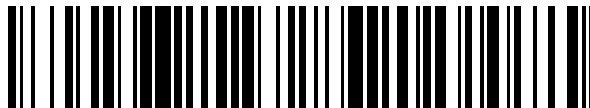


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 092**

51 Int. Cl.:
C07K 14/715 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07787134 .1**
96 Fecha de presentación: **05.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2046830**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

54 Título: **POLIPÉPTIDOS DEL CSF3R Y USOS DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:
06.07.2006 EP 06116704
19.07.2006 US 832177 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2011

73 Titular/es:
MERCK SERONO SA
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VADUZ, CH

72 Inventor/es:
YORKE-SMITH, Melanie y
PIGNI, Andreas

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 368 092 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos del CSF3R y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos del CSF3R. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y células recombinantes que los contienen, así como las composiciones farmacéuticas correspondientes. La invención divulga además métodos para producir dichos polipéptidos.

ANTECEDENTES

- 10 El factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF o CSF3) ejerce su función mediante la activación de un receptor de membrana, el receptor 3 del factor estimulante de colonias (CSF3R), que pertenece a la super familia de los receptores de hematopoyetina, a los cuales se hace referencia además como receptores de citocina de clase I. El CSF3R también se conoce como el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSFR) o CD114.

- 15 Se ha descubierto que diversos receptores de linfocinas, factores de crecimiento hematopoyéticos y moléculas relacionadas con la hormona del crecimiento comparten un dominio de unión común. Estos receptores se conocen como receptores de hematopoyetina y los ligandos correspondientes como hematopoyetinas. Asimismo, las hematopoyetinas se subdividieron en dos grandes grupos estructurales: Hematopoyetinas grandes/largas y pequeñas/cortas. Un subgrupo de cadenas de receptores individuales que forman parte de los complejos de receptores para las hematopoyetinas grandes contiene elementos estructurales comunes en sus partes extracelulares: un dominio tipo inmunoglobulina, un dominio de receptor de hematopoyetina y 3 dominios de fibronectina tipo III (2 en el receptor de leptina). Este subgrupo fue denominado "familia de receptores gp130" (Mosley, et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 32635-43) e incluye el receptor de Leptina (LPTR), el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSFR), la cadena beta común de Interleucina-6/-11/LIF/OSM/CNTF (GP130), el receptor del factor inhibidor de la leucemia (LIFR), la cadena beta del receptor de Oncostatina-M (OSMR), la cadena beta-1 del receptor de interleucina-12 (IL12RB1), la cadena beta-2 del receptor de Interleucina-12 (IL12RB2). Estas cadenas de receptores se homodimerizan (GCSFR, GP130, LPTR) o heterodimerizan (GP130 con LIFR o OSMR, IL12RB1 con IL12RB2) después de unirse a la citocina cognada.

- 20 La proteína CSF3R humana es un polipéptido de 826 aminoácidos que comprende un péptido señal (residuos de aminoácidos 1-24), un dominio extracelular ubicado en la región N-terminal de la proteína (residuos de aminoácidos 25-627), un dominio intracelular (residuos de aminoácidos 651-836) y una región transmembrana (residuos de aminoácidos 628-650). La porción extracelular contiene un dominio tipo inmunoglobulina (Ig) N-terminal (residuos de aminoácidos 25 a 117), un dominio de homología del receptor de citocina (CRH) (residuos de aminoácidos 122 a 330) y 3 dominios de fibronectinas tipo III (FNIII). Dentro de la región de CRH se encuentran 2 dominios de FNIII, 4 residuos de cisteína conservados y un motivo conservado WSXWS (residuos de aminoácidos 318 a 322) que estabiliza el dominio de CRH. Los dominios tipo Ig y CRH son críticos para la unión de alta afinidad. En el dominio intracelular hay un motivo de caja 1 (residuos de aminoácidos 658 a 666) necesaria para la interacción y/o activación de JAK.

En Hiratoka et al. (J. Biol. Chem. 1995; 270:25928-25934) se describe un CSF3R soluble que consiste en el dominio tipo Ig y de la parte aminoterminal del dominio CRH.

- 40 El GCSF estimula la proliferación, supervivencia y maduración de las células comprometidas con la estirpe de granulocitos neutrófilos mediante la unión al receptor específico de GCSF (ver Hartung T., et al., Curr. Opin. Hematol. 1998; 5: 221-5). El receptor del CSF3R no posee actividad intrínseca de quinasa en el dominio citoplásmico y utiliza cinasas proteicas intracelulares asociadas al receptor como la tirosina quinasa Janus (JAK) para iniciar la transducción de señales. Se ha demostrado que la estimulación de las células con G-CSF activa múltiples vías de transducción de señales, que incluyen los transductores de señal y los activadores de transcripción (STAT), Ras/Raf/Erk, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K)/Akt, y también las proteasas Stat como la proteasa Stat5. La activación no regulada de la Stat5 puede conducir a respuestas celulares aberrantes al CSF3 y contribuir a la leucemogénesis.

- 45 El GCSF se utiliza generalmente para el tratamiento de diferentes tipos de neutropenia en seres humanos. Es uno de los pocos factores de crecimiento aprobados para uso clínico. En particular, se utiliza para reducir la citopenia inducida por la quimioterapia (Viens et al., J. de Clin. Oncology, Vol. 20, No. 1, 2002: 24-36). El GCSF también se ha utilizado de manera terapéutica de enfermedades infecciosas como agente coadyuvante potencial (Hubel et al., J. de Infectious Diseases, Vol. 185: 1490-501, 2002).

- 55 En un modelo de infarto de miocardio en ratón, el tratamiento con CSF3 no afectó la magnitud inicial del infarto el día 3 pero mejoró la función cardiaca tan solo 1 semana después del infarto y los efectos beneficiosos se redujeron por el retraso en el comienzo del tratamiento (Harada et al. Nature Med. Vol. 11: 305-311, 2005). El CSF3 indujo las proteínas antiapoptóticas e inhibió la muerte apoptótica de los cardiomiocitos. Asimismo, el CSF3 redujo la apoptosis de las células endoteliales y aumentó la vascularización en los corazones que habían sufrido infartos. En Harada et

al. se sugirió que el CSF3 promueve la supervivencia de los miocitos cardíacos y previene la remodelación del ventrículo izquierdo después del infarto de miocardio.

5 La aplicación de una dosis unitaria de G-CSF en pacientes que padecen de neumonía adquirida en la comunidad (CAP) aumentó al duración de la supervivencia y la activación de la neutrófilos, combinado con una liberación sostenida de citocinas antiinflamatorias (Droemann et al. *Respiration*. 2005 Dec. 12. Epub previa a la publicación).

El CSF3 también es beneficioso para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inmunológicas, por ejemplo, enfermedad injerto contra huésped, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes (Rutella et al. *J. Immunol*. 2005 Dec. 1; 175(11):7085-91).

SUMARIO DE LA INVENCION

10 La presente invención divulga nuevas variantes de polipéptidos del CSF3R. La invención divulga además ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, en particular, vectores de expresión y células recombinantes que los contienen, así como las composiciones farmacéuticas correspondientes. La invención divulga además métodos para producir dichos polipéptidos.

15 Más particularmente, la invención resulta de la identificación, el aislamiento y la caracterización de una nueva variante de empalme soluble de origen natural del CSF3 humano, denominada sCSF3R, que tiene propiedades estructurales y biológicas, lo que representa un valioso producto farmacéutico.

20 Un objeto de la presente invención radica por tanto en variantes del polipéptido aislado del CSF3R. Las variantes de polipéptido de la presente invención comprenden la secuencia de un dominio de unión al ligando del CSF3, carecen de un dominio funcional transmembrana y carecen de dominio citoplasmático, donde dicho dominio de unión al ligando es un dominio de tipo inmunoglobulina del CSF3R, donde dichos polipéptidos incluyen además después del dominio tipo inmunoglobulina los residuos de aminoácidos 97-165 de la SEQ ID NO: 4, o un fragmento de al menos 50 aminoácidos de los residuos de aminoácidos 97-165 de la SEQ ID No.4, y donde dichos polipéptidos retienen la habilidad de unir los ligandos naturales del CSF3R, caracterizados además porque la variante de polipéptidos de CSF3R soluble aislada se selecciona de la SEQ ID NO: 2, una forma madura de la SEQ ID NO: 2, una forma glicosilada de la SEQ ID NO: 2, una forma pegilada de la SEQ ID NO: 2 o un equivalente funcional de la SEQ ID NO: 2, donde el equivalente funcional tiene al menos más de un 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 2. Los polipéptidos del CSF3R de la presente invención representan formas solubles del CSF3R que pueden utilizarse como agonistas o antagonistas de estos en varias afecciones patológicas.

Otro objeto de la presente invención radica en la forma madura del CSF3R como se define anteriormente.

30 Otro objeto de la presente invención radica en una proteína de fusión que comprende una variante de polipéptido del CSF3R como se define anteriormente.

Otro objeto de la presente invención radica en un conjugado que comprende una variante de polipéptido del CSF3R como se define anteriormente.

35 Un objeto adicional de la presente invención radica en un ácido nucleico que codifica una variante de polipéptido del CSF3R o una proteína de fusión como se define anteriormente, así como cualquier vector de clonación o de expresión que comprende dicho ácido nucleico.

La invención se refiere además a células huésped recombinantes que comprenden un vector o ácido nucleico como se define anteriormente, así como métodos para producir una variante de polipéptido del CSF3R como se define anteriormente mediante el uso de células recombinantes.

40 Un aspecto adicional de la presente invención radica en una composición farmacéutica que comprende un producto (por ejemplo, un polipéptido, una proteína de fusión, un conjugado, un complejo receptor, un ácido nucleico, una célula vector o recombinante) como se define anteriormente.

45 Los productos y la composición farmacéutica anteriores son particularmente apropiados, por ejemplo, para tratar la enfermedad injerto contra huésped, cáncer, neutropenia, trastornos o afecciones neurológicas, neumonía, enfermedades autoinmunes, enfermedades hematológicas, trastornos hemopoyéticos, enfermedades infecciosas, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Fig. 1: Secuencia de proteínas y ADN de sCSF3R. La posición de los cebadores PCR utilizados para la clonación se indica con flechas.

50 Fig. 2: Secuencia de nucleótidos con traducción del producto PCR de sCSF3R.

Fig. 3: Alineación entre sCSF3R y la proteína ligada a la membrana. La proteína ligada a la membrana contiene un péptido señal (encuadrado) de los aminoácidos 1 a 24, un dominio de tipo Ig C2 (gris claro) y 5 dominios de fibronectina III (gris oscuro). La variante contiene el péptido señal, el dominio tipo Ig y no presenta ningún dominio de fibronectina III. El motivo de la caja 1 es necesario para la interacción y/o activación de JAK. El peso molecular previsto de sCSF3R es 20667.7761.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención resulta de la identificación y caracterización de las nuevas variantes de polipéptidos humanos biológicamente activos del CSF3R. Estos polipéptidos generalmente comprenden la secuencia de un polipéptido humano maduro del CSF3R que carece de dominio funcional transmembrana. En particular, la presente invención radica en la identificación de una variante de empalme de origen natural del CSF3R, denominada sCFS3R (SEQ ID NO:2). La presente invención puede comprender variantes de polipéptidos del CSF3R de origen natural o sintéticos y representa moléculas terapéuticas valiosas. Asimismo, debido a la ausencia de un dominio funcional transmembrana, las variantes de polipéptidos del CSF3R de la presente invención no se fijan en la membrana celular y pueden circular por los fluidos biológicos, particularmente la sangre, el plasma, el suero, la linfa o similares.

La región extracelular del CSF3R unido a la membrana (Swissprot accession Q99062; SEQ ID NO:10) comprende seis dominios estructurales: un dominio de tipo Inmunoglobulina (Ig) N-terminal seguido por cinco dominios de fibronectina tipo III (FNIII). Los primeros dos dominios de FNIII (denominados D2 y D3) forman el módulo de homología del receptor de citocina (CRH), que contiene cuatro residuos de cisteína en D2 y un motivo WSXWS en D3. Estas características del módulo de CRH se conservan en los miembros de la familia del receptor de citocina clase 1. El CSF3R unido a la membrana consta de 15 exones de codificación. Existen 2 exones no codificadores en el 5' UTR. El codón de inicio se encuentra en el exón 3 y el codón de finalización se encuentra en el exón 15.

La variante del CSF3R soluble de la presente invención (SEQ ID NO:2) es codificada por el exón 3, el exón 4 y la prolongación genómica del exón 4 en el 4o intrón del gen. La variante del CSF3R soluble tiene un largo de 599 pares de bases que codifican un polipéptido de 189 aminoácidos. El primer exón se extiende desde la base 1 hasta la base 84 y el segundo exón se extiende desde la base 85 hasta la base 599. Por tanto, la secuencia de proteínas de la variante del CSF3R soluble se caracteriza por su parte N-terminal del CSF3R unido a la membrana codificado por el exón 3 y el exón 4 y por sus 69 aminoácidos suplementarios que provienen de la prolongación en el intrón 4.

Por consiguiente, las variantes de polipéptido del CSF3R de la presente invención comprenden un dominio funcional de unión al ligando, pero carecen de un dominio funcional transmembrana y carecen además de región citoplasmática. La invención muestra que dichas proteínas se producen de forma natural y representan variantes inesperadas del CSF3R con conformación estructural inusual. De hecho, las moléculas de la presente invención contienen 69 aminoácidos únicos adicionales a continuación del dominio tipo Ig. Los 69 aminoácidos adicionales constan de los residuos de aminoácidos 97 a 165 de la SEQ ID NO: 4. El sCFS3R de la presente invención se caracteriza asimismo por el hecho de que retiene únicamente el dominio tipo Ig (en su totalidad) del dominio de unión al ligando y carece del módulo de CRH y todos los dominios de fibronectina tipo III. Los polipéptidos divulgados en la presente preferentemente carecen del módulo de CRH y/o uno, dos, tres, cuatro, cinco o todos los dominios de fibronectina tipo III. El dominio tipo Ig es necesario para la homodimerización de receptores con CSF3 en solución y el dominio tipo Ig mostró unirse al CSF3 (Layton et al. J Biol. Chem. 2001 Sep. 28; 276(39):36779-87.). Por tanto, la variante del CSF3R soluble de la presente invención como se expresa en la SEQ ID NO: 4, retiene las características esenciales del dominio de unión al ligando del CSF3, que consiste en el dominio tipo Ig.

Las variantes de polipéptido del CSF3R divulgadas en la presente carecen de dominio funcional transmembrana, es decir, no contienen un dominio funcional derivado del CSF3R que permita la fijación del polipéptido en la membrana. La ausencia de un dominio funcional transmembrana puede resultar de la alteración de cualquier aminoácido (por ejemplo, la eliminación, sustitución y/o adición de uno o más residuos de aminoácidos) en un dominio transmembrana del CSF3R que resulta en un dominio transmembrana no funcional. En una realización típica, la ausencia de un dominio funcional transmembrana resulta de la eliminación de todos o parte de los residuos de aminoácidos que forman el dominio transmembrana, preferentemente la eliminación de los residuos de aminoácidos 628 a 650 de la SEQ ID NO: 10.

En un aspecto, la invención proporciona una variante del polipéptido aislado del CSF3R, donde dicha variante de polipéptido consiste en una secuencia de un dominio de unión al ligando, carece de dominio funcional transmembrana y carece de dominio citoplasmático, donde dicho dominio de unión al ligando es un dominio tipo inmunoglobulina del CSF3R, donde dichos polipéptidos incluyen además a continuación del dominio tipo inmunoglobulina los residuos de aminoácidos 97-165 de la SEQ ID NO: 4, o un fragmento de al menos 50 aminoácidos de los residuos de aminoácidos 97-165 de la SEQ ID No.4, y donde dichos polipéptidos retienen la habilidad de unir los ligandos naturales del CSF3R, y caracterizados además porque la variante del polipéptido soluble aislado del CSF3R se selecciona de la SEQ ID NO: 2, una forma madura de la SEQ ID NO: 2, una forma glicosilada de la SEQ ID NO: 2, una forma pegilada de la SEQ ID NO: 2 o un equivalente funcional de la SEQ ID NO: 2, donde el equivalente funcional tiene al menos más de un 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 2.

- 5 La comprensión actual de los mecanismos de los receptores solubles incluye su papel como inhibidores de sus respectivos receptores ligados a la membrana mediante la competencia por los ligandos, reguladores por disminución de la expresión de los receptores ligados a la membrana, proteínas estabilizadoras de los ligandos y participantes en la señalización inducida por ligando. En Ku et al. se demuestra que una forma soluble del receptor de G-CSF (denominada sG-CSFR) puede entrar en sinergia con el factor acero (ligando SF, Kit) o ligando Flt3/Flk2 (FL) lo que ayuda a la proliferación de progenitores hematopoyéticos primitivos (Ku et al. Blood. 1996 Dec. 1; 88(11):4124-31). En Ku et al. se indica que el receptor soluble de G-CSF parece transducir las señales mediante la interacción con su respectivo receptor ligado a la membrana.
- 10 Por tanto, las variantes del polipéptido soluble del CSF3R de la presente invención representan proteínas estabilizadoras de los ligandos y/o CSF3R fijado a la membrana, que promueven la señalización inducida por ligando y actúan como agonistas del CSF3R. Los receptores solubles de la presente invención pueden estabilizar un ligando o el CSF3R unido a la membrana o tanto un ligando como el CSF3R unido a la membrana. Preferentemente, el ligando es CSF3. El CSF3R soluble puede evitar la degradación de sus ligandos cognados como se ha mostrado para los receptores solubles de la hormona del crecimiento.
- 15 En Asano et al. se demuestra que el CSF3R quimérico soluble puede inhibir la actividad biológica del CSF3 en la formación de la colonia de médula ósea normal (Asano et al. Cancer Res. 1997 Aug. 15; 57(16):3395-7). Asimismo, el CSF3R quimérico soluble inhibió completamente el efecto estimulador del CSF3 en la proliferación de células progenitoras leucémicas para formar colonias de blastocitos leucémicos y representa un posible candidato terapéutico en una aplicación clínica para la leucemia mieloblástica aguda. En Iwasaki et al. se sugirió que las isoformas solubles del CSF3R pueden competir con el CSF3R fijado a la membrana en la células blanco y sirven como reguladores negativos de la mielopoyesis (Iwasaki et al. J. Immunol. 1999 Dec. 15; 163(12):6907-11).
- 20 Por tanto, las variantes del polipéptido soluble del CSF3R de la presente invención pueden representar señuelos que pueden unir ligandos endógenos naturales del CSF3R y de este modo reducir las actividades mediadas por el CSF3R, actuando como antagonistas del CSF3R. En particular, dichas variantes del polipéptido soluble del CSF3R actúan como reguladores para las actividades mediadas por el CSF3R mediante un mecanismo dominante negativo.
- 25 Preferentemente, las variantes del polipéptido soluble del CSF3R de la presente invención representan proteínas estabilizadoras de los ligandos y/o CSF3R fijado a la membrana, que promueven la señalización inducida por ligando y actúan como agonistas del CSF3R.
- 30 En Layton et al., mediante la modelización del dominio tipo Ig, se demostró que la estructura de dominio del CSF3R también se encuentra en el homólogo más cercano gp130, que es la cadena de receptores transductores de señal compartida de la familia de interleucina (IL)-6 de citocinas (Layton et al. J Biol. Chem. 2001 Sep. 28; 276(39):36779-87.). El G-CSF3R y el gp130 comparten un 46% de similitud de secuencia en la región extracelular. Asimismo, se observa una relación estructural similar entre los complejos tetraméricos 2:2 formados por la IL-6 con el gp30, o el CSF3 con el CSF3R. La formación de complejos entre la IL-6 con su receptor soluble (sIL-6R), que interactúan con el gp130, conduce a un aumento en la expresión y translocación nuclear de STAT3, que provoca la inducción de genes antiapoptóticos, como el Bcl-x1 (Atreya R and Neurath M F. Clin Rev Allergy Immunol. 2005 June; 28(3):187-96.).
- 35 Se divulga además un complejo de receptores que comprende una variante de polipéptido del CSF3R de la presente invención.
- 40 Se divulga además un complejo de receptores que comprende una proteína de fusión que comprende una variante de polipéptido del CSF3R de la presente invención.
- Se divulga además un complejo de receptores formado por el CSF3, variantes del CSF3R soluble de la presente invención y el CSF3R fijado a la membrana.
- 45 Se divulga además un complejo de receptores formado por variantes del CSF3R soluble de la presente invención y el CSF3R fijado a la membrana.
- Se divulga además un complejo de receptores formado por el CSF3 y variantes del CSF3R soluble de la presente invención.
- Preferentemente, el complejo de receptores consiste en un complejo tetramérico 2:2.
- 50 Las variantes de polipéptido soluble del CSF3R de la presente invención representan agonistas y/o antagonistas naturales del CSF3R y pueden utilizarse como tales, o en forma de, por ejemplo, una proteína de fusión, un conjugado o complejo de receptores para tratar la enfermedad injerto contra huésped, cáncer, neutropenia, trastornos o afecciones neurológicas, neumonía, enfermedades autoinmunes, enfermedades hematológicas, trastornos hematopoyéticos, enfermedades infecciosas, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes.
- 55 Otro objeto de la presente invención radica en un CSF3R soluble que comprende un dominio tipo inmunoglobulina (Ig) y el módulo de CRH fusionado con una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en uno o más

- aminoácidos codificados por el intrón 4 de la SEQ ID NO:1. Preferentemente, un objeto de la presente invención radica en un CSF3R soluble que comprende el dominio tipo inmunoglobulina (Ig) unido a una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en uno o más aminoácidos codificados por el intrón 4 de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, el dominio tipo Ig se encuentra fusionado con una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en 50 ó 69 aminoácidos codificados por el intrón 4 de la SEQ ID NO: 1. De forma alternativa, el dominio tipo Ig se encuentra fusionado con una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en 50 ó 69 aminoácidos de los aminoácidos 97 a 165 de la SEQ ID NO: 4 (sCSF3R maduro). Preferentemente, el dominio tipo Ig se encuentra fusionado con una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 97 a 165 de la SEQ ID NO: 4.
- En otro aspecto, la invención proporciona por tanto una variante de polipéptido aislado del CSF3R de la presente invención donde el polipéptido incluye además la secuencia de aminoácidos codificada por el intrón 4 de la SEQ ID NO: 1 o incluye además un fragmento de la secuencia de aminoácidos codificada por el intrón 4 de la SEQ ID NO:1 de al menos 50, 60 ó 69 aminoácidos. Preferentemente, el polipéptido aislado del CSF3R incluye además una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 97 a 165 de la SEQ ID NO: 4.
- Más particularmente, la invención es el resultado de la identificación, el aislamiento y la caracterización de una nueva variante de empalme soluble de origen natural del CSF3R humano, denominada sCSF3R (SEQ ID NO:2), que tiene propiedades estructurales y biológicas particulares, lo que representa un valioso producto farmacéutico. Por tanto, un objeto de la presente invención radica en el CSF3R soluble como se expresa en la SEQ ID NO:2, su forma madura, su forma glicosilada y su equivalente funcional. Preferentemente, la forma madura de la SEQ ID NO:2 es la SEQ ID NO: 4.
- Por lo tanto, otro objeto de la presente invención radica en la forma madura de la variante del CSF3R soluble como se expresa en la SEQ ID NO: 4. De forma alternativa, un objeto de la presente invención radica en la SEQ ID NO:2 que carece del péptido señal. Preferentemente, el péptido señal se extiende de los aminoácidos 1 a 25 de la SEQ ID NO:2, o los aminoácidos 1 a 24 de la SEQ ID NO:2, o los aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID NO:2.
- Otros objetos divulgados radican en la secuencia clonada como se expresa en la SEQ ID NO:6, su forma madura, su forma glicosilada, su equivalente funcional o su fragmento característico. Preferentemente, la forma madura de la SEQ ID NO:6 es la SEQ ID NO:8.
- Se divulga además la forma madura de la variante del CSF3R soluble como se expresa en la SEQ ID NO:8. De forma alternativa, un objeto que se divulga es la SEQ ID NO:6 que carece de péptido señal. Preferentemente, el péptido señal se extiende de los aminoácidos 1 a 25 de la SEQ ID NO:6, o los aminoácidos 1 a 24 de la SEQ ID NO:6, o los aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID NO:6.
- Un objeto particular descrito en la presente son las variantes de un polipéptido del CSF3R aislado, o su fragmento característico, donde dichas variantes de polipéptido comprenden una secuencia del dominio de unión al ligando del CSF3 y carecen de dominio funcional transmembrana. Preferentemente, el dominio de unión al ligando del CSF3 consiste en los residuos de aminoácidos 25 a 627 de la SEQ ID NO:10, más preferentemente consisten en los residuos de aminoácidos 25 a 618 de la SEQ ID NO: 10, aún más preferentemente consiste en el dominio tipo Ig y el dominio de CRH del CSF3R unido a la membrana o consiste en los residuos de aminoácidos 25 a 330 de la SEQ ID NO: 10. El dominio de unión al ligando del CSF3 preferido consiste en el dominio tipo Ig del CSF3R unido a la membrana, o consiste en los residuos de aminoácidos 25 a 120 de la SEQ ID NO:10 (como se expresa en la SEQ ID NO:12), o consiste en los aminoácidos 25 a 117 de la SEQ ID NO:10.
- Otro objeto descrito en la presente radica en las variantes de polipéptido aislado del CSF3R o su fragmento característico, donde dichas variantes de polipéptido comprenden una secuencia del dominio de unión al ligando del CSF3, carecen de dominio funcional transmembrana y carecen de región citoplasmática. Preferentemente, el dominio transmembrana consiste en los residuos de aminoácidos 628 a 650 de la SEQ ID NO:10. Preferentemente, la región citoplasmática consiste en los residuos de aminoácidos 651 a 836 del CSF3R unido a la membrana (SEQ ID NO: 10).
- Asimismo se describe una variante de polipéptido aislado del CSF3R de la presente invención, donde dicha variante de polipéptido aislado del CSF3R carece de los aminoácidos 628 a 650 de la SEQ ID NO:10 y/o carece de los aminoácidos 651 a 836 de la SEQ ID NO:10.
- Se describe además una variante de polipéptido aislado del CSF3R codificada por el intrón 4 de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de esta.
- La presente solicitud describe una variante de polipéptido aislado del CSF3R que consiste en los aminoácidos 97 a 165 de la SEQ ID NO: 4.
- Se divulga además una variante de polipéptido aislado del CSF3R codificada por el intrón 4 de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de esta, fusionada con uno o más aminoácidos del dominio de unión al ligando, preferentemente el dominio tipo Ig.

