum podání: 3.prosinec 1993

(C) klasifikace:

(vii) data předchozí přihlášky:

- (A) číslo přihlášky: 08/111758
- (B) datum podání: 25.srpen 1993
- (C) klasifikace:

(vii) data předchozí přihlášky:

- (A) číslo přihlášky: 08/106463
- (B) datum podání: 12.srpen 1993
- (C) klasifikace:

(vii) data předchozí přihlášky:

- (A) číslo přihlášky: 08/068394
- (B) datum podání: 24.květen 1993
- (C) klasifikace:

(viii) Informace o zástupci/agentovi:

- (A) jméno: Malaska Stephen L.
- (B) registrační číslo: 32655
- (C) referenční/číslo povolení: 2813-D

(ix): telekomunikační informace:

- (A) telefon: (206)587-0430
- (B) telefax: (206) 233-0644
- (C) telex: 756822

namraadi 1151 03

(2) Infomace o SEQ ID NO:1

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 879 bázových párů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) řetězec: jediný
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA k mRNA

(iii) hypotetická: ne

(i) anti-sense: ne

(ix) rysy:

- (A) jméno/klíč: misc_rysy
- (B) lokace: 1..25

(ix) rysy:

- (A) jméno/klíč: misc_rysy
- (B) lokace: 855..879

(ix) rysy:

- (A) jméno/klíč: CDS
- (B) lokace: 57..752

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:1:

GTCGACTGGA ACGAGACGAC CTGCTCTGTC ACAGGCATGA GGGGTCCCCG GCAGAG	56
ATG ACA GTG CTG GCG CCA GCC TGG AGC CCA AAT TCC TCC CTG TTG CTG Met Thr Val Leu Ala Pro Ala Trp Ser Pro Asn Ser Ser Leu Leu Leu	104
1 5 10 15	
CTG TTG CTG CTG CTG AGT CCT TGC CTG CGG GGG ACA CCT GAC TGT TAC Leu Leu Leu Leu Leu Ser Pro Cys Leu Arg Gly Thr Pro Asp Cys Tyr	152
20 25 30	
TTC AGC CAC AGT CCC ATC TCC TCC AAC TTC AAA GTG AAG TTT AGA GAG Phe Ser His Ser Pro Ile Ser Ser Asn Phe Lys Val Lys Phe Arg Glu	200
35 40 45	
TTG ACT GAC CAC CTG CTT AAA GAT TAC CCA GTC ACT GTG GCC GTC AAT Leu Thr Asp His Leu Leu Lys Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Val Asn	248
50 55 60	
CTT CAG GAC GAG AAG CAC TGC AAG GCC TTG TGG AGC CTC TTC CTA GCC Leu Gln Asp Glu Lys His Cys Lys Ala Leu Trp Ser Leu Phe Leu Ala	296
65 70 75 80	
CAG CGC TGG ATA GAG CAA CTG AAG ACT GTG GCA GGG TCT AAG ATG CAA Gln Arg Trp Ile Glu Gln Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln	344
85 90 95	
ACG CTT CTG GAG GAC GTC AAC ACC GAG ATA CAT TTT GTC ACC TCA TGT Thr Leu Leu Glu Asp Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Ser Cys	392
100 105 110	
ACC TTC CAG CCC CTA CCA GAA TGT CTG CGA TTC GTC CAG ACC AAC ATC Thr Phe Gln Pro Leu Pro Glu Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile	440
115 120 125	
TCC CAC CTC CTG AAG GAC ACC TGC ACA CAG CTG CTT GCT CTG AAG CCC Ser His Leu Leu Lys Asp Thr Cys Thr Gln Leu Leu Ala Leu Lys Pro	488
130 135 140	
TGT ATC GGG AAG GCC TGC CAG AAT TTC TCT CGG TGC CTG GAG GTG CAG Cys Ile Gly Lys Ala Cys Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Val Gln	536
145 150 155 160	
TGC CAG CCG GAC TCC TCC ACC CTG CTG CCC CCA AGG AGT CCC ATA GCC Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Leu Pro Pro Arg Ser Pro Ile Ala	584
165 170 175	
CTA GAA GCC ACG GAG CTC CCA GAG CCT CGG CCC AGG CAG CTG TTG CTC Leu Glu Ala Thr Glu Leu Pro Glu Pro Arg Pro Arg Gln Leu Leu Leu	632
180 185 190	
CTG CTG CTG CTG CTG CCT CTC ACA CTG GTG CTG CTG GCA GCC GCC TGG Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Thr Leu Val Leu Leu Ala Ala Trp	680
195 200 205	
GGC CTT CGC TGG CAA AGG GCA AGA AGG AGG GGG GAG CTC CAC CCT GGG Gly Leu Arg Trp Gln Arg Ala Arg Arg Arg Gly Glu Leu His Pro Gly	728
210 215 220	
GTG CCC CTC CCC TCC CAT CCC TAGGATTCGA GCCTTGTCGA TCGTTGACTC Val Pro Leu Pro Ser His Pro	779
225 230	
AGCCAGGGTC TTATCTCGGT TACACCTGTA ATCTCAGCCC TTGGGAGCCC AGAGCAGGAT	839
TGCTGAATGG TCTGGAGCAG GTCGTCTCGT TCCAGTCGAC	879