- 5 Se describe una variante de polipéptido aislado del CSF3R, donde dicho polipéptido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos codificada por el intrón 4 de la SEQ ID NO: 1 o de un fragmento de la secuencia de aminoácidos codificada por el intrón 4 de la SEQ ID NO:1 de al menos 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 ó 69 aminoácidos. El polipéptido aislado del CSF3R puede fusionarse con uno o más aminoácidos del dominio de unión al ligando del CSF3R.
- 10 Otro objeto de la presente invención radica en el dominio tipo Ig del CSF3R unido a la membrana fusionado con los residuos de aminoácidos 97 a 165 de la SEQ ID NO: 4. Otro objeto de la presente invención radica en el dominio tipo Ig del CSF3R unido a la membrana o un fragmento de este fusionado con un fragmento de la secuencia que consiste en los residuos de aminoácidos 97 a 165 de la SEQ ID NO: 4 donde el fragmento tiene al menos 50 aminoácidos de los residuos de aminoácidos 97-165 de la SEQ ID NO: 4.
- Preferentemente, el dominio de unión al ligando de la presente invención es un dominio tipo inmunoglobulina del CSF3R.
- Preferentemente, el dominio tipo inmunoglobulina de la presente invención es un dominio tipo Ig tipo C2. Preferentemente, el dominio tipo Ig tipo C2 contiene dos residuos de cisteína que forman un puente de disulfuro.
- 15 Preferentemente, un dominio tipo Ig de la presente invención contiene ocho hebras β . Preferentemente, el dominio tipo Ig de la presente invención contiene dos enlaces de disulfuro entre Cis-2-Cis-77 y Cis-22-Cis-28 de la SEQ ID NO: 4, preferentemente entre Cis-2-Cis-28 y Cis-22-Cis-77 de la SEQ ID NO: 4.
- 20 Asimismo se describe el dominio tipo Ig del CSF3R unido a la membrana como se expresa en la SEQ ID NO:10. Preferentemente, el dominio tipo Ig consiste en los residuos de aminoácidos 25 a 120 de la SEQ ID NO:10 (como se expresa en la SEQ ID NO:12) o los residuos de aminoácidos 25 a 117 de la SEQ ID NO: 10.
- Preferentemente, los polipéptidos son solubles, es decir, no contienen una secuencia funcional de fijación a la membrana y por lo tanto pueden circular por los fluidos corporales. En un aspecto más preferido, los polipéptidos de la presente invención son polipéptidos solubles de origen natural.
- 25 Otro objeto de la presente invención radica por tanto en una variante del CSF3R soluble aislada. Preferentemente, la variante soluble aislada del CSF3R es una variante soluble de origen natural.
- Asimismo, las variantes preferidas de polipéptido del CSF3R de la presente invención conservan la capacidad de unir los ligandos naturales del CSF3R. Dichos polipéptidos funcionan por tanto como agonistas y/o antagonistas y pueden utilizarse para estimular y/o inhibir las actividades mediadas por el CSF3R, por ejemplo, en afecciones patológicas. Preferentemente, los polipéptidos de la presente invención funcionan como agonistas del CSF3.
- 30 Otro objeto de la presente invención radica en una variante de polipéptido del CSF3R aislado de conformidad con la presente invención, donde la variante se selecciona de su forma madura, su forma glicosilada, su forma pegilada, su equivalente funcional o su fragmento característico.
- Debe entenderse que el término CSF3R incluye además los equivalentes funcionales de la secuencia anterior, es decir, polimorfismos de origen natural, secuencias que se originan a partir de otras especies, así como secuencias que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que no afectan de forma sustancial la función proteica del CSF3R. Los equivalentes funcionales generalmente muestran un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.
- 35 La secuencia derivada del dominio de unión al ligando del CSF3R puede derivarse o comprender la secuencia de toda o una parte de unión al ligando del dominio extracelular del CSF3R o su equivalente funcional. Como se menciona anteriormente, el equivalente funcional designa cualquier secuencia modificada que comprenda una o más eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos, preferentemente 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50 o más eliminaciones, adiciones y/o sustituciones que conservan la capacidad de unirse a un ligando del CSF3R.
- Una realización específica de la presente invención es una variante de polipéptido del CSF3R que tiene o comprende la SEQ ID NO: 4 o su equivalente funcional que retiene la actividad agonista del CSF3R.
- 45 Una realización específica de la presente invención es una variante de polipéptido del CSF3R que tiene o comprende la SEQ ID NO: 4 o su equivalente funcional que retiene la actividad antagonista del CSF3R.
- La presente solicitud divulga además cualquier polipéptido que comprenda un fragmento característico de una variante de polipéptido del CSF3R como se divulga anteriormente. Un fragmento característico designa un fragmento de al menos 5 aminoácidos consecutivos que comprenden una secuencia de unión formada como resultado de los residuos de aminoácidos intervinientes eliminados. Tal fragmento característico puede comprender preferentemente hasta 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 o más residuos de aminoácidos consecutivos de la variante, preferentemente que contengan la secuencia de unión definida anteriormente. Preferentemente, un fragmento consiste en al menos 6, 7, 8, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 185, 187 ó 188 aminoácidos de la SEQ ID NO:2. Preferentemente, el fragmento consiste en aminoácidos consecutivos.
- 50

- 5 Como se utiliza en la presente, el término "fragmento" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma parte, pero no toda, de la secuencia de aminoácidos del polipéptido del CSF3R o uno de sus equivalentes funcionales. Los fragmentos deberían comprender al menos n aminoácidos consecutivos de la secuencia y en función de la secuencia particular, n preferentemente es 7 o más, preferentemente 8, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 185, 187 ó 188 aminoácidos de la SEQ ID NO:2. Los fragmentos pequeños pueden formar un determinante antigénico.
- Preferentemente, el largo mínimo del fragmento es de 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 68, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ó 500 aminoácidos.
- 10 Preferentemente, el largo máximo del fragmento es de 188, 187, 186, 185, 180, 170, 166, 165, 164, 163, 160, 155, 150, 125, 100, 75 ó 50 aminoácidos.
- Preferentemente, el largo mínimo del fragmento es de 18, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 204, 300, 450, 600, 750, 1050, 1200, 1350 ó 1500 ácidos nucleicos.
- Preferentemente, el largo máximo del fragmento es de 564, 561, 558, 555, 540, 510, 498, 495, 492, 489, 480, 465, 450, 375, 300, 225 ó 150 ácidos nucleicos.
- 15 Preferentemente, el largo máximo de un polipéptido es de 189, 190, 192, 195, 200, 210, 230, 250, 300, 400, 500, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 ó 5000 aminoácidos.
- Preferentemente, el largo máximo de un ácido nucleico n es de 567, 570, 576, 585, 600, 630, 690, 750, 900, 1200, 1500, 1800, 1950, 2100, 2400, 2700, 3000, 5000, 7500, 10000, 20000, 30000, 50000, 75000 ó 100000 ácidos nucleicos.
- 20 Preferentemente, el equivalente funcional tiene al menos un 75% de identidad, preferentemente al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de identidad con la SEQ ID NO: 4.
- Preferentemente, el equivalente funcional tiene un determinante antigénico en común con la SEQ ID NO: 4 que consiste en 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 26, 30, 34, 38 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 25 Un "determinante antigénico" puede ser una parte de un polipéptido de la presente invención que se une a un sitio de combinación de anticuerpo o a un receptor de células T (TCR). De forma alternativa, un "determinante antigénico" puede ser un sitio en la superficie de un polipéptido de la presente invención al cual se une una molécula simple de anticuerpo. Generalmente un antígeno tiene varios o muchos determinantes antigénicos diferentes y reacciona con anticuerpos de muchas especificidades diferentes. Preferentemente, el anticuerpo es inmuno-específico con respecto a un polipéptido de la presente invención. Preferentemente, el anticuerpo es inmuno-específico con respecto a un polipéptido de la invención que no forma parte de una proteína de fusión. Preferentemente, el anticuerpo es inmuno-específico con respecto al CSF3R o un fragmento de este. Los determinantes antigénicos habitualmente consisten en grupos superficiales de moléculas químicamente activos, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Preferentemente, el "determinante antigénico" se refiere a un grupo químico particular en un polipéptido de la presente invención que es antigénico, es decir, que provoca respuesta inmune específica.
- 30
- 35 Preferentemente, el equivalente funcional contiene una o más modificaciones de aminoácidos, una o más sustituciones no conservadoras, una o más sustituciones conservadoras y/o uno o más derivados de aminoácidos.
- 40 Como se utiliza en la presente, "equivalente funcional" se refiere a una molécula de proteína o ácido nucleico que posee características funcionales o estructurales que son sustancialmente similares a una molécula de polipéptido o ácido nucleico de la presente invención. Un equivalente funcional de una proteína puede contener modificaciones en función de la necesidad de dichas modificaciones para la realización de una función específica. El término "equivalente funcional" pretende incluir los fragmentos, mutantes, híbridos, variantes, análogos o derivados químicos de una molécula.
- 45 El derivado funcional comprende al menos una porción unida a uno o más grupos funcionales, lo que ocurre como una o más cadenas laterales en los residuos de aminoácidos. Preferentemente, la porción es una porción de polietileno (PEG). La PEGilación puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos, como los descritos en, por ejemplo, WO99/55377.
- 50 Los polipéptidos pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados por genes, modificados ya sea mediante procesos naturales, como mediante el procesamiento post-transcripcional o mediante técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Entre las modificaciones conocidas que pueden presentarse comúnmente en los polipéptidos de la presente invención se encuentran la glicosilación, el enlace de lípidos, la sulfatación, la carboxilación gama, por ejemplo, de residuos de aminoácidos glutámicos, la hidroxilación y la ADP-ribosilación. Otras posibles modificaciones incluyen la acetilación, la acilación, la amidación, el enlace covalente de flavina, el enlace covalente de una porción de hematina, el enlace covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, el enlace covalente de un derivado de lípido, el enlace covalente de fosfatidilinositol, el entrecruzamiento, la
- 55

ciclización, la formación de enlace de disulfuro, la desmetilación, la formación de enlaces cruzados covalentes, la formación de cisteína, la formación de piroglutamato, la formilación, la formación de anclaje GPI, la yodación, la metilación, la miristoilación, la oxidación, el procesamiento proteolítico, la fosforilación, la prenilación, la racemización, la selenoilación, la adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia como la arginilación y la ubiquitinación.

Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte de un polipéptido, incluida la estructura principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. De hecho, el bloqueo de los extremos amino o carboxilo en un polipéptido, o ambos, mediante una modificación covalente es común en los polipéptidos de origen natural y sintéticos y tales modificaciones pueden encontrarse en polipéptidos de la presente invención.

Las modificaciones que ocurren en un polipéptido a menudo dependerán de cómo esté hecho el polipéptido. Para los polipéptidos que se realizan de forma recombinante, la naturaleza y el alcance de las modificaciones se determinará en gran parte por la capacidad de modificación post-transcripcional de la célula huésped particular y las señales de modificación que se encuentran presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido en cuestión. Por ejemplo, los patrones de glicosilación varían entre los diferentes tipos de células huésped.

Los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse de cualquier forma adecuada. Dichos polipéptidos incluyen polipéptidos de origen natural aislados (por ejemplo, purificados a partir del cultivo celular), polipéptidos producidos de forma recombinante (que incluyen proteínas de fusión), polipéptidos producidos sintéticamente o polipéptidos que se producen mediante la combinación de estos métodos.

Los equivalentes funcionales incluyen variantes biológicas naturales (por ejemplo, variantes alélicas o variantes geográficas dentro de las especies a partir de las cuales se derivan los polipéptidos) y mutantes (como mutantes que contienen sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos) de los polipéptidos del CSF3R. Tales mutantes pueden incluir polipéptidos en los cuales uno o más de los residuos de aminoácidos se encuentran sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede codificarse o no con el código genético. Tales sustituciones típicas se encuentran entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Tr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; entre los residuos básicos Lis y Arg; o entre los residuos aromáticos Fe y Tir. Son particularmente preferidas las variantes en las cuales varios, es decir, entre 5 y 10, 1 y 5, 1 y 3, 1 y 2 o solamente 1 aminoácido se sustituye, elimina o agrega en cualquier combinación. Son especialmente preferidas las sustituciones, adiciones o eliminaciones silenciosas que no alteran las propiedades y actividades de la proteína. Asimismo, son especialmente preferidas en este aspecto las sustituciones conservadoras.

Dichos mutantes incluyen además polipéptidos en los cuales uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente.

De conformidad con la presente invención, cualquier sustitución debe ser preferentemente una sustitución "conservadora" o "segura", que comúnmente se define como una sustitución que introduce aminoácidos que tienen propiedades químicas bastante similares (por ejemplo, un aminoácido básico cargado positivamente debe reemplazarse por otro aminoácido básico cargado positivamente), para preservar la estructura y la función biológica de la molécula.

En literatura existen muchos modelos en los cuales la selección de sustituciones de aminoácidos conservadoras puede realizarse en base a estudios estadísticos y físico-químicos sobre la secuencia y/o estructura de las proteínas (Rogov S I and Nekrasov A N, 2001). Los experimentos de diseño de proteínas indican que el uso de subgrupos específicos de aminoácidos puede producir proteínas activas y plegables, lo que ayuda a la clasificación de las sustituciones "sinónimas" de aminoácidos, que pueden acomodarse más fácilmente en la estructura proteica y que pueden utilizarse para detectar homólogos funcionales y estructurales y parálogos (Murphy L R et al., 2000). Los grupos de aminoácidos sinónimos y los grupos de aminoácidos sinónimos preferidos se muestran en la Tabla 1.

También pueden introducirse las mutaciones no conservadoras específicas en los polipéptidos de la invención con diferentes propósitos. Las mutaciones que reducen la afinidad del dominio de FN3 que contiene proteínas pueden aumentar su capacidad de reutilizarse o reciclarse, lo que aumenta de forma potencial su fuerza terapéutica (Robinson C R, 2002). Los epítomos inmunogénicos oportunamente presentes en los polipéptidos de la invención pueden explotarse para desarrollar vacunas (Stevanovic S, 2002), o pueden eliminarse a través de la modificación de su secuencia mediante el seguimiento de métodos conocidos para la selección de mutaciones para aumentar la estabilidad proteica y corregirlos (van den Burg B and Eijsink V, 2002; WO 02/05146, WO 00/34317 y WO 98/52976).

En una alternativa preferida, los grupos sinónimos para los derivados de aminoácidos incluidos en los péptidos miméticos son aquellos que se definen en la tabla 2. Una lista no exhaustiva de derivados de aminoácidos incluye además el ácido aminoisobutírico (Aib), hidroxiprolina (Hyp), 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-COOH, ácido indolina-2-carboxílico, 4-difluoro-prolina, ácido L-tiazolidina-4-carboxílico, L-homoprolina, 3,4-dehidro-prolina, 3,4-dihidroxifenilalanina, ciclohexil-glicina y fenilglicina.

- 5 La expresión “derivado de aminoácido” se refiere a un aminoácido o a una entidad química similar al aminoácido diferente de los 20 aminoácidos codificados genéticamente de origen natural. En particular, el derivado de aminoácido puede contener porciones alquilo cíclicas, ramificadas, lineales, sustituidas o no sustituidas y puede incluir uno o más heteroátomos. Los derivados de aminoácidos pueden producirse nuevamente u obtenerse mediante fuentes comerciales (Calbiochem-Novabiochem AG, Switzerland; Bachem, EE.UU.).
- 10 En la bibliografía se divulgan varias metodologías para incorporar derivados de aminoácidos no naturales en las proteínas, mediante el uso de sistemas de transcripción tanto in vitro como in vivo, para sondear y/o mejorar la estructura y función proteica (Dougherty D A, 2000). Las técnicas para la síntesis y el desarrollo de péptidos miméticos, así como miméticos no péptidos, son asimismo muy conocidas en la técnica (Golebiowski A et al., 2001; Hruby V J y Balse P M, 2000; Sawyer T K, in “Structure Based Drug Design”, publicado por Veerapandian P, Marcel Dekker Inc., pg. 557-663, 1997).
- 15 La “identidad” indica que en cualquier posición en particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre secuencias.
- 20 Generalmente, una identidad mayor al 30% entre dos polipéptidos se considera un indicio de equivalencia funcional. Preferentemente, los polipéptidos funcionalmente equivalentes del primer aspecto de la invención tienen un grado de identidad de secuencia con los polipéptidos del CSF3R mayor al 85%, 90%, 95%, 98%, 98,5%, 99% ó 99,5%, respectivamente.
- 25 Preferentemente, el “equivalente funcional” puede ser una molécula de proteína o ácido nucleico que muestra cualquiera de las actividades funcionales de los polipéptidos de la presente invención.
- 30 Preferentemente, el “equivalente funcional” puede ser una molécula de proteína o ácido nucleico que muestra una actividad sustancialmente similar en comparación con el CSF3R o sus fragmentos en un ensayo adecuado para medir la actividad o función biológica. Preferentemente, el “equivalente funcional” puede ser una molécula de proteína o ácido nucleico que muestra una actividad idéntica o mayor en comparación con el CSF3R o sus fragmentos en un ensayo adecuado para la medición de la actividad o función biológica. Preferentemente, el “equivalente funcional” puede ser una molécula de proteína o ácido nucleico que muestra una actividad del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100% o mayor en comparación con el CSF3R o sus fragmentos en un ensayo adecuado para la medición de la actividad o función biológica.
- 35 Preferentemente, el “equivalente funcional” puede ser una proteína o polipéptido capaz de inhibir una actividad in vivo o in vitro sustancialmente similar a los polipéptidos de la presente invención. Preferentemente, el “equivalente funcional” puede ser una proteína o un polipéptido capaz de interactuar con otras moléculas celulares o extracelulares de manera sustancialmente similar a la forma en la cual lo haría la porción correspondiente de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, un “equivalente funcional” podría, en un inmunoensayo, disminuir el enlace de un anticuerpo al péptido correspondiente (es decir, el péptido, la secuencia de aminoácidos que se modificó para alcanzar el “equivalente funcional”) del polipéptido de la invención, o al polipéptido de la invención en sí mismo, donde el anticuerpo se aumentó contra el péptido correspondiente del polipéptido de la invención. La concentración equimolar del equivalente funcional disminuirá el enlace mencionado anteriormente del péptido correspondiente en al menos aproximadamente un 5%, preferentemente entre aproximadamente un 5% y un 10%, más preferentemente entre aproximadamente un 10% y un 25%, aún más preferentemente entre aproximadamente un 25% y un 50% y más preferentemente entre aproximadamente un 40% y un 50%.
- 40 Por ejemplo, los equivalentes funcionales pueden ser completamente funcionales o pueden carecer de función en una o más actividades. Por tanto, en la presente invención, las variaciones pueden afectar la función, por ejemplo, de las actividades del polipéptido que reflejan su posesión de un dominio tipo Ig.
- 45 La actividad de un polipéptido de la presente invención puede confirmarse en al menos uno de los siguientes ensayos:
- 50 en la modulación de la proliferación, supervivencia y maduración de las células comprometidas con la estirpe de granulocitos neutrófilos, o
- en la modulación de la activación de múltiples vías de transducción de señales, que incluyen los transductores de señal y los activadores de transcripción (STAT), Ras/Raf/Erk, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K)/Akt, y también las proteasas Stat como la proteasa Stat5, o
- en la mejora de la función cardíaca, o
- en la modulación de la inducción de proteínas anti-apoptóticas, la inhibición de la muerte apoptótica de cardiomiocitos después del infarto de miocardio y la mejora de la función cardíaca, o
- en la reducción de la apoptosis de las células endoteliales y el aumento de la vascularización en el corazón afectado de infarto como protección contra la lesión isquémica, o

- en la supervivencia de miocitos cardíacos y en la prevención de la remodelación del ventrículo izquierdo después del infarto de miocardio, o
- en la supervivencia prolongada y aumento en la activación de neutrófilos combinado con una liberación sostenida de citocinas antiinflamatorias en pacientes que padecen de neumonía adquirida en la comunidad (CAP), o
- 5 en la sinergia con el factor acero (ligando SF, Kit) o ligando Flt3/Flk2 (FL) que ayuda a la proliferación de los progenitores hematopoyéticos primitivos, o
- en la inhibición de la actividad biológica del CSF3 en la formación de la colonia de médula ósea normal, en la inhibición del efecto estimulador del CSF3 en la proliferación de células progenitoras leucémicas para formar colonias de blastocitos leucémicos.
- 10 Se divulga además la administración de un polipéptido de la presente invención a un paciente para ejercer una o más de las actividades biológicas descritas anteriormente.
- De forma alternativa, la actividad de un polipéptido de la presente invención puede confirmarse en al menos uno de los siguientes ensayos (como lo analizó Rutella et al. J. Immunol. 2005 Dec. 1; 175(11):7085-91):
- en la modulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas madre normales (HSCs), o
- 15 en la modulación de la reconstitución de neutrófilos después de la mielosupresión inducida por radiación o quimioterapia, o
- en la modulación de funciones efectoras en neutrófilos maduros y la movilización de las HSC de la médula ósea en la sangre periférica, o
- 20 en la interacción con el sistema inmune mediante la alteración de la reactividad de las células T y la modificación de la función de la APC (por ejemplo, la modulación del CSF que se une a las células CD3 + T humanas activadas por mitógenos y a las líneas de células T linfoblastoides; por ejemplo, la modulación de los genes inmunomoduladores de las células T, por ejemplo, GATA-3 y Stat5 que inhiben directamente la producción de citocina proinflamatoria mediante células T en dosis farmacológicas), o
- 25 en la modulación de la producción de citocina (por ejemplo, la modificación de la producción de citocina ex vivo mediante glóbulos blancos humanos; por ejemplo, la modulación de la producción de IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-18, y TNF- α mediante sangre entera y/o monocitos estimulados por LPS; por ejemplo, la modulación de la liberación inducida por LPS del antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra) y TNFR soluble p55 y p75; por ejemplo, la modulación de los niveles en plasma de TNFR e IL-1 β solubles en comparación con los individuos de control no tratados previamente con un polipéptido de la presente invención en voluntarios saludables a los que posteriormente se les administró la endotoxina Salmonella abortus equi, lo que sugirió efectos antiinflamatorios in vivo; por ejemplo, la modulación de la producción de TNF- α mediante PBMC normales, activados por aloantígenos a un nivel posttranscripcional; la modulación de la elevación del factor de crecimiento de hepatocitos séricos, una citocina angiogénica que puede contribuir a la formación de microvasos inducida por el CSF3; por ejemplo, la modulación de los niveles de HLA Ags soluble humano, por ejemplo, HLA-G y HLA clase I, que según se dice modula las respuestas aloinmunes), o
- 30 en la diferenciación in vitro de células dendríticas (DC) con capacidad tolerogénica, o
- en la modulación de las funciones de las células T (por ejemplo, en individuos saludables, la modulación de la inhibición de la proliferación de las células T en respuesta a mitógenos mediante la liberación de factores inhibidores solubles; por ejemplo, la modulación de la capacidad de las células NKT de expandir la respuesta in vitro a la α -galactosilceramida; por ejemplo, la movilización células T regulatorias (Treg) CD4 + CD25 + FoxP3 + de la médula ósea funcional, así como el supresor natural de células T CD4 - CD8 - TCR α + β +, modulación de la expresión de CXCL12/SDF-1 α , un ligando CXCR4, en la médula ósea, que de este modo modula el tráfico de células Treg CD4 + CD25 +; por ejemplo, la modulación de las respuestas mitogénicas de las células T y la citotoxicidad mediada por células del destructor activado por linfocina, que ha sido correlacionada con la expresión de los alelos de HLA individuales), o
- 40 en la inducción de las células Treg (por ejemplo, la modulación de la generación de las células Tr1 humanas; por ejemplo, la modulación de la generación de las células Treg que producen IL-10 y la promoción de la tolerancia de trasplante), o
- en la modulación del número y función de las DC (por ejemplo, la movilización de DC2, que induce a las células T alogénicas no activadas a producir IL-4 e IL-10; por ejemplo, la modulación de la expresión del CCR7 en las células dendríticas sanguíneas, lo que afecta la capacidad de migración y de regresar a su lugar de origen de las DC; por ejemplo, la modulación de la producción de IL-12 mediante la recuperación de DC después del trasplante mieloablativo de HSC; por ejemplo, la modulación de la producción de IL-10 e IFN- α , que se encuentran implicados en la diferenciación de las células Treg, por ejemplo, en la vía de diferenciación de las DC humanas derivadas de monocitos), o
- 50

en la expansión de precursores mieloides como las APC tolerogénicas (por ejemplo, en la expansión de una población precursora de GM murina con actividad regulatoria; por ejemplo, en la modulación del desarrollo de GVHD cuando se cotransplanta en animales receptores alogénicos; por ejemplo, en la diferenciación in vitro de las células Treg específicas para Ags huésped favorecida por la expansión de células GM), o

5 en la modulación del trasplante de las HSC (por ejemplo, mediante el uso de un sistema de resistencia híbrido en el cual las células NK median el rechazo vigoroso, la modulación de la inserción de células parentales de médula ósea y la aparición de colonias esplénicas del donante mediante el pretratamiento continuo de ratones híbridos F 1 ; por ejemplo, la aceptación de células de médula ósea de rata xenotransplantadas en ratones transgénicos que expresan un polipéptido de la invención; por ejemplo, en la regulación hacia abajo de la proliferación de las células T a mitógenos y aloantígenos y la disminución de la producción de citocina de tipo 1 mediante células T en ratones; por ejemplo, la liberación de IL-4 mediante células T tratadas con un polipéptido de la invención, que es coherente con un cambio en el patrón de citocina Th2 ; por ejemplo, la capacidad de las células donantes de mediar la GVHD aguda y la mejora en la supervivencia total en ratones receptores después del pretratamiento de ratones donantes con un polipéptido de la invención; por ejemplo, el aumento en la frecuencia de células T CD4 – CD8 – NK1.1 + responsables de la secreción de grandes cantidades de IL-4 en ratones donantes tratados con un polipéptido de la invención), o

en la estimulación de la diferenciación neuronal de progenitores, neurogénesis y mejora del resultado en la conducta después de una lesión isquémica.