(2) Infomace o SEQ ID NO:2

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 231 aminokyselin

(B) typ: aminokyselina

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO:2:

Met Thr Val Leu Ala Pro Ala Trp Ser Pro Asn Ser Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Ser Pro Cys Leu Arg Gly Thr Pro Asp Cys Tyr
20 25 30
Phe Ser His Ser Pro Ile Ser Ser Asn Phe Lys Val Lys Phe Arg Glu
35 40 45
Leu Thr Asp His Leu Leu Lys Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Val Asn
50 55 60
Leu Gln Asp Glu Lys His Cys Lys Ala Leu Trp Ser Leu Phe Leu Ala
65 70 75 80
Gln Arg Trp Ile Glu Gln Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln
85 90 95
Thr Leu Leu Glu Asp Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Ser Cys
100 105 110
Thr Phe Gln Pro Leu Pro Glu Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile
115 120 125
Ser His Leu Leu Lys Asp Thr Cys Thr Gln Leu Leu Ala Leu Lys Pro
130 135 140
Cys Ile Gly Lys Ala Cys Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Val Gln
145 150 155 160
Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Leu Pro Pro Arg Ser Pro Ile Ala
165 170 175
Leu Glu Ala Thr Glu Leu Pro Glu Pro Arg Pro Arg Gln Leu Leu Leu
180 185 190
Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Thr Leu Val Leu Leu Ala Ala Ala Trp
195 200 205
Gly Leu Arg Trp Gln Arg Ala Arg Arg Arg Gly Glu Leu His Pro Gly
210 215 220
Val Pro Leu Pro Ser His Pro
225 230

(2) Infomace o SEQ ID NO:3

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 24 bázových párů

(B) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jediný

(D) topologie: lineární

(iii) hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO:3

TCGACTGGAA CGAGACGACC TGCT

24

(2) Infomace o SEQ ID NO:4

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 20 bázových párů

(B) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jediný

(D) topologie: lineární

(iii) hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO: 4

AGCAGGTCGT CTCGTTCCAG

20

(2) Infomace o SEQ ID NO:5

(i) charakteristiky sekvence:

(A) délka: 988 bázových párů

(B) typ: nukleová kyselina

(c) řetězec: jediný

(D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA k mRNA

(iii) hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(v) rysy:

(A) jméno/klíč: CDS

(B) lokace: 30..734

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO:5

CGGCCCGGAAT TCCGGGGCCC CCGGCCGAA ATG ACA GTG CTG GCG CCA GCC TGG	53
Met Thr Val Leu Ala Pro Ala Trp	
1 5	
AGC CCA ACA ACC TAT CTC CTC CTG CTG CTG CTG CTG AGC TCG GGA CTC	101
Ser Pro Thr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu	
10 15 20	
AGT GGG ACC CAG GAC TGC TCC TTC CAA CAC AGC CCC ATC TCC TCC GAC	149
Ser Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp	
25 30 35 40	
TTC GCT GTC AAA ATC CGT GAG CTG TCT GAC TAC CTG CTT CAA GAT TAC	197
Phe Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr	
45 50 55	
CCA GTC ACC GTG GCC TCC AAC CTG CAG GAC GAG GAG CTC TGC GGG GGC	245
Pro Val Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly	
60 65 70	
CTC TGG CGG CTG GTC CTG GCA CAG CGC TGG ATG GAG CGG CTC AAG ACT	293
Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr	
75 80 85	
GTC GCT GGG TCC AAG ATG CAA GGC TTG CTG GAG CGC GTG AAC ACG GAG	341
Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu	
90 95 100	
ATA CAC TTT GTC ACC AAA TGT GCC TTT CAG CCC CCC CCC AGC TGT CTT	389
Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu	
105 110 115 120	

CGC TTC GTC CAG ACC AAC ATC TCC CGC CTC CTG CAG GAG ACC TCC GAG	437
Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu	
125 130 135	
CAG CTG GTG GCG CTG AAG CCC TGG ATC ACT CGC CAG AAC TTC TCC CGG	485
Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg	
140 145 150	
TGC CTG GAG CTG CAG TGT CAG CCC GAC TCC TCA ACC CTG CCA CCC CCA	533
Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro	
155 160 165	
TGG AGT CCC CGG CCC CTG GAG GCC ACA GCC CCG ACA GCC CCG CAG CCC	581
Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro	
170 175 180	
CCT CTG CTC CTC CTA CTG CTG CTG CCC GTG GGC CTC CTG CTG CTG GCC	629
Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Gly Leu Leu Leu Ala	
185 190 195 200	
GCT GCC TGG TGC CTG CAC TGG CAG AGG ACG CGG CGG AGG ACA CCC CGC	677
Ala Ala Trp Cys Leu His Trp Gln Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg	
205 210 215	
CCT GGG GAG CAG GTG CCC CCC GTC CCC AGT CCC CAG GAC CTG CTG CTT	725
Pro-Gly-Glu-Gln-Val-Pro-Pro-Val-Pro-Ser-Pro-Gln-Asp-Leu-Leu-Leu	
220 225 230	
GTG GAG CAC TGACCTGGCC AAGGCCTCAT CCTGCGGAGC CTTAAACAAC	774
Val Glu His	
235	
GCAGTGAGAC AGACATCTAT CATCCCATTT TACAGGGGAG GATACTGAGG CACACAGAGG	834
GGAGTCACCA GCCAGAGGAT GTATAGCCTG GACACAGAGG AAGTTGGCTA GAGGCCGGTC	894
CCTTCCTTGG GCCCCTCTCA TTCCTCCCC AGAATGGAGG CAACGCCAGA ATCCAGCACC	954
GGCCCCATTT ACCCAACTCT GAACAAAGCC CCCG	988

(2) Infomace o SEQ ID NO:6

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 235 bázových párů
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: protein

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO:6:

Met Thr Val Leu Ala Pro Ala Trp Ser Pro Thr Thr Tyr Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe
 20 25 30
 Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Ser Asn Leu
 50 55 60
 Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly
 85 90 95
 Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala
 100 105 110
 Phe Gln Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser
 115 120 125
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp
 130 135 140
 Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro
 145 150 155 160
 Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala
 165 170 175
 Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 180 185 190
 Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Trp Cys Leu His Trp Gln
 195 200 205
 Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly Glu Gln Val Pro Pro Val
 210 215 220
 Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val Glu His
 225 230 235

(2) Infomace o SEQ ID NO:7

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 71 bázových párů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (c) řetězec: jediný
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA k mRNA

(iii) hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO:7

```
AATTGGTACC TTGGATAAA AGAGACTACA AGGACGACGA TGACAAGACA CCTGACTGTT 60
ACTTCAGCCA C 71
```

(2) Infomace o SEQ ID NO:8

(i) charakteristiky sekvence:

- (A) délka: 37 bázových párů
- (B) typ: nukleová kyselina
- (c) řetězec: jediný
- (D) topologie: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA k mRNA

(iii) hypotetická: ne

(iv) anti-sense: ne

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO:8

```
ATATGGATCC CTA CTGCCTG GGCCGAGGCT CTGGGAG
```

37

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaný flt3-ligand (flt3-L) polypeptid.
2. Polypeptid podle nároku 1, kterým je myší flt3-L.
3. Polypeptid podle nároku 1, kterým je lidský flt3-L.
4. Polypeptid podle nároku 3, obsahující aminokyseliny 1-235 ze SEQ. ID NO:6.
5. Polypeptid podle nároku 1, kterým je rozpustný flt3-L.
6. Polypeptid podle nároku 5, obsahující aminokyseliny 28-160 nebo 28-182 ze SEQ ID NO:6.
7. Polypeptid podle nároku 3, který je kodován cDNA inzertem vektoru sfHAVEO410 v E.coli DH10B buňkách, majících přírůstkové číslo ATCC 69382.
8. Izolovaná DNA sekvence, kodující flt3-L protein.
9. Izolovaná DNA sekvence podle nároku 8, kodující myší flt3-L polypeptid.
10. Izolovaná DNA sekvence podle nároku 8, kodující lidský flt3-L polypeptid.
11. Izolovaná DNA sekvence podle nároku 8, která koduje

aminokyselinovou sekvenci 28-160 nebo 28-182 ze SEQ ID NO:6.

12. DNA sekvence podle nároku 8, zahrnující
 - (a) cDNA získanou z kodujícího regionu *flt3-L* genu,
 - (b) cDNA sekvence vybrané ze skupiny, zahrnující SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:5,
 - (c) DNA sekvence, které hybridizují za mírně přísných podmínek k cDNA z (a) nebo (b) a kde tyto DNA sekvence kodují *flt3-L*,
 - (d) DNA sekvence, které pro degeneraci genetického kodu, kodují *flt3-L* polypeptidy, mající aminokyselinovou sekvenci polypeptidů, kodovaných DNA sekvencemi (a), (b) nebo (c).

13. Expresivní vektor, obsahující DNA sekvenci podle nároku 8.
14. Expresivní vektor, obsahující DNA sekvenci podle nároku 9.
15. Expresivní vektor, obsahující DNA sekvenci podle nároku 10.
16. Expresivní vektor, obsahující DNA sekvenci podle nároku 11.
17. Expresivní vektor, obsahující DNA sekvenci podle nároku 12.
18. Hostitelská buňka transfektovaná nebo transformovaná expresivním vektorem podle nároku 13.
19. Hostitelská buňka transfektovaná nebo transformovaná expresivním vektorem podle nároku 14.
20. Hostitelská buňka transfektovaná nebo transformovaná expresivním vektorem podle nároku 15.

21. Hostitelská buňka transfektovaná nebo transformovaná expresivním vektorem podle nároku 16.
22. Hostitelská buňka transfektovaná nebo transformovaná expresivním vektorem podle nároku 17.
23. Způsob produkce flt3-L polypeptidu, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 18 za podmínek, promotujících expresi a získání polypeptidu z kultivačního media.
24. Způsob produkce flt3-L polypeptidu, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 19 za podmínek, promotujících expresi a získání polypeptidu z kultivačního media.
25. Způsob produkce flt3-L polypeptidu, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 20 za podmínek, promotujících expresi a získání polypeptidu z kultivačního media.
26. Způsob produkce flt3-L polypeptidu, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 21 za podmínek, promotujících expresi a získání polypeptidu z kultivačního media.
27. Způsob produkce flt3-L polypeptidu, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 22 za podmínek, promotujících expresi a získání polypeptidu z kultivačního media.
28. Protilátka, která je imunoreaktivní s flt3-L polypeptidem.

70
K.J.
32221
DOŠLO
02. V. 96
URAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

29. Protilátka podle nároku 28, kterou je monoklonální protilátka.

30. Farmaceutický přípravek, obsahující účinné množství flt3-L polypeptidu podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič, přísadu nebo ředidlo,

31. Farmaceutický přípravek, obsahující účinné množství flt3-L polypeptidu podle nároku 3 a farmaceuticky přijatelný nosič, přísadu nebo ředidlo,

32. Farmaceutický přípravek, obsahující účinné množství flt3-L polypeptidu podle nároku 5 a farmaceuticky přijatelný nosič, přísadu nebo ředidlo,

33. Přípravek pro provedení autologní transplantace u pacienta, dostávajícího cytoreduktivní terapii, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství flt3-L pro zvýšení počtu cirkulujících progenitorových buněk nebo kmenových buněk u takového pacienta a farmaceuticky přijatelné ředidlo.

34. Přípravek podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se flt3-L je v kombinaci s cytokinem vybraným ze skupiny, zahrnující CSF-1, GM-CSF, SF, G-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-15, GM-CSF/IL-3 fuzních proteinů, LIF a FGF.

35. Přípravek podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že flt3-L je v kombinaci s cytokinem vybraným ze skupiny, zahrnující GM-CSF, SF, G-CSF, EPO, IL-3 a GM-CSF/IL-3 fuzní protein.

36. Hematopietická buněčná expanzní media,

v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahují buněčná růstová media a účinné množství flt3-L polypeptidu podle nároku 1.

37. Způsob transfekce exogenního genu do časné hematopoietické buňky, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje stupně

(a) kultivace časných hematopoietických buněk v mediu,

obsahujícím účinné množství flt3-L polypeptidu a

(b) transfekci kultivovaných buněk ze stupně (a) genem.

38. Sloučenina pro stimulaci proliferace T buněk v savci, kterou je flt3-L polypeptid podle nároku 1.

39. Přípravek pro léčení pacienta, majícího symptomy myelodysplastického syndromu, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství flt3-L

polypeptidu podle nároku 1 a popřípadě účinné množství jednoho nebo více růstových faktorů vybraných ze skupiny,

zahrnující CSF-1, GM-CSF, SF, G-CSF, EPO, IL-1, IL-2,

IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12,

IL-13, IL-16, IL-15, GM-CSF/IL-3 fuzních proteinů, LIF a FGF.

40. Přípravek pro léčení pacienta, majícího symptomy anémie, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství flt3-L

polypeptidu podle nároku 1 a popřípadě účinné množství

jednoho nebo více růstových faktorů vybraných ze skupiny, zahrnující CSF-1, GM-CSF, SF, G-CSF, EPO, IL-1, IL-2,

IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12,

IL-13, IL-16, IL-15, GM-CSF/IL-3 fuzních proteinů, LIF a FGF.

41. Přípravek pro léčení pacienta, majícího symptomy syndromu získané imunoneдостatečnosti,

v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství

flt3-L polypeptidu podle nároku 1 a popřípadě účinné množství jednoho nebo více růstových faktorů vybraných ze skupiny, zahrnující CSF-1, GM-CSF, SF, G-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-15, GM-CSF/IL-3 fuzních proteinů, LIF a FGF.

42. Přípravek podle nároku 41, pro léčení pacienta s AZT terapií, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že obsahuje účinné množství flt3-L polypeptidu podle nároku 1 a popřípadě účinné množství jednoho nebo více růstových faktorů vybraných ze skupiny, zahrnující CSF-1, GM-CSF, SF, G-CSF, EPO, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-15, GM-CSF/IL-3 fuzních proteinů, LIF a-FGF.

43. Způsob oddělování buněk, majících flt3-L receptor na svém povrchu ze směsi buněk v suspenzi, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že zahrnuje kontakt buněk ve směsi s kontaktním povrchem, majícím na sobě flt3-L vazebný protein, a oddělení kontaktního povrchu a suspenze.

44. Způsob podle nároku 43, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že flt3-vazebným proteinem je flt3-L.

č.j.	154860	DOŠLO	26 VII 96	URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL
------	--------	-------	-----------	-------------------------------------	------