20 Se describe además la administración de un polipéptido de la presente invención a un paciente para ejercer una o más de las actividades biológicas descritas anteriormente.

Para confirmar la actividad biológica de un polipéptido de la presente invención, diversos ensayos conocidos pueden emplearse de forma separada o en combinación. En Schneider et al. J Clin Invest. agosto de 2005; 115(8):2083-98, en Schneider et al. Cell Cycle. Diciembre de 2005; 4(12):1753-7 y en la solicitud de patente US2005/0142102 se describe un ejemplo para determinar la función de un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, los métodos para confirmar la función de sCFS3R incluyen un ensayo de formación de colonias que emplea células de médula ósea murina; la estimulación de la proliferación de células de médula ósea inducida por sCFS3R; bioensayos específicos con líneas celulares que pueden depender de sCFS3R para su crecimiento o que pueden responder a sCFS3R (por ejemplo, AML-193; 32D; BaF3; GNFS-60; HL-60, MI; NFS-60; OCI/AML1a; and WEHI-3B). Estos y otros ensayos se describen en Braman et al. Am. J. Hematology 39: 194-201 (1992); Clogston C L et al Anal Biochem 202: 375-83 (1992); Hattori K et al Blood 75: 1228-33 (1990); Kuwabara T et al Journal of Pharmacobiodyn 15: 121-9 (1992); Motojima H et al Journal of Immunological Methods 118: 187-92 (1989); Sallerfors B and Olofsson European Journal of Haematology 49: 199-207 (1992); Shorter S C et al Immunology 75: 468-74 (1992); Tanaka H and Kaneko Journal of Pharmacobiodyn. 15: 359-66 (1992); Tie F et al Journal of Immunological Methods 149: 115-20 (1992); Watanabe M et al Anal. Biochem. 195: 38-44 (1991).

35 En un aspecto más preferido, la actividad de un polipéptido de la presente invención se confirma mediante la medición de la proliferación de los progenitores hematopoyéticos primitivos, mediante la determinación del número de colonias formadas por plato en el correr de uno, dos o tres días en la presencia de una variante de polipéptido del CSF3R aislado de la presente invención (ver Ku et al.). Preferentemente, la actividad se confirma si al menos 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 o más colonias se forman por plato. Preferentemente, las colonias se forman en un día. Preferentemente, puede utilizarse cualquier cantidad activa de polipéptido del CSF3R.

La presente invención se refiere asimismo a proteínas de fusión que comprenden un polipéptido del CSF3R como se divulga anteriormente, ligado operativamente a un dominio de aminoácido adicional. El dominio adicional de aminoácidos puede ubicarse corriente arriba (N-ter) o corriente abajo (C-ter) de la secuencia del polipéptido del CSF3R. El dominio adicional puede comprender cualquier región funcional, que proporcione por ejemplo, un aumento en la estabilidad, enfoque o biodisponibilidad de la proteína de fusión; lo que facilita la purificación o producción, o confiere a la actividad biológica adicional de la molécula. Los ejemplos típicos de dichos dominios adicionales de aminoácidos incluyen, a modo no taxativo, un marcador, un péptido dirigido, una región constante de una inmunoglobulina, un dominio de multidimerización y/o una proteína biológicamente activa o un fragmento de esta o una hormona proteica heterodimérica como la gonadotropina coriónica humana (hCG) como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.193.972. El término "operativamente ligado" indica que el polipéptido y el dominio adicional de aminoácidos se encuentran asociados a través de un enlace peptídico, ya sea directamente o mediante residuos espaciadores (por ejemplo, uno o más motivos Gly-Ser). De esta forma, la proteína de fusión puede producirse recombinantemente, mediante la expresión directa en una célula huésped de una molécula de ácido nucleico que la codifica, como se describirá a continuación. Asimismo, si fuera necesario, la secuencia adicional de aminoácidos incluida en las proteínas de fusión puede eliminarse, ya sea al final del proceso de producción/purificación o in vivo, por ejemplo, mediante una exopeptidasa adecuada. Por ejemplo, una secuencia espaciadora incluida en la proteína de fusión puede comprender un sitio de reconocimiento para una endopeptidasa (como una caspasa) que puede utilizarse para separar mediante escisión enzimática la variante de polipéptido deseada del dominio adicional de aminoácidos, ya sea in vivo o in vitro.

Los ejemplos específicos de residuos de aminoácidos adicionales incluyen una secuencia marcadora seleccionada, por ejemplo, de una secuencia de GST y una secuencia marcadora His. La secuencia marcadora puede encontrarse unida al extremo C o al extremo N de la variante de polipéptido del CSF3R, preferentemente al extremo C.

5 En una realización particular, los residuos de aminoácidos adicionales funcionan como un péptido señal que dirige la secreción de la proteína. El CSF3R es una proteína transmembrana tipo I. Las variantes de polipéptido del CSF3R de la presente invención pueden, sin embargo, fusionarse con una secuencia señal heteróloga, en el extremo N del polipéptido, para permitir o aumentar la secreción de este. Dicho péptido señal puede ser cualquier secuencia funcional en una célula huésped seleccionada como una célula huésped eucariota (por ejemplo, mamífera) o procariota. Los ejemplos de dichos péptidos señal son conocidos en la técnica.

10 En otra realización particular, los residuos de aminoácidos adicionales en la proteína de fusión comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de la región constante de una inmunoglobulina, particularmente la porción Fc de una inmunoglobulina humana. La secuencia de la porción Fc puede derivarse, por ejemplo, de una IgG, preferentemente de una IgG humana. Preferentemente, se encuentra fusionada con regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3, opcionalmente con la región eje de la IgG1 humana, por ejemplo. La parte Fc puede por ejemplo, mutarse para prevenir actividades indeseadas, como el enlace complementario, enlace a los receptores Fc, o similar. Por tanto, dicha secuencia Ig puede además modificarse para reducir la función efectora o para aumentar la estabilidad de un dímero resultante. La secuencia de aminoácidos derivada de la región constante de una inmunoglobulina puede encontrarse unida al extremo C o al extremo N de la variante de polipéptido del CSF3R, preferentemente al extremo C.

20 La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden el polipéptido del primer aspecto de la invención y una porción de una inmunoglobulina se describen en el ejemplo 11 de la WO 99/09063, por ejemplo. Otras isoformas de las moléculas de Ig son también adecuadas para la generación de proteínas de fusión de conformidad con la presente invención, como isoformas IgG 2 o IgG 4, u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas, multiméricas, hétero o homomultiméricas.

25 Otras proteínas de fusión del polipéptido del primer aspecto de la invención pueden prepararse mediante la fusión de dominios aislados de otras proteínas lo que permite la formación de dímeros, trímeros, etc. Los ejemplos de secuencias proteicas que permiten la multidimerización de los polipéptidos de la invención son dominios aislados de proteínas como hCG (WO 97/30161), colágeno X (WO 04/33486), C4BP (WO 04/20639), proteínas Erb (WO 98/02540), o péptidos super espiral (WO 01/00814). Los polipéptidos pueden contener aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados por genes, modificados ya sea mediante procesos naturales, como mediante el procesamiento post-transcripcional o mediante técnicas de modificación química conocidas en la técnica. Entre las modificaciones conocidas que pueden presentarse comúnmente en los polipéptidos de la presente invención se encuentran la glicosilación, el enlace de lípidos, la sulfatación, la carboxilación gama, por ejemplo, de residuos de aminoácidos glutámicos, la hidroxilación y la ADP-ribosilación. Otras modificaciones potenciales incluyen la acetilación, la acilación, la amidación, el enlace covalente de flavina, el enlace covalente de una porción de hematina, el enlace covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, el enlace covalente de un derivado de lípido, el enlace covalente de fosfatidilinositol, el entrecruzamiento, la ciclización, la formación de enlace de disulfuro, la desmetilación, la formación de enlaces cruzados covalentes, la formación de cisteína, la formación de piroglutamato, la formilación, la formación de anclaje GPI, la yodación, la metilación, la miristoilación, la oxidación, el procesamiento proteolítico, la fosforilación, la prenilación, la racemización, la selenoilación, la adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia como la arginilación y la ubiquitinación.

40 En otra realización particular, los residuos de aminoácidos adicionales en la proteína de fusión comprenden un dominio de multidimerización, lo que permite que los complejos se formen entre dos o más proteínas de fusión de la presente invención o entre una o más proteínas de fusión de la presente invención y una proteína diferente. Un ejemplo de dichos dominios de multidimerización incluye una cremallera de leucina. El dominio de multidimerización puede encontrarse unido al extremo C o al extremo N de la variante de polipéptido del CSF3R, preferentemente al extremo C.

45 Debe entenderse que las proteínas de fusión de la presente invención pueden comprender ya sea solamente uno de los residuos de aminoácidos adicionales anteriores o una combinación de estos. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender un péptido señal y una secuencia marcadora, o un péptido señal y un dominio de multidimerización o un péptido señal y una región constante de una inmunoglobulina, o un marcador y la región constante de una inmunoglobulina. Asimismo, como se indica anteriormente, algunas de las secuencias de aminoácidos adicionales pueden encontrarse unidas a la variante de polipéptido del CSF3R mediante residuos espaciadores, particularmente mediante residuos espaciadores escindibles lo que permite la separación posterior de estos elementos si fuera necesaria. Tales proteínas de fusión pueden producirse mediante cualquier técnica convencional conocida en la técnica, como se discutirá a continuación.

50 Por lo tanto, de conformidad con una realización de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión híbrida que es una proteína multimérica que comprende más de un polipéptido de fusión. Por lo tanto, las proteínas de fusión descritas anteriormente pueden formar homodímeros y heterodímeros y estos también se encuentran comprendidos en la invención. La proteína de fusión híbrida puede contener dos, tres, cuatro o más polipéptidos de

fusión de conformidad con la primera realización del sexto aspecto de la invención descrita anteriormente. Preferentemente, la proteína de fusión híbrida es un dímero que comprende dos polipéptidos de fusión como se describe anteriormente. Si la proteína de fusión es un dímero, puede ser un homodímero o un heterodímero. Preferentemente, la proteína de fusión híbrida comprende o consiste en más de un polipéptido de fusión seleccionado de los polipéptidos de fusión anteriores. La invención incluye por tanto homodímeros que comprenden dos polipéptidos de fusión. La invención incluye además heterodímeros que comprenden combinaciones de estas secuencias.

Las proteínas no derivadas de inmunoglobulina como las hormonas proteináceas heterodiméricas pueden por tanto utilizarse para preparar proteínas de fusión. Las proteínas de fusión emplean cadenas α y β de una hormona heterodimérica o una porción de esta como andamiaje al cual un polipéptido de la presente invención se encuentra unido. Un ejemplo de hormona proteinácea heterodimérica es la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), que es una proteína secretada de forma estable con una larga vida media. Los ejemplos de proteínas híbridas que emplean la hCG pueden encontrarse en la patente de los Estados Unidos No. 6.194.177 y Campbell et al.

En general, las proteínas híbridas de la invención incluyen al menos dos cadenas de polipéptidos, donde cada cadena de polipéptido incluye al menos un polipéptido de la presente invención unido a una subunidad de una hormona proteinácea heterodimérica o un fragmento de esta. Los ejemplos de hormonas proteináceas heterodiméricas para su uso en la presente invención incluyen de modo no taxativo la FSH, inhibina, TSH, hCG y LH.

En algunas realizaciones, una de las subunidades de la hormona proteinácea heterodimérica en la proteína híbrida comprende una o más alteraciones que reducen o eliminan la actividad biológica de la hormona, mientras que preservan la habilidad de la subunidad alterada de dimerizarse con otra subunidad de la hormona. En algunas realizaciones, una subunidad alterada es una subunidad alfa de la hCG que comprende la eliminación de los aminoácidos 88-92 (del 88-92), denominada des88-92, lo que produce la hCG biológicamente inactiva; no obstante, preserva la habilidad de la subunidad alfa de dimerizarse con la subunidad beta de la hCG (la eliminación de solamente cinco residuos en el extremo carboxilo-terminal de una subunidad de la hCG puede eliminar de forma eficaz su actividad biológica mientras preserva su capacidad de formar heterodímeros). En otra realización, una subunidad alterada es una subunidad alfa que comprende la sustitución de un residuo de cisteína en una posición de aminoácido 26 con una alanina (C26A). En otra realización, una subunidad alterada es una subunidad alfa que comprende la eliminación de los aminoácidos 88-92 y la sustitución de un residuo de cisteína en una posición de aminoácido 26 con una alanina (C26A). En otra realización, una subunidad alterada es una subunidad beta que comprende una eliminación de los aminoácidos 104-145 (del 104-145). Las proteínas híbridas de la invención pueden comprender: a) una subunidad alfa alterada y una subunidad beta inalterada; b) una subunidad alfa alterada y una subunidad beta alterada; c) una subunidad alfa inalterada y una subunidad beta alterada; o d) una subunidad alfa inalterada y una subunidad beta inalterada.

Los polipéptidos de proteínas de fusión de la invención pueden encontrarse en forma aislada o en forma de conjugados activos o sus complejos.

A este sentido, un objeto particular de la presente invención radica en un conjugado que comprende una variante de polipéptido del CSF3R o una proteína de fusión como se define anteriormente. El conjugado comprende al menos un grupo químico (covalente) acoplado a un polipéptido, como una etiqueta, estabilizador, toxina, fármaco, etc. En una realización particular, el conjugado comprende una molécula seleccionada de etiquetas radioactivas, biotina, etiquetas fluorescentes, agentes citotóxicos, fármacos o agentes de administración de fármacos, acoplados covalentemente a cualquier residuo de aminoácidos de la variante de polipéptido del CSF3R. Los conjugados útiles pueden generarse mediante el uso de moléculas y métodos conocidos por sí mismos en la técnica, por ejemplo, para permitir la detección de la interacción con un ligando (etiquetas fluorescentes o radioactivas, biotina), o para mejorar los agentes en términos de eficacia de administración del fármaco, como el polietilenglicol y otros polímeros naturales o sintéticos (Harris J M y Chess R B, 2003; Greenwald R B et al., 2003; Pillai 0 y Panchagnula R, 2001).

La presente solicitud describe un complejo de receptores que comprende una variante de polipéptido del CSF3R o una proteína de fusión o un conjugado como se define anteriormente. Dichos complejos de receptores generalmente comprenden un multímero formado entre dos o más proteínas de fusión de la presente invención, o entre una o más proteínas de fusión de la presente invención y una proteína diferente. La multimerización puede obtenerse mediante dominio(s) de multidimerización particular(es) contenido(s) en las proteínas, como se describe anteriormente. Tales multímeros pueden formarse in vitro, o pueden formarse in vivo, tras la administración a un organismo.

Los polipéptidos y proteínas de fusión de la presente invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida por sí misma en la técnica, como mediante tecnologías recombinantes, síntesis química, clonación, ligadura, o sus combinaciones.

En una realización particular, los polipéptidos o proteínas de fusión se producen mediante tecnologías recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un ácido nucleico correspondiente en una célula huésped adecuada.

A este respecto, el término "molécula de ácido nucleico" comprende cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido o una proteína de fusión como se divulga anteriormente. El ácido nucleico puede ser un ADN (por ejemplo, ADNc, gADN, ADN sintético, etc.) un ARN (por ejemplo, ARNm), un APN (ácido péptido nucleico), etc., más

preferentemente un ADN, aún más preferentemente una molécula de ADNc. Un objeto particular de la presente invención radica más específicamente en una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 11, o una hebra complementaria o su secuencia degenerada.

5 El término “molécula de ácido nucleico purificada” preferentemente se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención que (1) se separó de al menos aproximadamente un 50 por ciento de proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los cuales se encuentra naturalmente cuando la totalidad del ácido nucleico se aísla de las células fuente, (2) no se encuentra unida a la totalidad o a una porción de un polinucleótido al cual la “molécula de ácido nucleico purificada” se encuentra unida en forma natural, (3) se encuentra unida operativamente a un polinucleótido que no se encuentra unido en forma natural o (4) no ocurre naturalmente como parte de una secuencia mayor de polinucleótidos. Preferentemente, la molécula aislada de ácido nucleico de la presente invención se encuentra sustancialmente libre de cualquier otra molécula de ácido nucleico contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su ambiente natural que puedan interferir con su uso en la producción de polipéptidos o su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación. En una realización preferida, el ADN genómico se excluye específicamente del alcance de la presente invención. Preferentemente, el ADN genómico mayor a 10 kbp (kilo pares de bases), 50 kbp, 100 kbp, 150 kbp, 200 kbp, 250 kbp o 300 kbp se excluye específicamente del alcance de la invención. Preferentemente, la “molécula de ácido nucleico purificada” consiste únicamente en ADNc.

20 Una secuencia degenerada designa cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos como una secuencia de nucleótidos de referencia, pero comprende una secuencia de nucleótidos diferente como resultado de la degeneración del código genético.

Un objeto adicional de la presente invención es un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos como se define anteriormente. El vector puede ser cualquier vector de clonación o expresión, que se replique de forma integral o autónoma, que sea funcional en cualquier célula procariota o eucariota. En particular, el vector puede ser un plásmido, cósmido, virus, fago, episoma, cromosoma artificial y similar. El vector puede comprender elementos reguladores, como promotores, finalizadores, mejoradores, marcadores de selección, origen de la réplica, etc. Los ejemplos específicos de dichos vectores incluyen plásmidos procarióticos, como plásmidos pBR, pUC o pcADN; vectores virales, incluidos los vectores retrovirales, adenovirales o AAV; bacteriofagos, baculovirus, BAC o YAC, etc. como se discutirá a continuación.

30 Un aspecto adicional de la presente invención es una célula huésped recombinante, donde dicha célula comprende una molécula de ácido nucleico o un vector como se define anteriormente. La célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota. Los ejemplos de células procariotas incluyen bacterias como E. coli. Los ejemplos de células eucariotas son células de levadura, células vegetales, células mamíferas, incluido cualquier cultivo de célula primario o línea celular establecida (por ejemplo, 3T3, Vero, HEK293, TN5, etc.). Las células mamíferas particularmente preferidas de la presente invención son las células CHO.

35 Un objeto adicional de la presente invención es un método para producir una variante de polipéptido del CSF3R o proteína de fusión como se define anteriormente, el método comprende el cultivo de una célula huésped recombinante de la invención en condiciones que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico y la recuperación del polipéptido producido. El polipéptido puede recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo celular si el polipéptido es secretado, o a partir del citoplasma o desechos celulares, si fuera adecuado. El producto de polipéptido puede glicosilarse o no, o contener otras modificaciones post-traslacionales en función de la célula huésped que se utilice. Los sitios preferidos de glicosilación radican en el aminoácido 51, 93, 128, 134, 389, 474, 579, 610 de la SEQ ID NO: 10.

45 En muchos libros y reseñas se proporcionan demostraciones de cómo clonar y producir proteínas recombinantes mediante el uso de vectores y células huésped procariotas o eucariotas, como algunos títulos en las series “A Practical Approach” publicado por Oxford University Press (“DNA Cloning 2: Expression Systems”, 1995; “DNA Cloning 4: Mammalian Systems”, 1996; “Protein Expression”, 1999; “Protein Purification Techniques”, 2001).

50 En general, los vectores pueden ser episomales o vectores de integración no homóloga, que pueden introducirse en las células huésped adecuadas mediante cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección directa, etc.) para su transformación. Los factores de importancia en la selección de un vector plásmido, viral o retroviral particular incluyen: la facilidad con la cual las células receptoras que contienen el vector pueden reconocerse y seleccionarse de aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desean en un huésped particular; y si se desea que sea posible “trasladar” el vector entre las células huésped de diferentes especies. Estos vectores deben permitir la expresión del polipéptido o proteínas de fusión de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, bajo el control de secuencias reguladoras de inicio/finalización transcripcionales adecuadas, que se eligen para ser constitutivamente activas o inducibles en dicha célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida en dichas células pueden aislarse para proporcionar líneas celulares estables.

Un método particularmente preferido de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante de la presente invención se realiza mediante el uso de la amplificación de la dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO

DHFR-deficientes, mediante el uso de niveles incrementados sucesivamente de metotrexato como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4,889,803. El polipéptido obtenido puede encontrarse en forma glicosilada.

5 Para las células huésped eucariotas (por ejemplo, células de levadura, insectos o mamíferas), pueden emplearse diferentes secuencias reguladoras transcripcionales y transnacionales, en función de la naturaleza del huésped. Pueden derivarse de fuentes virales, como adenovirus, virus del papiloma, virus simio o similar, donde las señales reguladoras se asocian con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Los ejemplos son el promotor de TK del virus Hepes, el promotor inicial SV40, el promotor de genes de levadura gal4, etc. Se pueden seleccionar señales reguladoras de inicio transcripcionales que permiten la represión y activación de forma tal que la expresión de los genes puede modularse. Las células que se transformaron de forma estable mediante el ADN introducido
10 pueden seleccionarse mediante la introducción de uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped que contienen el vector de expresión. El marcador puede proporcionar fototrofia a un huésped autotrófico, resistencia a biocidas, por ejemplo, antibióticos o metales pesados como el cobre o similar. El gen marcador seleccionable puede unirse directamente a las secuencias de ADN que se expresarán (por ejemplo, en el mismo vector) o introducirán en la misma célula mediante co-transfección. Los elementos adicionales pueden ser asimismo necesarios para una síntesis óptima de proteínas de la invención.

Las células procariotas particularmente adecuadas incluyen bacterias (como *Bacillus subtilis* o *E. coli*) transformadas con un vector de expresión de ADN bacteriofago recombinante, plásmido o cósmido. Dichas células generalmente producen proteínas que comprenden un residuo de metionina N-terminal y dichas proteínas representan objetos particulares de la presente invención. Las células preferidas para utilizarse en la presente invención son
20 células huésped eucariotas, por ejemplo, células mamíferas, como humanas, de monos, ratones, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), porque proporcionan modificaciones post-traslacionales a las moléculas proteicas, incluidos el plegado correcto o glicosilación en los sitios correctos. Las células huésped eucariotas alternativas son células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, etc.) transformadas con vectores de expresión de levadura. Asimismo, las células de levadura pueden realizar modificaciones peptídicas post-traslacionales que incluyen la glicosilación. Existen varias estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y un gran número de copia de plásmidos que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en la levadura. Las células de levadura reconocen las secuencias precursoras en productos de genes mamíferos clonados y secretan polipéptidos que presentan secuencias precursoras (es decir, pre-peptidos).

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de un polipéptido recombinante se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el polipéptido de interés pueden transformarse mediante el uso de vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en un vector separado. Después de la introducción del vector, las células pueden cultivarse durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de las células que expresan de forma exitosa las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células transformadas de forma estable pueden proliferarse mediante el uso de técnicas de cultivo de tejidos adecuadas para el tipo de célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida en dichas células puede aislarse para proporcionar líneas celulares estables.

Las líneas celulares mamíferas disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen a modo no taxativo, células de ovario de hámster chino (CHO), de HeLa, de riñón de cría de hámster (BHK), de riñón de mono (COS), C127, 3T3, BHK, HEK 293, melanoma de Bowes y carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo Hep G2) y otras líneas celulares. En el sistema de baculovirus, los materiales para los sistemas de expresión celular de baculovirus/insecto se encuentran comercialmente disponibles en forma de kit de Invitrogen, entre otros.

Además de las tecnologías de ADN recombinante, los polipéptidos o proteínas de fusión de la presente invención pueden prepararse mediante tecnologías de síntesis química. Los ejemplos de tecnologías de síntesis química son la síntesis de fase sólida y la síntesis de fase líquida. Como síntesis de fase sólida, por ejemplo, el aminoácido que corresponde al extremo carboxilo del polipéptido que va a sintetizarse se encuentra unido a un soporte que es insoluble en solventes inorgánicos y mediante la repetición alternada de reacciones (por ejemplo, mediante la condensación secuencial de aminoácidos con sus grupos amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos por grupos protectores adecuados), se extiende la cadena de polipéptidos. Los métodos de síntesis de fase sólida se clasifican ampliamente por el método tBoc y el método Fmoc, en función del tipo de grupo protector utilizado. Las proteínas completamente sintéticas de tamaño comparable al del CSF3R se divulgan en la bibliografía (Brown A et al., 1996).

55 Los polipéptidos de la presente invención pueden producirse, formularse, administrarse o utilizarse genéricamente en otras formas alternativas que pueden ser preferidas de conformidad con el método deseado de uso y/o producción. Las proteínas de la invención pueden modificarse de forma post-traslacional, por ejemplo mediante glicosilación. Los polipéptidos o proteínas de la invención pueden proporcionarse en forma activa aislada (o purificada), o como precursores, derivados y/o sales de estos.

Como se indica anteriormente, el término “activo” o “biológicamente activo” significa que dichos polipéptidos tienen la capacidad de unirse a un ligando del CSF3R y funcionar como un agonista o antagonista del CSF3R. Un polipéptido “biológicamente activo” de la presente invención es asimismo uno que muestra actividad en al menos uno de los ensayos mencionados anteriormente.

- 5 Los “precursores” son compuestos que pueden convertirse en los polipéptidos de la presente invención mediante procesamiento metabólico y/o enzimático antes o después de su administración a células o a un organismo.

10 El término “sales” en la presente se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de los polipéptidos de la presente invención. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse a través de medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc y similares, y sales con bases orgánicas como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas, como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos como por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Cualquiera de dichas sales tiene actividad sustancialmente similar a los polipéptidos de la invención.

15 El término “derivados” como se utiliza en la presente se refiere a derivados que pueden prepararse a partir de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de las porciones de aminoácidos o en los grupos terminales amino o carboxilo de conformidad con los métodos conocidos por sí mismos en la técnica. Tales derivados incluyen por ejemplo ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados N-acilo de grupos amino libres o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo como por ejemplo grupos alcanóilo o aroílo.

20 La purificación de los polipéptidos o proteínas de fusión de la invención puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos conocidos por sí mismos en la técnica, como a modo no taxativo, cualquier procedimiento convencional que implique la extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o similar. Un procedimiento de purificación particular es la cromatografía por afinidad, mediante el uso de anticuerpos (monoclonales) o grupos de afinidad que se unen de forma selectiva al polipéptido y que generalmente se inmovilizan en una matriz de gel contenida dentro de una columna. Las preparaciones purificadas de las proteínas de la invención, como se utilizan en la presente, se refieren a preparaciones que contienen menos de un 15% de contaminantes, más preferentemente que comprenden al menos un 90, 95 ó 97% del polipéptido. Una proteína, polipéptido o ácido nucleico aislado denota una proteína, polipéptido o ácido nucleico que no se encuentra en su ambiente natural.

30 Los polipéptidos de la invención son útiles por sí mismos, como componentes de proteínas de fusión como la fusión Fc y/o en combinación con otro agente. Preferentemente, la fusión Fc comprende la SEQ ID NO: 4.

35 Preferentemente el agente se selecciona de interferón-beta, CSF3, GM-CSF, activador plasminógeno del tejido, factor hematopoyético, miembros NgR solubles (por ejemplo Nogo-66), antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) dirigidos al NgR, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) dirigidos a los inhibidores de mielina (por ejemplo, Nogo, MAG o Omgp), factor acero (ligando SF, Kit), ligando Flt3/Flk2 (FL), bloqueadores RhoA, bloqueadores Rho, bloqueadores ROCK, bloqueadores del canal de sodio, proteínas relacionadas al crecimiento como BDNF, VEGF, eritropoyetina (EPO), neurotrofina-3 (NT-3) o GAP-43, moduladores de β -secretasa, CXCL10, agonistas de los receptores de serotonina (por ejemplo, 5-HT_{1A/2A/7}), LIF, bloqueadores EGFR como Erlotinib y/o metilprednisolona. Es particularmente preferido el interferón-beta.

40 Pueden preverse varias combinaciones: 1) la combinación de un polipéptido de la presente invención con inhibidores de activación de células T como el anti-CD3 Ab; 2) la combinación de un polipéptido de la presente invención con otros factores hematopoyéticos, como el Flt3-L, ya sea de forma separada o combinado en una molécula quimérica (progenipoyetina); 3) la clasificación de un subgrupo celular particular inducido por un polipéptido de la presente invención, que puede proporcionar protección contra las respuestas autoinmunes y aloreactivas; y 4) la clasificación de un subgrupo celular particular movilizado por una combinación de factores de crecimiento, que incluyen el G-CSF y un polipéptido de la presente invención, (por ejemplo, los subgrupos particulares de células progenitoras hematopoyéticas inmaduras, movilizadas por una combinación de factores de crecimiento, que incluyen el G-CSF y un polipéptido de la presente invención, pueden tener capacidad para detener el comienzo de la diabetes sintomática).

50 Un objeto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un producto (por ejemplo, un polipéptido, una proteína de fusión, un conjugado, un complejo receptor, un ácido nucleico, una célula o vector) como se define anteriormente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas más preferidas de la presente invención comprenden un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 4 o una proteína de fusión que comprende dicho polipéptido.

55 Se divulga además el uso de un producto (por ejemplo, un polipéptido, una proteína de fusión, un conjugado, una molécula de ácido nucleico, un vector o una célula) como se divulga anteriormente, para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar a un sujeto humano.

El G-CSF se utiliza generalmente para el tratamiento de diferentes tipos de neutropenia en humanos. Es uno de los pocos factores de crecimiento aprobados para el uso clínico. En particular, se utiliza para reducir la citopenia induci-

da por la quimioterapia (Viens et al., *J. de Clin. Oncology*, Vol. 20, No. 1, 2002: 24-36). El G-CSF también se utilizó para uso terapéutico de enfermedades infecciosas como posible agente coadyuvante (Hubel et al., *J. de Infectious Diseases*, Vol. 185: 1490-501, 2002).

5 Son conocidos los agonistas del CSF3 utilizados para terapia. Por ejemplo, Amgen Inc lanzó el pegfilgrastim, una forma pegilada del CSF3 recombinante, para el tratamiento de la neutropenia o leucopenia inducidas por quimioterapia. Bolder Biotechnology desarrolló una proteína de fusión que comprende el CSF3 pegilado unido a IgG-Fc llamada BBT-001 para el tratamiento de la leucopenia. Chugai Pharmaceutical lanzó el lenograstim, un CSF3 humano recombinante para el tratamiento de la leucopenia, enfermedad hematológica, trastorno inmune, neutropenia e infección viral. Dragon Pharmaceuticals desarrolló una formulación del CSF3 para el tratamiento de la leucopenia. Kancer limited desarrolló una formulación oral del CSF3 para el tratamiento de la leucopenia. Kyowa Hakko Kogyo Co Ltd lanzó el nartograstim (CFS3 inyectable) para el tratamiento de la anemia o leucopenia. Neose Technologies desarrolló el CSF3 glicopegilado de larga actuación para el tratamiento de la neutropenia. Transkaryotic Therapies Inc desarrolló el CSF3 activado por genes (GA-G-CSF) para el tratamiento de la neutropenia.

15 En un modelo de ratón de infarto de miocardio, el tratamiento con CSF3 no afectó la magnitud del infarto inicial en el día 3 pero mejoró la función cardíaca 1 semana después del infarto y los efectos beneficiosos fueron menores dado el retraso en el comienzo del tratamiento (Harada et al. *Nature Med.* Vol. 11: 305-311, 2005). El CSF3 indujo las proteínas antiapoptóticas e inhibió la muerte apoptótica de los cardiomiocitos. Asimismo, el CSF3 redujo la apoptosis de las células endoteliales y aumentó la vascularización en los corazones afectados por infarto. Harada et al. sugirió que el CSF3 promueve la supervivencia de los miocitos cardíacos y previene la remodelación del ventrículo izquierdo después del infarto de miocardio mediante la comunicación funcional entre los cardiomiocitos y los no cardiomiocitos.

20 La aplicación de una dosis unitaria del G-CSF en pacientes que padecen de neumonía adquirida en la comunidad (CAP) causada por la supervivencia prolongada y el aumento en la activación de la neutrófilos combinado con una liberación sostenida de citocinas antiinflamatorias (Droemann et al. *Respiration*. 2005 Dec. 12. Epub previa a la publicación).

25 El CSF3 también es beneficioso en animales para la prevención y/o tratamiento de enfermedades inmunológicas, por ejemplo, enfermedad injerto contra huésped, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes (Rutella et al. *J. Immunol.* 2005 Dec. 1; 175(11):7085-91).

30 En la enfermedad injerto contra huésped, la alorespuesta in vitro de las células donantes 5 días después de la administración del G-CSF puede predecir la ocurrencia de la GVHD aguda en pacientes con trasplante y las células T de donantes con una importante supresión inducida por G-CSF de la aloreactividad in vitro inducen menos frecuentemente la GVHD en los receptores. La producción de TGF- β después del trasplante allogenico de HSC puede proporcionar una explicación adicional para los efectos opositores de la administración del G-CSF a donantes de la GVHD aguda contra crónica. A este respecto, la administración del G-CSF a ratones donantes puede inducir a la protección dependiente de TGF- β - e IL-10 contra la GVHD aguda pero contribuir a la exacerbación dependiente de TGF- β de la GVHD crónica. La neutralización de TGF- β en ratones trasplantados protege de la GVHD crónica en el tracto gastrointestinal y la piel pero no de las anomalías del hígado.

35 En la enfermedad inflamatoria intestinal, el G-CSF se ha utilizado de forma exitosa en la colitis experimental en conejos blancos de Nueva Zelanda. Los animales se trataron previamente 24 horas antes o durante la inducción de la colitis con 50 ó 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rG-CSF. La administración de citocina en cualquier dosis se tradujo en el aumento de los niveles de mieloperoxidasa tisular, a pesar de un infiltrado celular polimorfinuclear de la mucosa histológicamente similar en el grupo tratado con G-CSF en comparación con el grupo de control de colitis. Asimismo, los niveles de fluido de diálisis de leucotrieno B4 y tromboxano B2 fueron significativamente más bajos en los animales tratados. Se obtuvieron resultados similares en la colitis por ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico en ratas, un modelo de enfermedad Th1. El G-CSF a 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ atenuó extraordinariamente tanto la pérdida de peso corporal como el engrosamiento de la pared colónica debido a la inflamación transmural progresiva. Este efecto se asoció con una inhibición significativa de la transcripción de IFN-7 e IL-12p35. Los datos preclínicos se trasladaron asimismo al tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal humana. Se probó que el G-CSF es eficaz en la recurrencia postoperatoria endoscópica aguda de la enfermedad de Crohn. Cinco pacientes se trataron con 300 μg de G-CSF recombinante humano tres veces por semana durante 12 semanas. El G-CSF resultó ser seguro y fue bien tolerado y se mostró un aumento significativo en los conteos de neutrófilos, IL-1ra y TNFR p55 y p75 soluble en el plasma de los pacientes tratados con G-CSF. En un estudio de etiqueta abierta, el G-CSF demostró seguridad y eficacia para el tratamiento de la enfermedad de Crohn activa. Los pacientes recibieron 300 μg de G-CSF durante 12 semanas consecutivas, tras lo cual se alcanzó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la enfermedad. Estos estudios sugieren que el rG-CSF puede ser un enfoque terapéutico prometedor para la enfermedad de Crohn.

40 En la enfermedad inflamatoria intestinal, el G-CSF se ha utilizado de forma exitosa en la colitis experimental en conejos blancos de Nueva Zelanda. Los animales se trataron previamente 24 horas antes o durante la inducción de la colitis con 50 ó 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rG-CSF. La administración de citocina en cualquier dosis se tradujo en el aumento de los niveles de mieloperoxidasa tisular, a pesar de un infiltrado celular polimorfinuclear de la mucosa histológicamente similar en el grupo tratado con G-CSF en comparación con el grupo de control de colitis. Asimismo, los niveles de fluido de diálisis de leucotrieno B4 y tromboxano B2 fueron significativamente más bajos en los animales tratados. Se obtuvieron resultados similares en la colitis por ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico en ratas, un modelo de enfermedad Th1. El G-CSF a 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ atenuó extraordinariamente tanto la pérdida de peso corporal como el engrosamiento de la pared colónica debido a la inflamación transmural progresiva. Este efecto se asoció con una inhibición significativa de la transcripción de IFN-7 e IL-12p35. Los datos preclínicos se trasladaron asimismo al tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal humana. Se probó que el G-CSF es eficaz en la recurrencia postoperatoria endoscópica aguda de la enfermedad de Crohn. Cinco pacientes se trataron con 300 μg de G-CSF recombinante humano tres veces por semana durante 12 semanas. El G-CSF resultó ser seguro y fue bien tolerado y se mostró un aumento significativo en los conteos de neutrófilos, IL-1ra y TNFR p55 y p75 soluble en el plasma de los pacientes tratados con G-CSF. En un estudio de etiqueta abierta, el G-CSF demostró seguridad y eficacia para el tratamiento de la enfermedad de Crohn activa. Los pacientes recibieron 300 μg de G-CSF durante 12 semanas consecutivas, tras lo cual se alcanzó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la enfermedad. Estos estudios sugieren que el rG-CSF puede ser un enfoque terapéutico prometedor para la enfermedad de Crohn.

45 Las propiedades antiinflamatorias del G-CSF y su capacidad para cambiar los perfiles de citocina de las células T hacia Th2 y para promover la diferenciación de DC y células Treg tolerogénicas influyeron en su evaluación terapéutica en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (SLE) y la artritis reumatoide (RA). Se previno la nefritis, etapa final de la enfermedad de lupus caracterizada por la inflamación, en ratones a los cuales se les administró un régimen de dosis alta de G-CSF (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), incluso cuando el tratamiento se inició en animales que ya padecían de proteinuria. Se observó un desacoplamiento entre la deposición del com-

plejo inmune y daño del riñón, lo que correspondió a una expresión profundamente reducida del FcγRIII (CD16) dentro de los glomérulos, receptores que median la respuesta inflamatoria de las células mesangiales del riñón a Igs. De conformidad, se limitó la respuesta inflamatoria al suero IL-12 y se retrasó la mortalidad de forma significativa. En la artritis inflamatoria, la neutralización del G-CSF endógeno redujo de forma marcada la progresión de la enfermedad en la misma medida que el tratamiento anti-TNF. La terapia celular con células progenitoras hematopoyéticas movilizadas por G-CSF, desprovista de otros subgrupos celulares proinflamatorios inducidos por G-CSF puede ser terapéuticamente prometedora en pacientes con enfermedades autoinmunes.

Los efectos beneficiosos del G-CSF en modelos animales de esclerosis múltiple (MS) dependientes de las células T y diabetes autoinmune tipo 1 (T1D) probaron tener posible interés para la traslación en estrategias terapéuticas. El tratamiento corto de 7 días con G-CSF (200 µg/kg), iniciado al comienzo de los signos clínicos, confirió una protección duradera a los ratones SJL:J contra la encefalomiелitis autoinmune experimental inducida por la proteína básica de la mielina. Los ratones protegidos mostraron una desmielinización limitada y un reclutamiento reducido de células T en el sistema nervioso central (CNS) así como una inflamación autoinmune muy discreta y niveles de ARNm de citocina y quimiocina apenas detectables en el CNS. Estos efectos se basaron en los eventos inmunorreguladores que tuvieron lugar en la periferia e incluyeron un desequilibrio en la tasa de producción de quimiocina (MIP-1α/MCP-1, por ejemplo, CCL3/CCL2) mediante macrófagos y linfocitos autoreactivos que se correlacionaron con una desviación inmune de la respuesta autoreactiva a Th2. Asimismo se observó una reducción dramática de la producción de TNF-α sistémica y linfocítica. El efecto protector del G-CSF se confirmó en ratones C57BL/6 inmunizados con el péptido MOG. La elevada expresión de genes del G-CSF ocurrió de forma selectiva en lesiones cerebrales de pacientes en la fase aguda de MS, lo que sugirió un papel protector endógeno del factor de crecimiento.

La presente solicitud divulga que un polipéptido de la presente invención, solo y/o en combinación con uno o más factores adicionales puede utilizarse para tratar la esclerosis múltiple (MS) y/o proporcionar terapia neuroprotectora profiláctica en pacientes que padecen de esclerosis múltiple. Esto se basa en la presencia del receptor del GCSF sobre los oligodendrocitos, lo que respalda la eficacia directa del GCSF en las células blanco primarias de la MS. Asimismo, el receptor del GCSF se encuentra presente en células nerviosas y sus procesos, que se encuentran comprometidos en etapas posteriores de la enfermedad y puede tener correlación con discapacidades duraderas (Cid. et al. (2002), *J Neurol Sci*, 193, 103-9). Incluso las áreas del cerebro que parecen normales con respecto a cambios en la sustancia blanca muestran signos de degeneración. Por tanto, la patología axonal y la neurodegeneración son objetivos terapéuticos importantes en la Esclerosis Múltiple. El GCSF con su actividad anti-apoptótica en las neuronas y su potencial pro-regenerador (mediante la mejora de la neurogénesis y plasticidad) respalda el hecho de que las composiciones descritas en la presente pueden utilizarse como nuevas terapias para tratar la esclerosis múltiple.

Asimismo, los mecanismos patofisiológicos en la esclerosis múltiple coinciden con mecanismos importantes en la isquemia celular, por ejemplo, la participación del óxido nítrico (Smith, et al. (2001), *Ann Neurol*, 49, 470-6) y la participación de la excitotoxicidad del glutamato (Pitt et al. (2000), *Nat Med*, 6, 67-70). A la luz de esta información, el polipéptido divulgado en la presente representa una nueva opción de tratamiento para la esclerosis múltiple que al no encontrarse restringida por ningún mecanismo o consideraciones teóricas en particular protege las neuronas directamente en oposición a los tratamientos comunes que reducen la inflamación.

Los resultados que demuestran la capacidad del G-CSF de contrarrestar la degeneración neuronal aguda y de conducir la neurogénesis en la isquemia aguda indican que el G-CSF es un fármaco prometedor para la apoplejía, mejoras en el comportamiento y enfermedades degenerativas y autoinmunes del sistema nervioso (Schneider et al. *J Clin Invest*. 2005 August; 115(8):2083-98; Schneider et al. *Cell Cycle*. 2005 December; 4(12):1753-7.US2005/0142102). El CSF3R presenta un patrón de expresión predominantemente neuronal asombrosamente amplio en el CNS. El G-CSF mostró ser neuroprotector en 2 modelos diferentes de isquemia cerebral focal con activación transitoria de STAT3 y ERK1/2 y una fuerte activación duradera de ERK5 vinculada a la promoción de la supervivencia neuronal así como de la activación de la vía PI3K/Akt vinculada a la actividad apoptótica del G-CSF. El efecto más sorprendente del G-CSF administrado periferalmente en el cerebro se observó en la circunvolución dentada, donde el G-CSF aumentó el número de neuronas generadas recientemente en condiciones isquémicas pero también en animales del grupo quirúrgico de referencia no isquémicos. Es por tanto fascinante especular que el G-CSF puede mejorar la reparación y función estructural incluso en individuos saludables o en largos intervalos después de la apoplejía. La amplia serie de datos de diferentes laboratorios subraya el efecto pro-regenerativo y neuroprotector muy estable del G-CSF en varios modelos de accidentes cerebrovasculares. El G-CSF puede ser adecuado además como tratamiento de apoyo en la fases de rehabilitación después del accidente cerebrovascular. Se sugiere además un papel predominante del G-CSF en la supervivencia y diferenciación de células progenitoras en el cerebro postisquémico. El modelo de fototrombosis cortical utilizado por Schneider et al. ejerce el impacto más prominente sobre el comportamiento sensorimotor, que también se midió en la batería de pruebas realizadas, mientras que la formación hipocámpica se encuentra más frecuentemente ligada a los procesos de aprendizaje y de memoria. No obstante, existe además una riqueza de datos que respaldan un posible papel del hipocampo en la recuperación funcional de déficits motores. Se sugirió que el aumento de la neurogénesis hipocámpica inducido por el G-CSF afecta directamente a la recuperación de déficits sensorimotrices inducidos por lesiones corticales. Por tanto, el señalamiento con G-CSF parece ser un nuevo sistema protector en el cerebro que participa en la contraprestación de la neurodegeneración aguda y la regulación de la formación de nuevas neuronas.

La neurogénesis es un mecanismo que puede conducir al aumento en la plasticidad de las redes neuronales y puede reemplazar la pérdida gradual de neuronas. Por tanto, la mejora, el incremento o el aumento en la habilidad cognitiva de un individuo que padece, muestra y/o se cree que presenta algún nivel de pérdida cognitiva se describe mediante la administración de una o más composiciones como se describe en la presente para el individuo de conformidad con la discusión de administración en la presente. La mejora cognitiva puede además beneficiar a aquellos individuos aún útiles con afecciones no patológicas, por ejemplo, individuos que no presentan deterioro cognitivo.

La determinación de la habilidad cognitiva y por tanto su mejora es conocida por los expertos en la técnica. En caso de medir aumentos o mejoras en la habilidad cognitiva, estos se comparan antes de la administración de las composiciones de la invención y después de la administración (y pueden medirse además durante la administración en algunas realizaciones) mediante el uso de la misma prueba, por ejemplo, con los mismos criterios, parámetros, etc.

Asimismo, el uso de las composiciones divulgadas en la presente para la mejora de la cognición no se limita al deterioro no patológico de la capacidad mental, sino que puede aplicarse además para estimular el repertorio fisiológico normal de las capacidades mentales, por ejemplo, la mejora de la memoria, la mejora de la coordinación motora fija y/o la mejora de las capacidades lógicas.

El G-CSF proporcionó además protección contra la diabetes autoinmune experimental en ratones NOD. El G-CSF (200 µg/kg) revirtió los efectos aceleradores de la ciclofosfamida, previno la pérdida de células Treg CD4 + CD25 + y anuló la citocina robusta, particularmente la IFN-γ y la explosión de quimiocina se disparó en las células inmunes mediante la ciclofosfamida. En el modelo de diabetes espontánea, el tratamiento de ratones NOD en la semana 4 de edad durante 5 días consecutivos que se repitió cada 4 semanas a partir de entonces hasta la semana 16 de edad, se previno el comienzo de la enfermedad y la insulinitis destructiva de forma duradera. Esta protección se correspondió con el reclutamiento marcado de dos grandes subgrupos reguladores, es decir, células dendríticas plasmocitoides y células Treg CD4 + CD25 +. Asimismo, los receptores del G-CSF mostraron una acumulación, particularmente en los ganglios linfáticos peripancreáticos de células Treg CD4 + CD25 +, que produjeron niveles altos de TGF-β1 y se mantuvieron funcionales, lo que contuvo de forma activa la transferencia de diabetes en receptores NOD-SCID secundarios. Las células dendríticas clasificadas de ratones a los que se les administró un tratamiento con G-CSF de 5 días de duración, con relación a las células dendríticas de donantes tratados con excipientes, pudieron, tras la transferencia adoptiva a receptores NOD secundarios, disparar una acumulación notablemente mejorada de células Treg CD4 + CD25 + que expresó niveles significativamente más altos de TGF-β1 de la membrana. Los factores endógenos de respuesta a infecciones como el G-CSF pueden encontrarse implicados en la protección contra el comienzo de la T1D provocado por eventos infecciosos, particularmente si se llevan a cabo en fases tempranas del desarrollo de la diabetes.

De forma similar, puede demostrarse la actividad de un polipéptido de la presente invención en las enfermedades mencionadas anteriormente.

Las células Treg CD4 + CD25 + movilizadas por el G-CSF pueden representar una fuente prometedora de células Treg para la aplicación clínica ya que pueden expandirse hasta 40.000 veces con la APC artificial y una dosis alta de IL-2. De forma similar, un polipéptido de la presente invención puede movilizar las células Treg CD4 + CD25+.

Por tanto, el CSF3 se ha vinculado con las siguientes enfermedades: la enfermedad injerto contra huésped, cáncer, neutropenia, trastornos o afecciones neurológicas, neumonía, enfermedades autoinmunes, enfermedades hematológicas, trastornos hematopoyéticos, enfermedades infecciosas, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes.

Las afecciones neurológicas generalmente pueden clasificarse en tres clases: las enfermedades con mecanismos isquémicos o hipóxicos denominadas en la presente como enfermedades relacionadas con la isquemia; enfermedades neurodegenerativas (ver Adams et al, Principles of Neurology, 1997, 6 th Ed., New York, pp 1048 ff); y las enfermedades neurológicas y psiquiátricas asociadas con la muerte de células neuronales. Otras afecciones neurológicas incluyen además la mejora de la habilidad cognitiva y el tratamiento de tumores cerebrales, como glioblastomas, astrocitomas, meningiomas y neurinomas. Los ejemplos de enfermedades neurológicas y psiquiátricas asociadas con la muerte de células neuronales incluyen el shock séptico, hemorragia intracerebral, hemorragia subaracnoidal, demencia por infarto múltiple, enfermedades inflamatorias (como la vasculitis, la esclerosis múltiple y el síndrome de Guillain-Barre), neurotraumatismo (como el traumatismo de la médula espinal y traumatismo cerebral), neuropatías periféricas, polineuropatías, epilepsias, esquizofrenia, depresión, encefalopatías metabólicas e infecciones de sistema nervioso central (virales, bacterianas, fúngicas).

Las enfermedades con mecanismos isquémicos o hipóxicos, denominadas en la presente como enfermedades relacionadas con la isquemia, pueden subclasificarse además en enfermedades generales e isquemia cerebral. Los ejemplos de tales enfermedades generales que implican mecanismos isquémicos o hipóxicos incluyen el infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, pericarditis, perimicarditis, enfermedad cardíaca coronaria (estenosis de las arterias coronarias), angina de pecho, enfermedad cardíaca congénita, shock, isquemia de las extremidades, lesión isquémica, estenosis de las arterias renales, retinopatía diabética, trombosis asociada con la malaria, válvulas cardíacas artificiales, anemias, síndrome hiperesplénico, enfisema, fibrosis pulmonar y edema pulmonar. Los ejemplos de enfermedad isquémica cerebral incluyen accidentes cerebrovasculares (como accidentes cerebrovasculares hemorrágicos), microangiopatía cerebral (microangiopatía), isquemia cere-

bral durante el parto, isquemia durante/después del paro o resucitación cardíaca, isquemia cerebral debido a problemas intraoperatorios, isquemia cerebral durante la cirugía de carótidas, isquemia cerebral crónica debido a estenosis de las arterias que proporcionan sangre al cerebro, trombosis de un seno venoso o trombosis de las venas cerebrales, malformaciones de los vasos cerebrales y retinopatía diabética.

5 Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Wilson, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad por cuerpos de Lewy, enfermedad de Hallervorden-Spatz, distonía por torsión, neuropatías sensorimotoras hereditarias (HMSN), enfermedad de Gerstmann-Strussler-Schanker, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Machado-Joseph, ataxia de Friedreich, ataxias no de Friedreich, síndrome de Gilles de la Tourette, temblores familiares, degeneraciones olivopontocerebelosas, síndromes cerebrales paraneoplásicos, paraplegias espasmódicas hereditarias, neuropatía óptica hereditaria (Leber), retinitis pigmentosa, enfermedad de Stargardt y síndrome de Keams-Sayre. Más preferentemente, la enfermedad neurodegenerativa es la esclerosis múltiple.

15 Preferentemente, la enfermedad injerto contra huésped es la GVHD aguda o GVHD crónica. Más preferentemente, la enfermedad injerto contra huésped es la GVHD aguda. El agonista del CSF3 es útil para la GVHD aguda y el antagonista del CSF3 es útil para la GVHD crónica.

Preferentemente, la enfermedad inflamatoria intestinal es la colitis o la enfermedad de Crohn (por ejemplo, la recurrencia postoperatoria endoscópica aguda de la enfermedad de Crohn o la enfermedad de Crohn activa).

20 Preferentemente, la enfermedad autoinmune es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso, lupus eritematoso sistémico (SLE), osteoartritis o artritis reumatoide (RA).

Preferentemente, la diabetes es una diabetes autoinmune de tipo 1 (T1D).

Preferentemente, la neumonía es una neumonía adquirida en la comunidad (CAP).

Preferentemente, la neutropenia es una neutropenia congénita severa, citopenia inducida por quimioterapia (CT), leucopenia.

25 Preferentemente, el cáncer es un trastorno maligno de estirpe mielóide como la leucemia mielóide aguda (AML), leucemia, leucemogénesis, síndromes mielodisplásicos, leucemia mielóide, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia aguda, leucemia mielóide crónica (CML), tumores sólidos, carcinoma epitelial de ovario, neoplasmas, cáncer de vejiga, carcinoma, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, melanoma o cáncer colorectal.

Preferentemente, la enfermedad hematológica es el infarto de miocardio.

30 Por consiguiente, se divulga además un método para tratar una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente en un mamífero mediante la administración al mamífero de un polipéptido de la presente invención, sus derivados, sus miméticos, sus proteínas de fusión y sus combinaciones o células que secretan estos factores para tratar la afección.

35 Los productos anteriores y la composición farmacéutica son particularmente apropiados, por ejemplo, para tratar la enfermedad injerto contra huésped, cáncer, neutropenia, trastornos o afecciones neurológicas, neumonía, enfermedades autoinmunes, enfermedades hematológicas, trastornos hematopoyéticos, enfermedades infecciosas, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes.

40 Se describe además un método para tratar una afección neurológica en un mamífero mediante la preparación de una composición de células madre neuronales con un polipéptido de la presente invención, sus derivados, sus miméticos y sus combinaciones y a continuación administrar las células madre neuronales a un mamífero para el tratamiento de la afección.

Se divulga además un método para tratar una afección neurológica en un mamífero mediante la administración al mamífero de un polipéptido de la presente invención para tratar una afección neurológica.

45 Se divulga además un método para mejorar la supervivencia de una célula transplantada a un mamífero mediante la introducción en una célula de uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido de la presente invención, sus derivados, sus miméticos y/o sus combinaciones antes de transplantar la célula a un mamífero, por lo cual la célula expresa un polipéptido de la presente invención en una cantidad suficiente para mejorar la supervivencia celular respecto a la supervivencia celular previo a la introducción de los polinucleótidos.

50 Se describe además un método para mejorar la viabilidad de un cultivo de células neuronales mediante el proporcionamiento de un polipéptido de la presente invención, sus derivados, sus miméticos, sus proteínas de fusión y/o sus combinaciones para mejorar la viabilidad del cultivo de células neuronales con relación al cultivo previo a proporcionar el factor hematopoyético. En dicho método, el polipéptido de la presente invención puede utilizarse para contac-

tar las células del cultivo o puede proporcionarse mediante el uso de polinucleótidos que codifican y expresan el polipéptido de la presente invención.

5 La presente solicitud describe además un método para tratar una afección neurológica como el trastorno causado por repetición de trinucleótidos, la neuropatía periférica, la enfermedad de almacenamiento lisosomal, el parkinsonismo o el glaucoma con un polinucleótido de la presente invención o su proteína de fusión.

En la presente se divulga un método para mejorar la interacción entre el CSF3R y su ligando en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un producto como se define anteriormente.

Se divulga además un método para reducir la interacción entre el CSF3R y su ligando en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un producto como se define anteriormente.

10 El término tratamiento incluye tratamientos preventivos o curativos en un sujeto, particularmente un sujeto humano. El tratamiento incluye cualquier mejora de una manifestación clínica de una enfermedad, lo que retrasa el comienzo de la enfermedad, particularmente el comienzo de una enfermedad aguda, reduce su gravedad y reduce la evolución de la enfermedad o suprime sus causas.

15 Las dosis eficaces pueden ajustarse por el experto en la técnica, en función del paciente, enfermedad y producto. Generalmente, las dosis eficaces comprenden entre aproximadamente 5 µg/kg y 50 mg/kg, particularmente entre 100 µg/kg y 10 mg/kg.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden contener uno o más productos de la presente invención, ya sea únicamente como ingredientes activos o para su uso en combinación con otros ingredientes activos y cualquier diluyente, vehículo, vehículo biológicamente compatible y aditivo adecuado farmacéuticamente aceptable, que son adecuados para la administración a un animal (por ejemplo, solución salina fisiológica) y comprenden de forma opcional auxiliares (como excipientes, estabilizadores o adyuvantes) que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse para ser utilizadas farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en cualquier forma aceptable para cumplir con las necesidades del modo de administración. Por ejemplo, en la bibliografía se divulga el uso de biomateriales y otros polímeros para la administración de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo de administración específico (Luo B and Prestwich G D, 2001; Cleland J L et al., 2001).

25 La expresión "farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el huésped al cual se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, los ingredientes activos anteriores pueden formularse en forma de dosis unitaria para la inyección en vehículos como la solución salina, la solución de dextrosa, la albúmina de suero y la solución de Ringer. Los vehículos pueden seleccionarse de almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y los diferentes aceites, que incluyen aquellos de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo).

30 Cualquier modo de administración aceptado puede utilizarse y determinarse por Los entendidos en la técnica para establecer los niveles en sangre deseados de los ingredientes activos. Por ejemplo, la administración puede ser mediante vías parenterales como vías subcutáneas, intravenosas, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intranasales, transdérmicas, rectales, orales o bucales. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse además en formas de dosificación de liberación controlada o sostenida, que incluyen la inyección con liberación gradual de la medicación, bombas osmóticas y similares, para la administración prolongada del polipéptido a una velocidad predeterminada, preferentemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración unitaria de dosis precisas.

35 La administración parenteral puede ser mediante inyección de bolo o mediante perfusión gradual con el paso del tiempo. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica y pueden prepararse de conformidad con métodos de rutina. Asimismo, pueden administrarse las suspensiones de los compuestos activos como las suspensiones oleosas adecuadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones de inyecciones acuosas que pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa de sodio, sorbitol y/o dextrán. De forma opcional, la suspensión puede contener además estabilizadores. Las composiciones farmacéuticas incluyen soluciones adecuadas para la administración mediante inyección y contienen de aproximadamente un 0,01 a un 99,99 por ciento, preferentemente de aproximadamente un 20 a un 75 por ciento del compuesto activo junto con el excipiente.

45 Se entiende que la dosis administrada dependerá de la edad, sexo, estado de salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La dosis será adaptada al sujeto particular, como lo entienda y determine el experto en la técnica. La dosis total requerida para

5 cada tratamiento puede administrarse mediante dosis múltiples o en una dosis unitaria. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse sola o junto con otros productos terapéuticos dirigidos a la afección o dirigidos a otros síntomas de la afección. Habitualmente una dosis diaria del ingrediente activo comprende entre 0,01 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. Generalmente la administración de 1 a 40 miligramos por kilogramo por día en dosis divididas o en forma de liberación sostenida es eficaz para obtener los resultados deseados. Las segundas o siguientes administraciones pueden realizarse en una dosis que es igual, menor o mayor que la dosis inicial o anterior administrada al individuo.

10 La presente solicitud describe además composiciones y métodos para detectar o dosificar un polipéptido o ácido nucleico de la presente invención en una muestra. Tales composiciones incluyen, por ejemplo, cualquier ligando específico de un polipéptido de la presente invención, como un anticuerpo o su fragmento o derivado o cualquier sonda o cebador de ácido nucleico específico.

15 Se divulga además un anticuerpo o su fragmento o derivado que se une de forma selectiva a una variante de polipéptido del CSF3R como se divulga anteriormente. El anticuerpo, su fragmento o derivado, se une de forma selectiva a un epítipo de los polipéptidos de la presente invención. Se descubrió que los residuos His 4, Fe 74, Gln 86, Leu 88 y Gln 90 de la SEQ ID NO: 4 son importantes para la función receptora, siendo el Gln 87 el más importante (Layton et al.). Por tanto, los epítipos preferidos consisten en epítipos que comprenden estos residuos, en particular el Gln 87, Fe 74, Gln 86 y Gln 90 de la SEQ ID NO: 4. Estos residuos se encuentran en las hebras β de F y G del CSF3R fijado. En Layton et al. se divulga además un mAb LMM711, que también fue encontrado en las hebras de F y G del dominio tipo Ig, superpuesto al sitio de unión del CSF3, de acuerdo con el fuerte efecto neutralizador de este mAb. Por tanto, un epítipo preferido es aquel que comprende el Fe 74, Gln 86 y Gln 90 de la SEQ ID NO: 4. Se divulga además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, su fragmento o derivado como se define anteriormente.

25 Los fragmentos preferidos del dominio tipo Ig comprenden o consisten en los residuos His 4, Fe 74, Gln 86, Leu 88 y Gln 90 de la SEQ ID NO: 4. Los fragmentos más preferidos del dominio tipo Ig comprenden o consisten en los residuos Fe 74, Gln 86 y Gln 90 de la SEQ ID NO: 4. De forma alternativa, los fragmentos preferidos del dominio tipo Ig comprenden o consisten en las hebras de F y G del dominio tipo Ig.

30 Dentro del contexto de la presente invención, el término unión "selectiva" indica que los anticuerpos se unen preferentemente al polipéptido o epítipo blanco, es decir, con una afinidad mayor que cualquier enlace a cualquier otro antígeno o epítipo. Dicho de otra forma, la unión al polipéptido blanco puede discriminarse a partir del enlace no específico a otros antígenos.

Los anticuerpos pueden acoplarse a porciones heterólogas, como toxinas, etiquetas, fármacos u otros agentes terapéuticos, de forma covalente o no, ya sea directamente o a través del uso de agentes de acoplamiento o enlazadores.

35 Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para detectar, dosificar, purificar o neutralizar la variante de polipéptido del CSF3R de la presente invención. En la presente se divulga un método para detectar o dosificar una variante de polipéptido del CSF3R como se define anteriormente en una muestra, que comprende poner dicha muestra en contacto con un anticuerpo, su fragmento o derivado como se divulga anteriormente y determinar la formación o dosificar la cantidad (relativa) de un complejo inmune. La muestra puede ser por ejemplo cualquier fluido biológico como la sangre, plasma, suero, etc., opcionalmente diluida y/o tratada. El anticuerpo, su fragmento o derivado puede encontrarse en suspensión o inmovilizarse sobre un soporte. La presencia o cantidad de complejos inmunes puede determinarse por cualquier técnica conocida por sí misma en la técnica, por ejemplo, mediante ELISA, RIA, etc., por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos reporteros, anticuerpos rotulados, etc.

45 Los métodos para producir anticuerpos, sus fragmentos o derivados son muy conocidos en la técnica e incluyen la inmunización de un animal y la recolección de suero (policlonal) o células del bazo (para producir hibridomas mediante fusión con líneas celulares adecuadas). Los métodos para producir anticuerpos policlonales de varias especies, que incluyen roedores, primates y caballos, se describieron, por ejemplo, en Vaitukaitis et al. (J Clin Endocrinol Metab. 33 (1971) p. 988). En resumen, el antígeno se combina con un adyuvante (por ejemplo, el adyuvante de Freund) y se administra a un animal, generalmente mediante inyección subcutánea. Pueden aplicarse inyecciones repetidas. Se recolectan las muestras de sangre y se separan las inmunoglobulinas o el suero. Los anticuerpos monoclonales de los polipéptidos del CSF3R de la invención pueden asimismo producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante el uso de tecnología de hibridoma es muy conocida (ver, por ejemplo, Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., 77- 96 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988; Kohler et al Nature 256 (1975) 495). En resumen, estos métodos comprenden la inmunización de un animal con el antígeno y a continuación la recuperación de las células del bazo y la fusión de estas células con células inmortalizadas, como las células de mieloma para producir hibridomas. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales deseados pueden seleccionarse mediante diluciones límite. Los anticuerpos pueden producirse además mediante la selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se divulga por ejemplo en Ward et al (Nature 341 (1989) 544).

- Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra los polipéptidos del primer aspecto de la invención pueden analizarse para identificar varias propiedades, es decir, identificar isotipos, epítomos, afinidad, etc. Los anticuerpos monoclonales son particularmente útiles para la purificación de los polipéptidos individuales contra los cuales se encuentran dirigidos. De forma alternativa, los genes que codifican los anticuerpos monoclonales de interés pueden aislarse de los hibridomas, por ejemplo mediante técnicas de PCR conocidas en la técnica y pueden clonarse y expresarse en vectores adecuados.
- Pueden utilizarse además los anticuerpos quiméricos en los cuales las regiones variables no humanas se encuentran unidas o fusionadas con regiones constantes humanas (ver, por ejemplo, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3439 (1987)).
- El anticuerpo puede modificarse para hacerse menos inmunogénico en un individuo, por ejemplo mediante humanización (ver Jones et al., Nature, 321, 522 (1986); Verhoeyen et al., Science, 239, 1534 (1988); Kabat et al., J. Immunol., 147, 1709 (1991); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10029 (1989); Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 34181 (1991); and Hodgson et al., Bio/Technology, 9, 421 (1991)). El término "anticuerpo humanizado", como se utiliza en la presente, se refiere a moléculas de anticuerpo en las cuales los aminoácidos CDR y otros aminoácidos seleccionados en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o livianas de un anticuerpo de un donante no humano se sustituyeron en lugar de los aminoácidos equivalentes en un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado por lo tanto se parece mucho a un anticuerpo humano pero tiene la habilidad de enlace del anticuerpo del donante.
- El anticuerpo puede ser un anticuerpo "biespecífico", es decir, un anticuerpo que tiene dos dominios diferentes de unión al antígeno, cada dominio dirigido a un epítipo diferente.
- La tecnología de expresión en fagos puede utilizarse para seleccionar genes que codifican anticuerpos con actividades de unión a los polipéptidos de la invención ya sea de repertorios de genes V amplificados por PCR de linfocitos de humanos seleccionados por poseer los anticuerpos pertinentes, o de bibliotecas simples (McCafferty, J. et al., (1990), Nature 348, 552-554; Marks, J. et al., (1992) Biotechnology 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos puede además mejorarse mediante transposicionamiento de cadena (Clackson, T. et al., (1991) Nature 352, 624-628).
- Los anticuerpos generados mediante las técnicas que anteceden, ya sea policlonales o monoclonales, tienen una utilidad adicional ya que pueden emplearse como reactivos en inmunoensayos, radioinmunoensayos (RIA) o ensayos inmunoabsorbente ligados a enzimas (ELISA). En estas aplicaciones, los anticuerpos pueden etiquetarse con un reactivo detectable antianalíticamente como un radioisotopo una molécula fluorescente o una enzima.
- Generalmente, los anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido de la presente invención son producidos en animales (por ejemplo, conejos o ratones) mediante inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del polipéptido de sCSF3R y un adyuvante. Puede ser útil conjugar un polipéptido de la presente invención para una proteína transportadora que es inmunogénica en las especies a inmunizarse, como la hemocianina de lapa californiana, el suero, la albúmina, la tiroglobulina bovina o el inhibidor de la tripsina de soja. Asimismo, los agentes agregadores como el alumbre se utilizan para mejorar la respuesta inmune. Después de la inmunización, se extrae sangre de los animales y se analiza el suero para la valoración del anticuerpo anti-sCSF3R.
- Los anticuerpos monoclonales dirigidos a un polipéptido de la presente invención se producen mediante el uso de cualquier método previsto para la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos de hibridoma y el método de hibridoma de células B humanas. Se divulgan además en la presente líneas celulares de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales con polipéptidos del sCSF3R.
- Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden modificarse para su uso como productos terapéuticos. Una realización es un anticuerpo "quimérico" en el cual una porción de la cadena pesada (H) y/o ligera (L) es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico u homólogo a una secuencia correspondiente de anticuerpos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos. Asimismo se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos siempre que demuestren la actividad biológica deseada.
- Se divulga además un anticuerpo monoclonal que es un anticuerpo "humanizado". Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente no humana. La humanización puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de métodos descritos en la técnica, mediante la sustitución de al menos una porción de una región determinante de complementariedad de roedor para las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.
- El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" pretende abarcar los anticuerpos policlonales y monoclonales. El anticuerpo preferido es un anticuerpo monoclonal reactivo con el antígeno. Asimismo el término "anticuerpo" pretende abarcar mezclas de más de un anticuerpo reactivo con un antígeno (por ejemplo, un cóctel de diferentes tipos de

5 anticuerpos monoclonales reactivos con un antígeno). El término “anticuerpo” pretende abarcar además anticuerpos completos, sus fragmentos biológicamente funcionales, anticuerpos de cadena simple y anticuerpos alterados genéticamente como anticuerpos quiméricos que comprenden porciones de más de una especie, anticuerpos bifuncionales, conjugados de anticuerpos, anticuerpos humanizados y no humanizados. Los fragmentos de anticuerpos biológicamente funcionales que también pueden utilizarse son aquellos fragmentos de péptidos derivados de un anticuerpo que son suficientes para unirse al antígeno. El anticuerpo como se utiliza en la presente pretende incluir el anticuerpo completo así como cualquier fragmento de anticuerpo (por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) capaz de unirse al epítipo, antígeno o fragmento antigénico de interés.

10 La expresión “anticuerpo purificado” se refiere a uno que se encuentra lo suficientemente libre de otras proteínas, carbohidratos y lípidos a los cuales se encuentran asociados naturalmente. Dicho anticuerpo “se une preferentemente” a los polipéptidos de sCSF3R de la presente invención (o su fragmento antigénico), es decir, no reconoce y no se une a otras moléculas antigénicas no relacionadas. Un anticuerpo purificado que se divulga en la presente preferentemente inmunoreactivo e inmuno-específico de sCSF3R de especies específicas y más preferentemente inmuno-específicas para el sCSF3R humano nativo.

15 La expresión “se une específicamente” se refiere a un enlace de alta avidéz y/o de alta afinidad de un anticuerpo a un polipéptido específico, es decir el sCSF3R. El enlace del anticuerpo a su epítipo sobre este polipéptido específico es preferentemente más fuerte que el enlace del mismo anticuerpo a cualquier otro epítipo. Los anticuerpos que se unen específicamente al sCSF3R pueden ser capaces de unirse a otros polipéptidos en un nivel débil aun detectable (por ejemplo, un 10% o menos del enlace mostrado al polipéptido de interés). Tal enlace débil o enlace antecedente, puede discernirse fácilmente a partir del anticuerpo específico que se une al compuesto o polipéptido de interés, por ejemplo, mediante el uso de controles adecuados.

20 Preferentemente, la afinidad es de al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, 10³ veces, 10⁴ veces, 10⁵ veces o 10⁶ veces mayor para un polipéptido de la invención que para otros miembros conocidos de la familia del CSF3R.

25 El término “anticuerpos alterados genéticamente” significa anticuerpos donde la secuencia de aminoácidos se cambió con respecto a la del anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante para la presente invención, uno no debe limitarse a las secuencias de aminoácidos encontradas en anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener las características deseadas. Las variaciones posibles son muchas y varían desde el cambio de solamente uno o varios aminoácidos al rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Los cambios en la región constante se realizarán, en general, para mejorar o alterar sus características, como la fijación complementaria, la interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se realizarán para mejorar las características de enlace del antígeno.

30 El término “anticuerpo humanizado” o “inmunoglobulina humanizada” se refiere a una inmunoglobulina que comprende un marco humano, al menos una y preferentemente todas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano y en la cual cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90%, preferentemente al menos un 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias nativas de inmunoglobulina humana. Ver, por ejemplo, Queen et al., las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370.

35 Los “anticuerpos completamente humanizados” son moléculas que contienen tanto la región constante como la región variable de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos completamente humanizados pueden utilizarse de forma potencial para uso terapéutico, donde se requieren los tratamientos repetidos para enfermedades crónicas y reincidentes como las enfermedades autoinmunes. Un método para la preparación de anticuerpos completamente humanos consiste en la “humanización” del sistema inmune humoral del ratón, es decir, la producción de cepas de ratón capaces de producir la Ig humana (Xenomice), mediante la introducción de inmunoglobulina humana (Ig) en el ratón en donde los genes Ig endógenos se activaron. Las regiones de Ig son excesivamente complejas en términos tanto de su estructura física como de la reorganización de genes y los procesos de expresión requeridos para producir en última instancia una respuesta inmune amplia. La diversidad de anticuerpos se genera principalmente mediante reorganización combinatoria entre los diferentes genes V, D y J presentes en las regiones de Ig. Estas regiones contienen además elementos reguladores intercalados que controlan la expresión de anticuerpos, la exclusión alélica, el cambio de clase y la maduración de la afinidad. La introducción de transgenes de Ig humana sin ordenar en ratones ha demostrado que el mecanismo de recombinación de ratones es compatible con los genes humanos. Asimismo, los hibridomas que secretan hu-mAbs específicos de antígenos de varios isotipos pueden obtenerse mediante inmunización Xenomice con antígenos.

40 Los anticuerpos completamente humanizados y los métodos para su producción son muy conocidos en la técnica (Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997); Buggemann et al., Eur. J. Immunol. 21:1323-1326 (1991); Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 97:722-727 (2000) Patente WO 98/24893.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el cual la región constante proviene de un anticuerpo de una especie (generalmente un humano) y la región variable proviene de un anticuerpo de otra especie (generalmente un roedor). Por tanto, los anticuerpos quiméricos son moléculas de las cuales diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, como aquellas en las que su región variable se deriva de un Mab murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en la producción, por ejemplo, donde los Mab murinos presentan un mayor rendimiento en hibridomas pero una mayor inmunogenicidad en humanos, de forma tal que se utilizan los Mabs quiméricos humanos/murinos. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son muy conocidos en la técnica (Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312:643-646 (1984); Cabilly et al., solicitud de patente europea 125023 (publicada el 14 de noviembre de 1984); Neuberger et al., Nature 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., solicitud de patente europea 171496 (publicada el 9 de febrero de 1985); Morrison et al., solicitud de patente europea 173494 (publicada el 5 de marzo de 1986); Neuberger et al., solicitud PCT WO 8601533, (publicada el 13 de marzo de 1986); Kudo et al., solicitud de patente europea 184187 (publicada el 11 de junio de 1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137:1066-1074 (1986); Robinson et al., solicitud de patente internacional No. WO8702671 (publicada el 7 de mayo de 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218 (1987); Better et al., Science 240:1041-1043 (1988); Riechmann et al., Nature 332:323-327. y Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra.

Como se utiliza en la presente, la frase "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula que comprende una porción de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno, un determinante antigénico o un epítipo. Se observará que los fragmentos Fab and F(ab)2 y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden utilizarse para la detección y cuantificación de sus antígenos de conformidad con los métodos divulgados en la presente para moléculas de anticuerpo intactas. Tales fragmentos se producen generalmente mediante escisión proteolítica, mediante el uso de enzimas como la papaína (para producir fragmentos Fab) o la pepsina (para producir fragmentos F(ab)2).

En lo que respecta a los anticuerpos mencionados a lo largo de la presente, el término "anticuerpo monoclonal" pretende incluir los anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanizados, anticuerpos para anticuerpos anti-idiotípicos (anticuerpo anti-anti-Id) que pueden etiquetarse en forma soluble o enlazada, así como sus fragmentos proporcionados mediante cualquier técnica conocida, como a modo no taxativo, la escisión enzimática, la síntesis de péptidos o técnicas recombinantes. Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, con poblaciones que contienen sitios de unión a epítopos sustancialmente similares. Los Mabs pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497 (1975); patente de los Estados Unidos No. 4,376,110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y., (1992-1996). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas las IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquiera de sus subclases. El hibridoma que produce un Mab de la presente invención puede cultivarse in vitro, in situ o in vivo. La producción de valores altos de Mabs in vivo o in situ hace que este sea el método de producción preferido. Asimismo, el término "anticuerpo monoclonal" pretende incluir tanto las moléculas intactas como sus fragmentos, como, por ejemplo, Fab y F(ab)2 que son capaces de unirse al antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab)2 carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto, salen más rápido de circulación y pueden tener unión de tejidos menos específica que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)).

Se dice que un anticuerpo monoclonal es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para de ese modo unir la molécula al anticuerpo.

Un "antígeno" es una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse por un antígeno el cual además es capaz de hacer que un animal produzca anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de dicho antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica a la cual se hace referencia anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará, de forma altamente selectiva, con un epítipo sobre su anticuerpo correspondiente y no con una multitud de otros anticuerpos que puedan ser suscitados por otros antígenos.

Los anticuerpos, incluidos los fragmentos de anticuerpos divulgados en la presente pueden utilizarse para detectar cuantitativamente o cualitativamente sus antígenos en una muestra o para detectar la presencia de células que expresan sus antígenos. Esto puede lograrse mediante técnicas de inmunofluorescencia mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorescencia (ver a continuación) acoplados con microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o detección fluorométrica.

Los anticuerpos (o sus fragmentos) divulgados en la presente pueden utilizarse histológicamente, como en la microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica para la detección in situ de sus antígenos. La detección in situ puede lograrse mediante la extracción de las muestras histológicas de un paciente y el suministro del anticuerpo marcado de la presente invención a dicha muestra. El anticuerpo (o su fragmento) se proporciona preferentemente mediante la aplicación o recubrimiento del anticuerpo etiquetado (o su fragmento) sobre una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no solamente la presencia de los antígenos sino también

su distribución en el tejido examinado. Los entendidos en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de la gran variedad de métodos histológicos (como los procedimientos de tinción) puede modificarse para lograr dicha detección in situ.

5 Tales ensayos para los antígenos generalmente comprenden incubar una muestra biológica, como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recién recolectadas como los linfocitos o leucocitos o células que se incubaron en cultivo tisular, en la presencia de un anticuerpo marcado capaz de identificar los antígenos y de detectar el anticuerpo mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica.

10 La muestra biológica puede acoplarse a un soporte o vehículo de fase sólida como la nitrocelulosa u otro soporte o vehículo sólido que es capaz de inmovilizar las células, las partículas celulares o las proteínas solubles. El soporte o vehículo puede lavarse a continuación con soluciones amortiguadoras adecuadas seguido por el tratamiento con un anticuerpo marcado de conformidad con la presente invención como se nota anteriormente. El soporte o vehículo de fase sólida puede lavarse a continuación con la solución amortiguadora una segunda vez para extraer el anticuerpo no unido. La cantidad de etiqueta enlazada en dicho soporte o vehículo sólido puede detectarse luego a través de medios convencionales.

15 La molécula de anticuerpo puede adaptarse para la utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como un ensayo "de fase doble". En un ensayo inmunométrico típico, una cantidad de anticuerpo sin marcar (o fragmento de anticuerpo) se une a un soporte o vehículo sólido y se agrega una cantidad de anticuerpo soluble marcado de forma etiquetable para permitir la detección y/o cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo de fase sólida, el antígeno y el anticuerpo marcado.

20 Los anticuerpos pueden utilizarse con relación a la tecnología de cromatografía de inmovilización. Más específicamente, los anticuerpos pueden colocarse sobre la superficie de un material dentro de la cromatografía de columna. A continuación, la composición que va a purificarse se puede pasar por la columna. Si la muestra que va a purificarse incluye cualquier polipéptido del sCSF3R que se une a los anticuerpos, los polipéptidos del sCSF3R serán extraídos de la muestra y de ese modo se purificarán.

25 Por tanto, en resumen, los métodos de diagnóstico pueden realizarse in vitro mediante el uso de una muestra celular (por ejemplo, muestra de sangre, biopsia o tejido del ganglio linfático) de un mamífero o pueden realizarse mediante imagenología in vivo.

30 Las composiciones que comprenden anticuerpos divulgados en la presente pueden utilizarse para detectar la presencia del sCSF3R, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo, ELISA, FACS, etc. Una o más porciones marcadas pueden unirse a la inmunoglobulina humanizada. Las porciones marcadas ejemplares incluyen tintes radiopacos, agentes de radiocontraste, moléculas fluorescentes, moléculas marcadas por rotación, enzimas u otras porciones marcadas de valor diagnóstico, particularmente en las técnicas de imagenología de resonancia radiológica o magnética.

35 Una preparación de anticuerpo IgG puede purificarse de forma ventajosa a partir de un anti-suero divulgado en la presente mediante el uso de la purificación por afinidad con proteína G, preferentemente mediante inmunoprecipitación con proteína G. Puede utilizarse un anti-suero derivado de un animal inmunizado para detectar con sensibilidad óptima, mediante análisis de inmunotransferencia (Western blot), inmunoprecipitación y ELISA, los polipéptidos del sCSF3R.

40 En general, para las aplicaciones que se benefician de una reproducibilidad, estandarización o precisión óptimas, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo purificado de la presente invención capaz de unirse específicamente al antígeno blanco generalmente será óptimo con relación a una preparación no purificada.

Los entendidos en la técnica apreciarán que puede obtenerse un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una afinidad caracterizada por una constante de disociación de hasta 10^{-12} para un antígeno cognado mediante el uso de métodos comunes en la técnica.

45 La preparación puede comprender de forma ventajosa un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo unido a cualquiera de los varios tipos de moléculas detectables.

50 Un fragmento de anticuerpo tiene la ventaja de ser más pequeño que el anticuerpo madre del cual se deriva mientras que retiene una especificidad de unión al antígeno blanco o tanto una especificidad de unión y afinidad de unión sustancialmente idéntica a la del anticuerpo madre. Por tanto, como el fragmento de anticuerpo es más pequeño que el anticuerpo madre, generalmente tendrá una biodistribución y propiedades de difusión (por ejemplo, sistémicamente in vivo o en tejidos aislados) superiores a las de este último. Un fragmento de anticuerpo que carece de forma sustancial de una región Fc, como un Fv de cadena simple, un Fab un Fab, un F(ab')₂ y una CDR, es ventajoso para las aplicaciones que implican la exposición de la preparación a una molécula capaz de unirse específicamente a dicha región Fc y cuya unión es indeseable. Generalmente esto puede implicar una unión indeseada de una región Fc expuesta a un receptor Fc cognado o un componente complementario de unión al Fc (por ejemplo, un componente complementario C1q presente en el suero). Los receptores Fc se presentan en la superficie de numerosos tipos de

- 5 células inmunes que incluyen: las APC profesionales, como las células dendríticas, los linfocitos B y los granulocitos como los neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos. Por tanto, la ausencia de una región Fc del fragmento de anticuerpo puede ser particularmente ventajosa para evitar la activación de células inmunes mediada por el receptor Fc o la cascada complementaria mediada por el componente complementario, particularmente al administrar la preparación in vivo a un individuo.
- El F(ab')₂ es un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción de unión al antígeno divalente de una molécula de anticuerpo.
- 10 La preparación del F(ab')₂ puede obtenerse de forma conveniente mediante el uso de métodos estándar en la técnica mediante el tratamiento de una preparación de anticuerpo, como un anti-suero de la presente invención con la enzima pepsina. El producto de F(ab')₂ resultante es una partícula 5S.
- El F(ab')₂ o Fab' es un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción de unión al antígeno monovalente de un anticuerpo.
- 15 La CDR puede generarse por ejemplo como se describe en la EP0585939 o como lo describe Strandberg et al. (Protein Eng. Enero de 2001; 14(1): 67-74). La CDR de conformidad con la invención puede ser una CDR modificada que tiene un efecto mejorado sobre la modulación del polipéptido del sCSF3R. Un ejemplo de métodos de modificación de péptidos activos se describe en Sawa et al. 1999 (J. Med. Chem. 42, 3289-3299).
- 20 La preparación de Fab' puede obtenerse de forma conveniente mediante el uso de métodos estándar en la técnica a través del tratamiento de una preparación de anticuerpo de la presente invención, como un anti-suero de la presente invención, con la enzima pepsina seguido de la reducción del F(ab)₂ resultante. Tal reducción puede realizarse mediante el uso de un agente reductor de tiol y opcionalmente mediante el uso de un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces de disulfuro. Dicho tratamiento genera dos Fab's 3,5S monovalentes y un fragmento Fc.
- 25 La preparación del Fab puede obtenerse de forma conveniente mediante el uso de métodos estándar en la técnica a través del tratamiento de una preparación de anticuerpo, como un anti-suero, con la enzima papaína para producir la cadena ligera intacta y una porción de cadena pesada compuesta de los dominios variables y C H 1.
- En la bibliografía de la técnica se proporcionan una gran variedad de instrucciones para generar un fragmento de anticuerpo mediante tratamiento enzimático de un anticuerpo (por ejemplo, remitirse a: Goldenberg, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,036,945 y 4,331,647; Porter R R., 1959. Biochem J. 73:119-126).
- 30 Un Fv de cadena simple (también denominado en la técnica como "scFv") es una molécula de cadena simple que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada unidas mediante un enlazador polipeptídico adecuado.
- La preparación del F(ab')₂, Fab', Fab o Fv de cadena simple o de la CDR puede obtenerse mediante el uso de técnicas recombinantes.
- 35 La obtención de un fragmento de anticuerpo recombinante se lleva a cabo mediante el aislamiento del ARNm de los linfocitos B de animales inmunizados con el antígeno blanco, lo que genera ADNc a partir del ARNm mediante RT-PCR y mediante el uso de ADNc para construir una biblioteca de expresión de fagos de fragmentos de anticuerpos. Los linfocitos B pueden aislarse de forma conveniente del bazo o de forma alternativa, de la sangre, médula ósea o ganglios linfáticos del animal inmunizado.
- 40 Se apreciará que la metodología descrita anteriormente puede utilizarse para obtener una preparación de un fragmento de anticuerpo monoclonal de la presente invención que tiene esencialmente cualquier afinidad y/o especificidad de unión al antígeno blanco deseada. Tal preparación puede utilizarse en varias aplicaciones que se benefician de un reactivo capaz de unirse al antígeno blanco con dichas características definidas de unión al antígeno blanco.
- 45 Debido a que el Fab' es esencialmente similar al Fab en estructura, una preparación que comprende un Fab' puede emplearse de forma básicamente intercambiable con una que comprende un Fab, donde dicho Fab y Fab' comprenden esencialmente las mismas regiones variables de cadena ligera y pesada. Para las aplicaciones, como generalmente será el caso, que se benefician de una preparación que comprende un fragmento de anticuerpo capaz de unirse al antígeno blanco con una afinidad máxima, una preparación de F(ab)₂ puede ser superior a una preparación de Fab, Fab' o scFv debido al enlace divalente del F(ab')₂ al antígeno blanco con relación al enlace monovalente de dicho fragmento de anticuerpo monovalente.
- 50 Como se menciona anteriormente, en función de la aplicación y finalidad, la preparación de anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede originarse a partir de varias especies de mamíferos.
- Una preparación de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo que se origina de una especie deseada puede derivarse del suero del animal de dichas especies inmunizadas con el antígeno blanco.

5 Puede preferirse una preparación de un anticuerpo humano o humanizado o fragmento de anticuerpo para las aplicaciones que implican la administración de la preparación a un individuo. Por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado o un fragmento de anticuerpo tenderán generalmente a ser tolerados inmunológicamente de forma óptima y por tanto mostrarán una excelente semivida in vivo en un humano y de ese modo mostrarán una eficacia óptima. A continuación se proporcionan instrucciones adicionales con respecto a la producción y explotación de anticuerpos humanos o humanizados.

La preparación puede utilizarse por sí misma o puede formularse como un ingrediente activo en una composición farmacéutica.

10 Por tanto, se divulga una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y como ingrediente activo un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

A continuación se describen los métodos para formular el anticuerpo o fragmento de anticuerpo como ingrediente activo en una composición farmacéutica y los métodos para explotar dicha composición farmacéutica.

15 Preferentemente, la administración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se realiza mediante la administración de la composición farmacéutica divulgada en la presente que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo como ingrediente activo.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra preferentemente de forma tal de alcanzar un nivel suficiente de fragmento de anticuerpo unido al antígeno blanco para alcanzar una regulación deseada de la actividad bioquímica.

20 Un experto en la técnica, como un médico, más preferentemente un médico especializado en la enfermedad, tendrá la experiencia requerida para determinar un protocolo terapéutico adecuado, que incluye una vía de administración adecuada y una dosis adecuada de anticuerpo o fragmento de anticuerpo para tratar la enfermedad de forma eficaz.

25 La presente invención describe además una sonda de ácido nucleico, donde dicha sonda se hibrida de forma selectiva a un ácido nucleico como se define anteriormente o su hebra complementaria. Las sondas denotan un segmento definido de ácido nucleico (o segmento análogo de nucleótido, por ejemplo, un polinucleótido como se define en la presente) que puede utilizarse para identificar una secuencia específica de polinucleótidos presentes en las muestras, dicho segmento de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que complementa la secuencia de polinucleótidos específica que se desea identificar. Las sondas de la presente invención generalmente comprenden ácidos nucleicos de cadena simple de entre 12 a 600 nucleótidos de longitud, por ejemplo de entre 12 y 500, más preferentemente de entre 15 y 400, generalmente entre 20 y 300. La secuencia de las sondas puede derivarse de las secuencias de la secuencia de genes de la variante de polipéptido del CSF3R. La sonda puede contener sustituciones de nucleótidos y/o modificaciones químicas, por ejemplo, para aumentar la estabilidad de los híbridos o para marcar la sonda. Los ejemplos típicos de etiquetas incluyen, a modo no taxativo, la radioactividad, la fluorescencia, la luminiscencia, etc.

35 Se describe además un cebador de ácido nucleico que puede utilizarse para amplificar al menos un fragmento característico de una molécula de ácido nucleico que codifica una variante de polipéptido del CSF3R como se define anteriormente. Un "cebador" significa una secuencia específica de oligonucleótidos que complementa una secuencia de nucleótidos blanco y se utiliza para hibridar la secuencia de nucleótidos blanco. El cebador sirve como punto de inicio para la polimerización de nucleótidos catalizada mediante ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa. Los cebadores típicos de la presente invención son las moléculas de ácido nucleico de cadena simple de aproximadamente 6 a 50 nucleótidos de longitud, más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. La secuencia del cebador puede derivarse directamente de la secuencia de la molécula de ácido nucleico blanco. Se prefiere la complementariedad perfecta entre la secuencia del cebador y el gen blanco para asegurar una alta especificidad. No obstante, pueden tolerarse ciertos desajustes.

45 Los cebadores de ácido nucleico particulares son capaces de hibridarse específicamente con una porción de ácido nucleico de la variante del CSF3R que flanquea o codifica un fragmento característico de dichos polipéptidos. Los ejemplos específicos de cebadores de la presente invención se divulgan a continuación:

sCSF3R-F1: ATGGCAAGGCTGGGAAACTG (SEQ ID NO: 13)
sCSF3R-R1: TTTAGTAGAGGCGGGGTTTCG (SEQ ID NO: 14)
sCSF3R-F1 anidado: ACTTGGGCTGCCCTGATCATCC (SEQ ID NO: 15)
sCSF3R-R1 anidado: TGGCCAGGCTGATCATGAATC (SEQ ID NO: 16)
sCSF3R-EX1: GAAACTGCAGCCTGACTTGGGCTGCCCTGATCA (SEQ ID NO: 17)
sCSF3R-EX2: GAGGCGGGTTTTGCCTTGTGGCCAGGCTGATCATGAAC (SEQ ID NO: 18)
sCSF3R-EX3: ATGGCAAGGCTGGGAAACTGCAGCCTGACTT (SEQ ID NO: 19)
sCSF3R-EX4: ATTTTTTTGTATTTTTAGTAGAGGCGGGGTTTCGCCTT (SEQ ID NO: 20)

sCSF3R-EX5: GCAGGCTTCGCCACCATGGCAAGGCTGGGAAACTG (SEQ ID NO: 21)
 sCSF3R-EX6: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCCACC (SEQ ID NO: 22)

5 Se describe además el uso de un cebador o sonda como se divulga anteriormente para detectar o diagnosticar la presencia de un ácido nucleico que codifica una variante de polipéptido del CSF3R de la presente invención en una muestra. El método puede llevarse a cabo de conformidad con técnicas muy conocidas en la técnica, como poner en contacto una muestra con una sonda como se define anteriormente en condiciones que permiten que ocurra la hibridación y determinar la presencia de un híbrido, o poner en contacto una muestra con un cebador como se define anteriormente en condiciones que permiten la amplificación de ácidos nucleicos y determinar la presencia de un producto de amplificación.

10 Asimismo se divulga el uso de moléculas de ácido nucleico de conformidad con la presente invención como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutante del gen caracterizada por las moléculas de ácido nucleico de la invención que se asocia con una disfunción proporcionará una herramienta de diagnóstico que puede agregarse o definir el diagnóstico de una enfermedad o la susceptibilidad a una enfermedad, lo que resulta de la infraexpresión, sobreexpresión o expresión espacial o temporal alterada del gen. Los individuos que presentan mutaciones en el gen pueden detectarse en el nivel de ADN mediante una variedad de técnicas.

15 Las moléculas de ácido nucleico para el diagnóstico pueden obtenerse de las células de un sujeto, como de la sangre, orina, saliva, biopsia tisular o material de autopsia. El ADN genómico puede utilizarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente mediante el uso de PCR, reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) u otras técnicas de amplificación (ver Saiki et al., Nature, 324, 163-166 (1986); Bej, et al., Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol., 26, 301-334 (1991); Birkenmeyer et al., J. Virol. Meth., 35, 117-126 (1991); Van Brunt, J., Bio/Technology, 8, 291-294 (1990)) antes del análisis.

20 En la presente se divulga un método para diagnosticar una enfermedad en un paciente que comprende evaluar el nivel de expresión de un gen natural que codifica un polipéptido de conformidad con la invención y comparar dicho nivel de expresión con un nivel de control, donde el nivel que sea diferente a dicho nivel de control representa un indicio de la enfermedad. Este método puede comprender las siguientes etapas:

25 a) poner en contacto una muestra de tejido del paciente que presenta una sonda de ácido nucleico en condiciones rigurosas que permiten la formación de un complejo híbrido entre una molécula de ácido nucleico de la presente invención y la sonda;
 b) poner en contacto una muestra de control con dicha sonda en las mismas condiciones utilizadas en la etapa a);
 30 c) y detectar la presencia de complejos híbridos en dichas muestras;
 donde la detección de niveles del complejo híbrido en la muestra del paciente que difieran de los niveles del complejo híbrido en la muestra de control representa un indicio de la enfermedad.

Se describe además un método de diagnóstico que comprende las siguientes etapas:

35 a) obtener una muestra de tejido de un paciente que se examinó para detectar la enfermedad;
 b) aislar una molécula de ácido nucleico de conformidad con la invención a partir de dicha muestra de tejido; y
 c) diagnosticar la enfermedad en un paciente mediante la detección de la presencia de mutación en la molécula de ácido nucleico asociada con la enfermedad.

Para ayudar a la detección de moléculas de ácido nucleico en los métodos descritos anteriormente, puede incluirse una etapa de amplificación, por ejemplo mediante el uso de PCR.

40 Las eliminaciones e inserciones pueden detectarse mediante el cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales pueden identificarse mediante la hibridación del ADN amplificado al ARN marcado de la invención o de forma alternativa, a secuencias de ADN de antisentido marcado de la presente invención. Las secuencias perfectamente emparejadas pueden distinguirse de los dúplex no emparejados mediante la digestión de la RNasa o mediante la evaluación de las diferencias en las temperaturas de fusión. La presencia o ausencia de mutación en un paciente puede detectarse al poner en contacto el ADN con una
 45 sonda de ácido nucleico que se hibrida al ADN en condiciones rigurosas para formar una molécula de cadena doble híbrida, la molécula de cadena doble híbrida tiene una porción sin hibridar de la cadena de la sonda de ácido nucleico en cualquier porción que corresponde a una mutación asociada con la enfermedad; y la detección de la presencia o ausencia de una porción sin hibridar de la cadena de la sonda indica la presencia o ausencia de una mutación asociada con la enfermedad en la porción correspondiente de la cadena de ADN.

50 Dichos diagnósticos son particularmente útiles para pruebas prenatales e incluso neonatales.

Las mutaciones puntuales y otras diferencias de secuencia entre el gen de referencia y los genes "mutantes" pueden identificarse mediante otros métodos muy conocidos en la técnica, como el secuenciado directo del ADN o el polimorfismo conformacional de cadena simple (ver Orita et al., Genomics, 5, 874-879 (1989)). Por ejemplo, puede utilizarse un cebador secuenciador con el producto de la PCR de cadena doble o con una molécula matriz de cadena

- simple generada por una PCR modificada. La determinación de la secuencia se realiza mediante procedimientos convencionales con nucleótidos radiomarcados o mediante procedimientos de secuenciado automático con etiquetas fluorescentes. Los segmentos clonados de ADN pueden utilizarse además como sondas para detectar los segmentos de ADN específicos. La sensibilidad de este método mejora enormemente cuando se lo combina con la PCR.
- 5 Asimismo, las mutaciones puntuales y otras variaciones de secuencias como los polimorfismos, pueden detectarse como se describe anteriormente, por ejemplo, mediante el uso de oligonucleótidos alelo-específico para la amplificación de la PCR de las secuencias que difieren en nucleótidos simples.
- Las diferencias en las secuencias de ADN pueden detectarse además mediante las alteraciones en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN en geles, con o sin agentes desnaturalizantes, o mediante secuenciado directo del ADN (por ejemplo, Myers et al., *Science* (1985) 230:1242). Los cambios en las secuencias en ubicaciones específicas pueden revelarse además mediante ensayos de protección de nucleasa, como la RNasa y la protección SI o el método de escisión química (ver Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 85: 4397-4401).
- 10 Además de la electroforesis en gel convencional y el secuenciado del ADN, las mutaciones como las microeliminaciones, aneuploidias, desplazamientos, inversiones, pueden detectarse además mediante análisis in situ (ver, por ejemplo, Keller et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N.Y., USA (1993)), es decir, las secuencias de ADN o ARN en las células pueden analizarse para detectar mutaciones sin la necesidad de su aislamiento y/o inmovilización en una membrana. La hibridación fluorescente in situ (FISH) es actualmente el método más comúnmente utilizado y se han publicado numerosas reseñas de la FISH (ver, por ejemplo, Trachuck et al., *Science*, 250, 559-562 (1990), and Trask et al., *Trends, Genet.*, 7, 149-154 (1991)).
- 15 Puede construirse una red de sondas de oligonucleótidos que comprendan una molécula de ácido nucleico de conformidad con la invención para llevar a cabo un análisis eficaz de las variantes, mutaciones y polimorfismos genéticos. Los métodos de tecnología de red son muy conocidos en la técnica y tienen una aplicabilidad general y pueden utilizarse para abordar una variedad de interrogantes en la genética molecular incluida la expresión de genes, el enlace genético y la variabilidad genética (ver por ejemplo: M. Chee et al., *Science* (1996), Vol 274, pp 610-613).
- 20 Se divulga además una red preparada y utilizada de conformidad con los métodos descritos en la solicitud de PCT WO95/11995 (Chee et al); Lockhart, D. J. et al. (1996) *Nat. Biotech.* 14: 1675-1680); y Schena, M. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10614-10619). Los pares de oligonucleótidos pueden variar de dos a más de un millón. Los oligómeros se sintetizan en áreas designadas sobre un sustrato que emplea un proceso químico dirigido por luz. El sustrato puede ser papel, nylon u otro tipo de portaobjetos de membrana, filtro, chip, vidrio o cualquier otro tipo de soporte adecuado. El oligonucleótido puede sintetizarse sobre la superficie del sustrato mediante el uso de un procedimiento de acoplamiento químico y un aparato de aplicación de chorro de tinta como se describe en la solicitud de PCT WO95/25116 (Baldeschweiler et al). Puede utilizarse una red "reticulada" análoga a una transferencia por puntos para organizar y unir los fragmentos de ADNc o los oligonucleótidos a la superficie de un sustrato que utiliza procedimientos de enlace de sistema de vacío, térmicos, UV, mecánicos o químicos. Puede fabricarse una red, como aquellas descritas anteriormente, a mano o mediante el uso de dispositivos disponibles (aparatos de transferencia por puntos), materiales (cualquier soporte sólido adecuado) y máquinas (incluidos los instrumentos de robótica) o puede contener 8, 24, 96, 384, 1536 ó 6144 oligonucleótidos o cualquier otro número entre dos y más de un millón lo que hace que se preste para el uso eficaz de instrumentos comercialmente disponibles.
- 25 Además de los métodos discutidos anteriormente, las enfermedades pueden diagnosticarse mediante métodos que comprenden la determinación, a partir de una muestra de un sujeto, de un aumento o disminución anormal en el nivel de polipéptido o ARNm. El aumento o disminución en la expresión puede medirse en el nivel de ARN mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, como, por ejemplo, la amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, PCR, RT-PCR, protección de RNasa, inmunotransferencia (Northern blotting) y otros métodos de hibridación.
- 30 Las técnicas de ensayo que pueden utilizarse para determinar los niveles de un polipéptido de la presente invención en una muestra de un huésped son muy conocidas por Los entendidos en la técnica y se discuten en más detalle anteriormente (incluidos los radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis Western Blot y ensayos ELISA). Se describe además un método de diagnóstico que comprende los siguientes pasos: (a) poner en contacto un ligando como se describe anteriormente con una muestra biológica en condiciones adecuadas para la formación de un complejo ligando-polipéptido y (b) detectar dicho complejo.
- 35 Los protocolos como ELISA, RIA y FACS para medir los niveles de polipéptidos pueden proporcionar además una base para el diagnóstico de niveles alterados o anormales de expresión de polipéptidos. Los valores estándar o normales para la expresión de polipéptidos se establecen a través de la combinación de fluidos corporales o extractos celulares tomados de individuos mamíferos normales, preferentemente humanos, con un anticuerpo para el polipéptido en condiciones adecuadas para la formación de complejos. La cantidad de la formación de complejo estándar puede cuantificarse mediante varios métodos como mediante medios fotométricos.
- 40 Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico de las afecciones o enfermedades caracterizadas por la expresión del polipéptido o en ensayos para controlar a los pacientes que están siendo tratados con los polipéptidos, moléculas de ácidos nucleicos, ligandos y otros compues-
- 45
- 50
- 55

5 tos de la invención. Los anticuerpos útiles para propósitos de diagnóstico pueden prepararse de la misma forma que aquellos descritos anteriormente para los productos terapéuticos. Los ensayos de diagnóstico para el polipéptido incluyen los métodos que utilizan el anticuerpo y una etiqueta para detectar el polipéptido en fluidos corporales o extractos celulares o tisulares humanos. Los anticuerpos pueden utilizarse con o sin modificación y pueden marcarse mediante su unión ya sea mediante enlace covalente o no covalente con una molécula reportera. Pueden utilizarse una gran variedad de moléculas reporteras conocidas en la técnica, muchas de las cuales se describen anteriormente.

10 Las cantidades de polipéptido expresado en muestras de sujeto, de control y de la enfermedad de tejidos a los cuales se les realizó una biopsia se comparan con los valores estándar. La desviación entre los valores estándar y los del sujeto establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad. Los ensayos de diagnóstico pueden utilizarse para distinguir entre la ausencia, presencia y exceso de expresión del polipéptido y para controlar la regulación de los niveles de polipéptido durante la intervención terapéutica. Tales ensayos pueden utilizarse además para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular en estudios animales, en ensayos clínicos o en el control del tratamiento de un paciente individual.

15 Asimismo se divulga un kit de diagnóstico que comprende:

- (a) una molécula de ácido nucleico de la presente invención;
- (b) un polipéptido de la presente invención; o
- (c) un ligando de la presente invención.

20 El kit de diagnóstico puede comprender un primer recipiente que contiene una sonda de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico de conformidad con la invención; un segundo recipiente que contiene cebadores útiles para amplificar la molécula de ácido nucleico e instrucciones para utilizar la sonda y cebadores para facilitar el diagnóstico de la enfermedad. El kit puede comprender además un tercer contenedor que tiene un agente para digerir el ARN sin hibridar.

25 De forma alternativa, el kit de diagnóstico puede comprender una red de moléculas de ácido nucleico, al menos uno de los cuales puede ser una molécula de ácido nucleico de conformidad con la invención.

Para detectar el polipéptido de conformidad con la invención, el kit de diagnóstico puede comprender uno o más anticuerpos que se unen a un polipéptido de conformidad con la invención y un reactivo útil para la detección de una reacción de unión entre el anticuerpo y el polipéptido.

30 Estos kits serán utilizados para el diagnóstico de una enfermedad o la susceptibilidad a una enfermedad seleccionada de la enfermedad injerto contra huésped, cáncer, neutropenia, trastornos o afecciones neurológicas, neumonía, enfermedades autoinmunes, enfermedades hematológicas, trastornos hematopoyéticos, enfermedades infecciosas, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes.

35 La expresión de un polipéptido de la presente invención es asimismo un marcador eficaz para la evaluación del grado de mielopoyesis y de la actividad o para el pronóstico de trastornos malignos de linajes mieloides (por ejemplo, la leucemia mieloblástica) o de trastornos hematopoyéticos (Iwasaki et al.).

En los siguientes ejemplos se divulgarán otros aspectos y ventajas de la presente invención, estos deben considerarse únicamente a modo ilustrativo y no limitar el alcance de la presente solicitud.

TABLA 1

Aminoácido	Grupos sinónimos	Grupos sinónimos más preferidos
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys

His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

TABLA 2

Aminoácido	Grupos sinónimos
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, ácido L-l-tioazolidina-4-carboxílico, D- o L-1-ácido oxazolidina-4-carboxílico
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β-Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, AdaA, AdaG, cis-3,4, o 5-fenilprolina, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S--Me--Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S--Me--Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Clonación del dominio de tipo Ig C2 del sCSF3R

5 Introducción

El sCSF3R es una variante del gen CSF3R (receptor 3 del factor estimulante de colonias). El gen CSF3R se compone de 15 exones de codificación. Existen 2 exones no codificadores en UTR 5'. El sCSF3R es una proteína de 189 aminoácidos que contiene un péptido señal (aminoácidos 1-25) y un dominio de tipo Ig C2 del receptor Lep (aminoácidos 22-111). Es idéntico al CSF3R N-terminal tipo silvestre (Q99062) en los primeros 120 aminoácidos (que se extienden del exón 3 al extremo 5 del exón 4) pero se desvía en el exón 4 por lo que de ese modo se introduce un extremo C diferente y un codón de finalización prematuro que se prevé para producir una proteína truncada.

Se diseñaron dos pares de cebadores de PCR (sCSF3R-F1/sCSF3R-R1 y sCSF3R-F1 anidado/sCSF3R-R1-anidado) (FIG. 1) para actuar como pares anidados, de los cuales el primer par constituye el par externo. El sCSF3R-F1 anidado/sCSF3R-R1-anidado fue diseñado para amplificar un producto de 500 bp entre los exones 3 y 4 de la secuencia del sCSF3R. Se identificó un clon, amplificado a partir del grupo PS3 que contiene el ADNc derivado de la membrana sinovial RA mixta, la osteoartritis mixta y los fibroblastos pulmonares que contenía la secuencia sCSF3R a excepción de los 27 bp faltantes en el extremo 5' y los 40 bp faltantes en el extremo 3' debido a la pos i-

ción de los cebadores anidados utilizados para la PCR. Este clon es el pCR4-TOPO-sCSF3RF1/R1anidado. Los nucleótidos faltantes se agregaron durante la subclonación del cDNA en los vectores de expresión Gateway.

Clonación de SCSF3R

a) Preparación de modelos de ADNc humano

- 5 El ADNc de la primera hebra se preparó a partir de una variedad de muestras de ARN de tejido humano (Clontech, Stratagene, Ambion, Biochain Institute y preparaciones internas) mediante el uso de Superscript II o SuperScript III RNasa H – Transcriptasa Inversa (Invitrogen) de conformidad con el protocolo del fabricante.

10 Para el SuperScript II: Se combinó el cebador Oligo (dT) 15 (1 μ l a 500 μ g/ml) (Promega), 2 μ g de ARN total humano, 1 μ l de la mezcla dNTP 10 mM (10 mM cada uno de los dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) y agua destilada estéril a un volumen final de 12 μ l, en un tubo Eppendorf y se calentó a 65° C durante 5 minutos y se enfrió con hielo. Los contenidos se recolectaron mediante centrifugación breve y se agregaron 4 μ l de solución amortiguadora de primera hebra 5 \times , 2 μ l de DTT 0,1 M y 1 μ l del Inhibidor de Ribonucleasa Recombinante RnasaOUT™ (40 unidades/ μ l, Invitrogen). Los contenidos del tubo se mezclaron suavemente y se incubaron a 42° C durante 2 minutos, a continuación se agregó 1 μ l (200 unidades) de la enzima SuperScript II™ y se mezcló suavemente mediante pipeteado. La mezcla se incubó a 42° C durante 50 minutos y luego se inactivó mediante calentamiento a 70° C durante 15 minutos. Para extraer el ARN complementario del ADNc, se agregó 1 μ l (2 unidades) de E. coli RNasa H (Invitrogen) y la mezcla de reacción se incubó a 37° C durante 20 minutos.

20 Para el SuperScript III: Se combinó 1 μ l del cebador Oligo (dT) 20 (50 μ M, Invitrogen), 2 μ g del ARN total humano, 1 μ l de la mezcla dNTP 10 mM (10 mM cada uno de los dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) y agua destilada estéril a un volumen final de 10 μ l, en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se calentó a 65° C durante 5 minutos y luego se enfrió con hielo. Para cada reacción de la transcriptasa inversa se preparó una mezcla de síntesis de ADNc de la siguiente forma: Se combinaron 2 μ l de solución amortiguadora 10 \times RT, 4 μ l de MgCl 2 25 mM, 2 μ l de DTT 0,1M, 1 μ l de RNasaOUT™ (40 U/ μ l) y 1 μ l de SuperScript III™ enzima transcriptasa inversa en un tubo separado y luego se agregaron 10 μ l de esta mezcla al tubo que contiene el ARN/mezcla del cebador. Los contenidos del tubo se mezclaron suavemente, se recolectaron mediante centrifugación breve y se incubaron a 50° C durante 50 minutos. La reacción se finalizó mediante la incubación a 80° C durante 5 minutos y la mezcla de reacción luego se enfrió con hielo y se recolectó mediante centrifugación breve. Para extraer el ARN complementario del ADNc, se agregó 1 μ l (2 unidades) de E. coli RNasa H (Invitrogen) y la mezcla de reacción se incubó a 37° C durante 20 minutos.

30 La mezcla de reacción final de 21 μ l se diluyó mediante la adición de 179 μ l de agua estéril para proporcionar un volumen total de 200 μ l. Las muestras de ARN se combinaron en grupos de forma tal que cada grupo contenía cinco muestras diferentes de ADNc. Se utilizaron 5 μ l de cada grupo de ADNc como modelo para la PCR en un volumen de reacción final de 50 μ l y este consistió en 1 μ l de cada muestra de ADNc en dicho grupo. Esto representó aproximadamente 20 ng de cada modelo de ADNc individual.

b) bibliotecas de cDNA

- 35 Las bibliotecas de ADNc humano (en vectores del bacteriófago lambda (λ)) fueron compradas a Stratagene, Clontech o Invitrogen o se prepararon en el Serono Pharmaceutical Research Institute en vectores λ ZAP, λ GT110, λ GT11, o TriplEx2 de conformidad con el protocolo del fabricante (Stratagene, Clontech e Invitrogen). El ADN del bacteriófago λ se preparó a partir de cultivos en pequeña escala de la cepa huésped E. coli infestada mediante el uso del sistema de purificación de ADN Wizard Lambda Preps. de conformidad con las instrucciones del fabricante (Promega, Corporation, Madison Wis.).

c) Cebadores de clonación específicos de genes para PCR

- 45 Se diseñaron dos pares de cebadores de PCR con una longitud de entre 18 y 25 bases para amplificar las secuencias 3 y 4 de los exones del sCSF3R mediante el uso del Primer Designer Software (Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, N.C. 27722-2045, USA). Los cebadores de PCR fueron mejorados para presentar una Tm cerca de los 55 \pm 10° C y un contenido de GC del 40-60%. Se seleccionaron los cebadores que tenían una alta selectividad para la secuencia blanco (sCSF3R) con poco o sin cebado específico. Los cebadores se diseñaron para formar dos pares anidados de forma tal que los cebadores sCSF3R-F1anidado/sCSF3R-R1 anidado se posicionaran levemente en el interior de los cebadores sCSF3R-F1/sCSF3R-R1.

d) Amplificación de la PCR de los modelos de ADNc humano del SCSF3R.

- 50 Los cebadores de clonación específicos de genes sCSF3R-F1/sCSF3R-R1 (Tabla 3, FIG. 1) se diseñaron para amplificar un fragmento de ADNc de 554 bp dentro de los exones 3 y 4 del sCSF3R. El par de cebadores sCSF3R-F1/sCSF3R-R1 se utilizó en la PCR1 sobre el panel de los modelos de biblioteca de ADNc y los grupos de modelos de ADNc de tejidos individuales. Esta PCR1 se realizó en un volumen final de 50 μ l que contenía 1 \times solución amortiguadora AmpliTaq™, 200 μ M de dNTPs, 50 pmoles de cada cebador de clonación, 2,5 unidades de AmpliTaq™ (Applied Biosystems) y aproximadamente 20 ng de la biblioteca de ADNc o 100 ng del modelo de ADNc agrupado

mediante el uso de un motor de búsqueda de ADN MJ, programado de la siguiente forma: 94° C, 2 minutos; 40 ciclos de 94° C, 1 minuto, 57° C, 1 minuto y 72° C, 1 minuto; seguidos de 1 ciclo a 72° C durante 7 minutos y un ciclo de retención a 4° C, se visualizaron 30 µl de cada producto de amplificación de PCR1 sobre un gel de agarosa al 0,8% en solución amortiguadora 1×TAE (Invitrogen) pero no se observaron productos.

- 5 Cada producto de la PCR1 se utilizó luego como modelo para la PCR2 mediante el uso de cebadores de amplificación sCSF3R-F1anidado/sCSF3R-R1 anidado (Tabla 3, FIG. 1-4), diseñados para amplificar el fragmento de ADNc de 500 bp dentro del producto sCSF3R-F1/sCSF3R-R1. La PCR2 se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía una solución amortiguadora 1× AmpliTaq™, 200 µM de dNTPs, 50 pmoles de cada cebador de clonación, 2,5 unidades de AmpliTaq™ (Applied Biosystems) y 1 µl del producto de la PCR1 mediante el uso de un motor de
- 10 búsqueda de ADN MJ, programado de la siguiente forma: 94° C, 2 minutos; 40 ciclos de 94° C, 1 minuto, 61° C, 1 minuto y 72° C, 1 minuto; seguidos de 1 ciclo a 72° C durante 7 minutos y un ciclo de retención a 4° C.

Se visualizaron 30 µl de cada producto de la amplificación de la PCR2 sobre un gel de agarosa al 0,8% en solución amortiguadora 1×TAE (Invitrogen). Los productos de aproximadamente el peso molecular esperado se purificaron a partir del gel mediante el uso del sistema de purificación de ADN Qiagen MinElute (Qiagen), se eluyeron en 10 µl de

15 solución amortiguadora EB (10 mM Tris.Cl, pH 8,5) y se subclonaron directamente.

e) Subclonación de los productos de la PCR

Los productos de la PCR se subclonaron en el vector de clonación modificado topoisomerasa I (pCR4-TOPO) mediante el uso del kit de clonación de transcriptasa inversa de Invitrogen Corporation en las condiciones especificadas por el fabricante. Brevemente, 4 µl del producto purificado en gel de la PCR se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con 1 µl del vector TOPO y 1 µl de solución salina. La mezcla de reacción luego se transformó en la cepa E. coli TOP10 (Invitrogen) de la siguiente forma: se descongeló sobre hielo una alícuota de 50 µl de células TOP10 One Shot y se agregaron 2 µl de la reacción de TOPO. La mezcla se incubó durante 15 minutos sobre hielo y luego se sometió a choque térmico mediante incubación a 42° C durante exactamente 30 segundos. Las muestras se volvieron a colocar en hielo y se agregaron 250 µl de un medio SOC templado (temperatura ambiente). Las muestras se incubaron con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37° C. A continuación se colocó la mezcla de transformación en placas de caldo L (LB) que contenían ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 37° C.

20

25

f) PCR de colonias

Las colonias se inocularon en 50 µl de agua estéril mediante el uso de un mondadientes estéril. A continuación se sometió una alícuota de 10 µl del inóculo a PCR en un volumen total de reacción de 20 µl que contenía solución amortiguadora 1× AmpliTaq™, 200 µM de dNTPs, 20 pmoles de cebador T7, 20 pmoles de cebador T3 y 1 unidad de AmpliTaq (Applied Biosystems) mediante el uso de un motor MJ de búsqueda de ADN. Las condiciones del ciclo fueron las siguientes: 94° C., 2 minutos; 30 ciclos de 94° C., 30 segundos, 48° C., 30 segundos y 72° C. durante 1 minuto. Las muestras se mantuvieron a 4° C. (ciclo de retención) antes del análisis adicional.

30

Se analizaron los productos de reacción de la PCR sobre geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora 1×TAE. Las colonias que proporcionaron productos de la PCR de aproximadamente el peso molecular esperado (500 bp+105 bp debido al sitio de clonación múltiple (MCS)) se cultivaron durante la noche a 37° C. en un caldo-L (LB) de 5 ml que contenía ampicilina (100 µg/ml), con agitación a 220 rpm.

35

f) Preparación y secuenciado del ADN plásmido

El ADN plásmido Miniprep se preparó a partir del cultivo de 5 ml mediante el uso del sistema robótico Biorobot 8000 (Qiagen) o el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega cat. no. 1460) de conformidad con las instrucciones del fabricante. El ADN plásmido se eluyó en 80 µl de agua estéril. La concentración de ADN se midió mediante el uso del fotómetro Spectramax 190 (Molecular Devices). El ADN plásmido (200-500 ng) se sometió a secuenciado del ADN con los cebadores T7 y T3 (Tabla 3) mediante el uso del sistema terminador BigDye (Applied Biosystems cat. no. 4390246) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciado se purificaron mediante el uso de columnas Dye-Ex (Qiagen) o placas de limpieza Montage SEQ 96 (Millipore cat. no. LSKS09624) y luego se analizaron sobre un secuenciador Applied Biosystems 3700.

40

45

El análisis de secuencia identificó un clon, amplificado a partir un grupo (PS3) que contenía ADNc derivado de la membrana sinovial RA mixta, las células de osteoartritis mixta y los fibroblastos pulmonares que contenían la secuencia sCSF3R. En la secuencia clonada, el 27 bp faltaba en el extremo 5' y el 40 bp faltaba en el extremo 3' debido a la posición de los cebadores anidados utilizados para la PCR. La secuencia del fragmento de ADNc clonado se muestra en la FIG. 2. El producto clonado de la PCR se encuentra en el pCR4-TOPO-sCSF3RF1/R1anidado plásmido.

50

Construcción de vectores de expresión de células mamíferas para el sCSF3R

El pCR4-TOPO-sCSF3RF1/R1 anidado plásmido se utilizó como modelo de PCR para generar los clones de expresión pEAK12d y pDEST12.2 que contienen la secuencia sCSF3R ORF con una secuencia 3' que codifica el marcador 6HIS mediante el uso de la metodología de clonación Gateway™ (Invitrogen).

5 a) Generación del marco de lectura abierto (ORF) del sCSF3R compatible Gateway fusionado con una secuencia de marcador 6HIS de trama entrante.

10 La primera etapa del proceso de clonación Gateway implica una reacción de PCR de cuatro etapas que genera el ORF del sCSF3R flanqueado en el extremo 5' por un sitio de recombinación attB1 y una secuencia Kozak y flanqueado en el extremo 3' por una secuencia que codifica un marcador de histidina 6 (6HIS) de trama entrante, un codón de finalización y el sitio de recombinación attB2 (cADN compatible con Gateway). Las bases faltantes de los cds previstos se agregaron con los cebadores sentido sCSF3R-EX1, sCSF3R-EX3 y los cebadores antisentido sCSF3R-EX2, sCSF3R-EX4.

15 La primera reacción de la PCR (para agregar 14 bases en el extremo 5' y 18 bases en el extremo 3') contiene respectivamente (en un volumen final de 50 µl): 1 µl (30 ng) de pCR4-TOPO-sCSF3RF1/R1 anidado plásmido, 1,5 µl de dNTPs (10 mM), 10 µl de solución amortiguadora de polimerasa 10× Pfx, 1 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,5 µl de cada uno de los cebadores específicos de genes (100 µM) (sCSF3R-EX1 y sCSF3R-EX2) y 0,5 µl de polimerasa de ADN Platinum Pfx (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó mediante el uso de un paso desnaturante inicial de 95° C durante 2 minutos, seguido de 20 ciclos de 94° C. durante 15 segundos; 55° C. durante 30 segundos y 68° C. durante 2 minutos y un ciclo de retención de 4° C.

20 Se observó una alícuota de 10 µl sobre el gel de agarosa al 0,8% en una solución amortiguadora 1×TAE (Invitrogen) para verificar que el producto tenía el peso molecular esperado (500±32=532 bp). Los 40 µl restantes se cargaron sobre el gel de agarosa al 0,8% en un gel amortiguador 1×TAE y la banda se purificó mediante el uso del sistema de purificación de ADN Wizard PCR Preps (Promega) y se recuperó en 50 µl de agua estéril de conformidad con las instrucciones del fabricante. La segunda reacción de PCR (para agregar los nucleótidos restantes en ambos extremos) contiene respectivamente (en un volumen final de 50 µl): 4 µl (4 ng) del producto purificado de la PCR1, 1,5 µl de dNTPs (10 mM), 10 µl de solución amortiguadora de polimerasa 10× Pfx, 1 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,5 µl de cada uno de los cebadores específicos de genes (100 µM) (sCSF3R-EX3 y sCSF3R-EX4) y 0,5 µl de polimerasa de ADN Platinum Pfx (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó mediante el uso de un paso desnaturante inicial de 95° C durante 2 minutos, seguido de 20 ciclos de 94° C. durante 15 segundos; 55° C. durante 30 segundos y 68° C. durante 2 minutos y un ciclo de retención de 4° C. Se observó una alícuota de 10 µl sobre el gel de agarosa al 0,8% en una solución amortiguadora 1×TAE (Invitrogen) para verificar que el producto tenía el peso molecular esperado. Los 40 µl restantes se cargaron sobre el gel de agarosa al 0,8% en un gel amortiguador 1×TAE y la banda se purificó mediante el uso del Wizard SV Gel y el sistema de limpieza de PCR (Promega) y se recuperó en 40 µl de agua estéril de conformidad con las instrucciones del fabricante.

35 La tercera reacción de PCR (en un volumen final de 50 µl) contiene respectivamente: 4 µl del producto purificado de la PCR2, 1,5 µl de dNTPs (10 mM), 10 µl de solución amortiguadora de polimerasa 10× Pfx, 1 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,5 µl de cada uno de los cebadores específicos de genes (100 µM) (sCSF3R-EX5 y sCSF3R-EX6) y 0,5 µl de polimerasa de ADN Platinum Pfx (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó mediante el uso de un paso desnaturante inicial de 95° C durante 2 minutos, seguido de 12 ciclos de 94° C. durante 15 segundos; 55° C. durante 30 segundos y 68° C. durante 2 minutos y un ciclo de retención de 4° C. El producto de amplificación se purificó directamente mediante el uso del sistema de purificación de ADN Wizard PCR Preps (Promega) y se recuperó en 50 µl de agua estéril de conformidad con las instrucciones del fabricante.

40 La cuarta reacción de PCR (en un volumen final de 50 µl) contiene 10 µl del producto purificado de la PCR3, 1,5 µl de dNTPs (10 mM), 10 µl de solución amortiguadora de polimerasa 10× Pfx, 1 µl de MgSO₄ (50 mM), 0,5 µl de cada uno de los cebadores de conversión Gateway (100 µM) (GCP sentido y GCP antisentido) y 0,5 µl de polimerasa de ADN Platinum Pfx. Las condiciones para la segunda reacción de PCR fueron las siguientes: 95° C durante 1 minuto; 4 ciclos de 94° C, 15 segundos; 50° C, 30 segundos y 68° C durante 2 minutos; 25 ciclos de 94° C, 15 segundos; 55° C, 30 segundos y 68° C, 2 minutos; seguido de un ciclo de 4° C. Se observó una alícuota de 10 µl sobre el gel de agarosa al 0,8% en una solución amortiguadora 1×TAE (Invitrogen) para verificar que el producto tenía el peso molecular esperado (567±70=637 bp). Los 40 µl restantes se cargaron sobre el gel de agarosa al 0,8% en un gel amortiguador 1×TAE y la banda se purificó mediante el uso del sistema de purificación de ADN Wizard PCR Preps (Promega) y se recuperó en 50 µl de agua estéril de conformidad con las instrucciones del fabricante.

b) Subclonación del marco de lectura abierto (ORF) del sCSF3R compatible Gateway en el vector de entrada Gateway pDONR221 y los vectores de expresión pEAK12d y pDEST12.2.

55 La segunda etapa del proceso de clonación Gateway implica subclonar el producto Gateway de la PCR modificado en el vector de entrada Gateway pDONR221 (Invitrogen) de la siguiente forma: se incubaron 5 µl del producto purificado de la PCR4 con 1,5 µl del vector pDONR221 (0,1 µg/µl), 2 µl de solución amortiguadora de BP y 1,5 µl de una mezcla de la enzima BP clonasa (Invitrogen) en un volumen final de 10 µl a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo por la adición de 1 µl de la proteinasa K (2 µg/µl) y se incubó a 37° C durante 10 minutos adicionales. Se utilizó una alícuota de esta reacción (1 µl) para transformar las células DH10B de E. coli mediante electro-

- poración de la siguiente forma: se descongeló sobre hielo una alícuota de 25 µl de células electrocompetentes DH10B (Invitrogen) y se agregó 1 µl de la mezcla de reacción de BP. La mezcla se transfirió a una cubeta fría de electroporación de 0,1 cm y las células se electroporizaron mediante el uso de un aparato BioRad Gene-Pulser™ de conformidad con el protocolo recomendado por el fabricante. Inmediatamente después de la electroporación se agregó un medio SOC (0,5 ml) que había sido precalentado a temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a un tubo con tapa a presión de 15 ml y se incubó con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37° C. Las alícuotas de la mezcla de transformación (10 µl y 50 µl) luego se colocaron en placas de caldo-L (LB) que contenían kanamicina (40 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 37° C.
- Se preparó el ADN plásmido miniprep a partir de un cultivo de 5 ml de 8 de las colonias resultantes mediante el uso de un sistema Qiaprep BioRobot 8000 (Qiagen). El ADN plásmido (150-200 ng) se sometió a secuenciado del ADN con los cebadores 21M13 y M13Rev mediante el uso del sistema terminador BigDye (Applied Biosystems cat. no. 4336919) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Las secuencias del cebador se muestran en la Tabla 3. Las reacciones de secuenciado se purificaron mediante el uso de placas de limpieza Montage SEQ 96 (Millipore cat. no. LSKS09624) y luego se analizaron sobre un secuenciador Applied Biosystems 3700.
- El eluido plásmido (2 µl o aproximadamente 150 ng) de uno de los clones que contenía la secuencia correcta (pENTR_sCSF3R-6HIS) después se utilizó en una reacción de recombinación que contenía 1,5 µl del vector pE-AK12d o del vector (0,1 µg/µl), 2 µl de solución amortiguadora de LR y 1,5 µl de clonasa LR (Invitrogen) en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, se detuvo por la adición de la proteinasa K (2 µg) y se incubó a 37° C durante unos 10 minutos adicionales. Se utilizó una alícuota de esta reacción (1 µl) para transformar las células DH10B de E. coli mediante electroporación de la siguiente forma: se descongeló sobre hielo una alícuota de 25 µl de células electrocompetentes DH10B (Invitrogen) y se agregó 1 µl de la mezcla de reacción de LR. La mezcla se transfirió a una cubeta fría de electroporación de 0,1 cm y las células se electroporizaron mediante el uso de un aparato BioRad Gene-Pulser™ de conformidad con el protocolo recomendado por el fabricante. Inmediatamente después de la electroporación se agregó un medio SOC (0,5 ml) que había sido precalentado a temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a un tubo con tapa a presión de 15 ml y se incubó con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37° C. Las alícuotas de la mezcla de transformación (10 µl y 50 µl) luego se colocaron en placas de caldo-L (LB) que contenían ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 37° C.
- Se preparó el ADN plásmido miniprep a partir de los cultivos de 5 ml de 6 de las colonias resultantes subclonadas en cada vector mediante el uso de un sistema Qiaprep BioRobot 8000 (Qiagen). El ADN plásmido (200-500 ng) en el vector pEAK12d se sometió a secuenciado del ADN con los cebadores pEAK12F y pEAK12R como se describe anteriormente. El ADN plásmido (200-500 ng) en el vector pDEST12.2 se sometió a secuenciado del ADN con los cebadores 21M13 y M13Rev como se describe anteriormente. Las secuencias del cebador se muestran en la Tabla 3.
- El ADN maxi-prep purificado mediante gradiente de CsCl se preparó a partir de un cultivo de 500 ml del clon verificado de la secuencia (pEAK12d_sCSF3R-6HIS) mediante el uso del método descrito por Sambrook J. et al., 1989 (en Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2da edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press). El ADN plásmido se resuspendió a una concentración de 1 µg/µl en agua estéril (o 10 mM Tris-HCl pH 8,5) y se almacenó a -20° C.
- El ADN maxi-prep libre de endotoxinas se preparó a partir de un cultivo de 500 ml del clon verificado de la secuencia (pDEST12.2_sCSF3R-6HIS) mediante el uso del kit EndoFree Plasmid Mega (Qiagen) de conformidad con las instrucciones del fabricante. El ADN plásmido purificado se resuspendió en una solución amortiguadora de TE libre de endotoxinas a una concentración final de al menos 3 µg/µl y se almacenó a -20° C.

TABLA 3: Cebadores de clonación y secuenciado del SCSF3R

Cebador	Secuencia (5'-3')
SCSF3R-F1	ATGGCAAGGCTGGGAAACTG
SCSF3R-R1	TTTAGTAGAGGCGGGTTTCG
SCSF3R-F1 anidado	ACTTGGGCTGCCCTGATCATCC
SCSF3R-R1 anidado	TGGCCAGGCTGATCATGAACTC
SCSF3R-EX1	GAAACTGCAGCCTGACTTGGGCTGCCCTGATCA
SCSF3R-EX2	GAGGCGGGTTTCGCCTTGCTGGCCAGGCTGATCAT GAAC
SCSF3R-EX3	ATGGCAAGGCTGGGAAACTGCAGCCTGACTT
SCSF3R-EX4	ATTTTTTTGTATTTTTAGTAGAGGCGGGTTTCGCC TT
SCSF3R-EX5	GCAGGCTTC <u>GCCACC</u> ATGGCAAGGCTGGGAAACTG
SCSF3R-EX6	TGATGGTGATGGTG ATTTTTTTGTATTTTTAGTAGA

GCP sentido GGC
 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GCCA
CC
 GCP antisentido GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT **TCA** *ATG*
GTGATGGTGATGGTG
 pEAK12F GCCAGCTTGGCACTTGATGT
 pEAK12R GATGGAGGTGGACGTGTCAG
 21M13 TGATAAACGACGGCCAGT
 M13REV CAGGAAACAGCTATGACC
 T7 TAATACGACTCACTATAGG
 T3 ATTAACCCTCACTAAAGG

Secuencia subrayada = secuencia Kozak

Negrita = Codón de finalización

Secuencia en *cursiva* = marcador His

Ejemplo 2 – Expresión de la genómica funcional en células mamíferas y purificación del pEAK12d_sCSF3R-6HIS plásmido clonado marcado con His

5 293 células de riñón embrionario humano que expresan el antígeno nuclear del virus Epstein-Barr (HEK293-EBNA, Invitrogen) se mantuvieron en suspensión en un medio libre de suero Ex-cell VPRO (siembra en caldo, medio de mantenimiento, JRH). Las células se inocularon en un medio a 1×10^6 células/ml en 250 ml FEME (DMEM/Ham's F-12 1:1 19 mM HEPES, 5 g/L Glucosa, 7,5 mM L-Glutamina, 4 ml/L ITS-X) (todas Invitrogen-Life Technologies) complementado con FCS al 1%. Para la mezcla de transfección se diluyeron 500 µg de ADN (pEAK12d_sCSF3R-6HIS) más 10 µg del ADN del gen reportero en 50 ml FEME 1% FCS. A continuación se agregó 1 ml de PEI (1 mg/l Polysciences, USA). Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de 10 minutos la mezcla de transfección se agregó a las células y el cultivo se incubó a 37° C en el incubador durante 90 minutos. Finalmente, el volumen se completó con los 200 ml de FEME 1% FCS que contenía 2,5 ml de Pen-Strep para prevenir la contaminación debido a la inesterilidad del ADN. La confirmación de la transfección positiva se realizó mediante el examen de fluorescencia cualitativa en el día 6 (Axiovert 10 Zeiss). En el día 6 (día de cosecha), el sobrenadante 10 (500 ml) se centrifugó (4° C, 400 g) y se colocó en un recipiente que tenía un identificador único.

15 Se conservó una alícuota (500 µl) para el control de calidad (QC) de la proteína marcada con 6His (control de calidad del bioprocesamiento interno).

Proceso de purificación

20 La muestra del medio de cultivo de 500 ml que contenía la proteína recombinante con un marcador 6His C-terminal se diluyó con una solución amortiguadora helada A (NaH 2 PO 4 50 mM; NaCl 600 mM; glicerol al 8,7% (p/v), pH 7,5) a un volumen final de 1000 ml. La muestra se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm (Millipore, unidad de filtro de 500 ml) y se mantuvo a 4° C en una botella cuadrada estéril de 1 litro (Nalgene).

25 La purificación se realizó a 4° C en una terminal de trabajo VISION (Applied Biosystems) conectada a un cargador de muestras automático (Labomatic). El procedimiento de purificación se compuso de dos etapas secuenciales, la cromatografía por afinidad de metales sobre una columna Poros 20 MC (Applied Biosystems) cargada con iones de Ni (10×50 mm, 3,93 ml), seguida de un intercambio de solución amortiguadora sobre una columna de filtración en gel de Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia) (1.0×15 cm).

30 Para la primera etapa cromatográfica la columna de afinidad de metales se regeneró con 30 volúmenes de columna de solución EDTA (EDTA 100 mM; NaCl 1 M; pH 8,0), se recargó con iones de Ni mediante el lavado con 15 volúmenes de columna de una solución de NiSO 4 100 mM, se lavó con 10 volúmenes de columna de la solución amortiguadora A, seguida de 7 volúmenes de columna de la solución amortiguadora B (NaH 2 PO 4 50 mM ; NaCl 600 mM; glicerol al 8,7% (p/v) , 400 mM; imidazol, pH 7,5) y finalmente se equilibró con 15 volúmenes de columna de la solución amortiguadora A que contenía 15 mM de imidazol. La muestra se transfirió, mediante el cargador de muestras Labomatic, a un asa para muestras de 200 ml y a continuación se cargó en una columna de afinidad del metal Ni a una velocidad de flujo de 20 ml/min. El procedimiento de carga se repitió 5 veces para transferir la totalidad de la muestra (1000 ml) a la columna de Ni. A continuación la columna se lavó con 12 volúmenes de columna de la solución amortiguadora A seguida por 28 volúmenes de columna de la solución amortiguadora A que contenía 20 mM de imidazol. Durante el lavado de imidazol 20 mM las proteínas contaminantes ligeramente unidas se eluyeron de la columna. La proteína marcada con His recombinante finalmente se eluyó con 10 volúmenes de columna de la solución amortiguadora B a una velocidad de flujo de 2 ml/min y la proteína eluida se recolectó en una fracción de 2,7 ml. 35 40

5 Para la segunda etapa de cromatografía la columna de filtración en gel de Sephadex G-25 se regeneró con 2 ml de solución amortiguadora D (NaCl 1,137 M; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; pH 7,2), y a continuación se equilibró con 4 volúmenes de columna de la solución amortiguadora C (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; glicerol al 20% (p/v); pH 7,4). La fracción pico eluida de la columna de Ni fue automática, mediante el cargador de muestras integrado sobre el VISION, cargado en la columna Sephadex G-25 y la proteína se eluyó con la solución amortiguadora C a una velocidad de flujo de 2 ml/min. La muestra desalinizada se recuperó en una fracción de 2,7 ml. La fracción se filtró a través de un filtro de centrifugación estéril de 0,22 µm (Millipore), se separó en alícuotas, se congeló y se almacenó a -80° C. Se analizó una alícuota de la muestra sobre SDS-PAGE (4-12% NuPAGE gel; Novex) mediante tinción azul de Coomassie e inmunotransferencia (Western blot) con anticuerpos anti-His.

10 Tinción azul de Coomassie

El gel NuPAGE se tiñó en una solución de tinción azul de Coomassie R250 al 0,1 % (metanol al 30%, ácido acético al 10%) a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se destiñó en metanol al 20%, ácido acético al 7,5% hasta que el fondo quedó limpio y las bandas proteicas claramente visibles.

15 Inmunotransferencia (Western Blot)

20 A continuación de la electroforesis las proteínas se electrotransfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa a 290 mA durante 1 hora a 4° C. La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% en la solución amortiguadora E (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; Tween 20 al 0,1%, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubó con una mezcla de 2 anticuerpos anti-His policlonales de conejo (G-18 y H-15, de 0,2 µg/ml cada uno; Santa Cruz) en leche en polvo al 2,5% en la solución amortiguadora E durante la noche a 4° C. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la membrana se lavó con la solución amortiguadora E (3x10 min.) y después se incubó con un anticuerpo secundario anti conejo conjugado con HRP (DAKO, HRP 0399) diluido 1/3000 en la solución amortiguadora E que contenía leche en polvo al 2,5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado con la solución amortiguadora E (3x10 minutos), la membrana se desarrolló con el kit ECL (Amersham) durante 1 minuto. A continuación la membrana se expuso a hiper película (Amersham), la película se desarrolló y la imagen de la inmunotransferencia (Western blot) se analizó visualmente.

25 Ensayo proteico

La concentración proteica se determinó mediante el uso del kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce) con albúmina de suero bovino como estándar. El producto fue 184 µg de sCSF3R-6HIS purificada.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> Polipéptidos de CSF3R y sus usos

<130> w01130

5 <150> EP 06116704.5
<151> 2006-07-06

<150> US 60/832,177
<151> 2006-07-19

<160> 30

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 588
<212> ADN
<213> homo sapiens

15 <400> 1
atggcaaggc tgggaaactg cagcctgact tgggctgccc tgatcatcct gctgctcccc 60
ggaagtctgg aggagtgcgg gcacatcagt gtctcagccc ccatcgtcca cctgggggat 120
cccatcacag cctcctgcat catcaagcag aactgcagcc atctggacc ggagccacag 180
attctgtgga gactgggagc agagcttcag cccgggggca ggcagcagcg tctgtctgat 240
20 gggaccagg aatctatcat caccctgccc cacctcaacc aactcaggc ctttctctcc 300
tgctgcctga actggggcaa cagcctgcag atcctggacc aggttgagct gcgcgcaggc 360
tgtaagtctt tccagccatc caactactct gcctccaaca ccctcctgcc aatactaata 420
agaatattac cagccgggca cgttggctca cgctgtatt cccagcactt tgggaggccg 480
aggcaggcgg atcacctgag gtcaggagtt catgatcagc ctggccagca aggcgaaacc 540
25 ccgcctctac taaaaataca aaaaaatcac catcaccatc accattag 588

<210> 2
<211> 189
<212> PRT
<213> homo sapiens

30 <400> 2
Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile
1 5 10 15
Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser
20 25 30
35 Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile
35 40 45
Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg
50 55 60
Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp
40 65 70 75 80

ES 2 368 092 T3

Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln
85 90 95
Ala Phe Leu ser cys cys Leu Asn Trp Gly Asn ser Leu Gln Ile Leu
100 105 110
5 Asp Gln Val Gln Leu Arg Ala Gly Cys Lys Ser Phe Gln Pro Ser Asn
115 120 125
Tyr Ser Ala Ser Asn Thr Leu Leu Pro Ile Leu Ile Arg Ile Leu Pro
130 135 140
10 Ala Gly His Val Gly Ser Arg Leu Tyr Ser Gln His Phe Gly Arg Pro
145 150 155 160
Arg Gln Ala Asp His Leu Arg Ser Gly Val His Asp Gln Pro Gly Gln
165 170 175
Gln Gly Glu Thr Pro Pro Leu Leu Lys Ile Gln Lys Asn
180 185

15 <210> 3
<211> 513
<212> ADN
<213> homo sapiens

20 <400> 3
gagtgccggc acatcagtgt ctcagcccc atcgccacc tgggggatcc catcacagcc 60
tcctgcatca tcaagcagaa ctgcagccat ctggaccg agccacagat tctgtggaga 120
ctgggagcag agcttcagcc cgggggagcag cagcagcgtc tgtctgatgg gaccagcaa 180
tctatcatca ccctgcccc cctcaaccac actcaggcct ttctctctg ctgcctgaac 240
tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc gcgcaggctg taagtccttc 300
25 cagccatcca actactctgc ctccaacacc ctctgcca tactaataag aatattacca 360
gccgggcacg ttggctcag cctgtattcc cagcactttg ggaggccgag gcaggcggat 420
cacctgaggt caggagtcca tgatcagcct ggccagcaag gcgaaacccc gccttacta 480
aaaatacaaa aaaatcacca tcaccatcac cat 513

30 <210> 4
<211> 165
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

35 Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
1 5 10 15
Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
20 25 30

ES 2 368 092 T3

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
 35 40 45
 Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr
 50 55 60
 5 Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn
 65 70 75 80
 Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly
 85 90 95
 Cys Lys Ser Phe Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Ala Ser Asn Thr Leu Leu
 10 100 105 110
 Pro Ile Leu Ile Arg Ile Leu Pro Ala Gly His Val Gly Ser Arg Leu
 115 120 125
 Tyr Ser Gln His Phe Gly Arg Pro Arg Gln Ala Asp His Leu Arg Ser
 130 135 140
 15 Gly Val His Asp Gln Pro Gly Gln Gln Gly Glu Thr Pro Pro Leu Leu
 145 150 155 160
 Lys Ile Gln Lys Asn
 165

20 <210> 5
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 <400> 5
 acttgggctg ccctgatcat cctgctgctc cccggaagtc tggaggagtg cgggcacatc 60
 25 agtgtctcag ccccatcgt ccacctgggg gatcccatca cagcctcctg catcatcaag 120
 cagaactgca gccatctgga cccggagcca cagattctgt ggagactggg agcagagctt 180
 cagccccggg gcaggcagca gcgtctgtct gatgggacct aggaatctat catcacctg 240
 cccacactca accacactca ggcctttctc tctgctgcc tgaactgggg caacagcctg 300
 cagatcctgg accaggttga gctgcgcgca ggctgtaagt ccttccagcc atccaactac 360
 30 tctgcctcca acaccctcct gccaatacta ataagaatat taccagccgg gcacgttggc 420
 tcacgcctgt attcccagca ctttgggagg ccgaggcagg cggatcacct gaggtcagga 480
 gttcatgatc agcctggcca g 501

35 <210> 6
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 6

ES 2 368 092 T3

Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp Pro
 20 25 30
 5 Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp Pro
 35 40 45
 Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly Gly
 50 55 60
 Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr Leu
 10 65 70 75 80
 Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn Trp
 85 90 95
 Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly Cys
 100 105 110
 15 Lys Ser Phe Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Ala Ser Asn Thr Leu Leu Pro
 115 120 125
 Ile Leu Ile Arg Ile Leu Pro Ala Gly His Val Gly Ser Arg Leu Tyr
 130 135 140
 20 Ser Gln His Phe Gly Arg Pro Arg Gln Ala Asp His Leu Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 val His Asp Gln Pro Gly Gln
 165

 <210> 7
 <211> 456
 25 <212> ADN
 <213> homo sapiens

 <400> 7
 gagtgcgggc acatcagtgt ctcagcccc atcgtccacc tgggggatcc catcacagcc 60
 tcctgcatca tcaagcagaa ctgcagccat ctggaccgg agccacagat tctgtggaga 120
 30 ctgggagcag agcttcagcc cgggggcagg cagcagcgtc tgtctgatgg gaccaggaa 180
 tctatcatca ccctgcccc cctcaaccac actcaggcct ttctctcctg ctgcctgaac 240
 tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc gcgcaggctg taagtccttc 300
 cagccatcca actactctgc ctccaacacc ctctgcca a tactaataag aatattacca 360
 gccgggcacg ttggctcacg cctgtattcc cagcactttg ggaggccgag gcaggcggat 420
 35 cacctgaggt caggagtcca tgatcagcct ggccag 456

 <210> 8
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 40 <400> 8

ES 2 368 092 T3

tgtgagctgc gccacaagcc gcagcgtgga gaagccagct gggcactggt gggccccctc 1020
 cccttgagg cccttcagta tgagctctgc gggctcctcc cagccacggc ctacaccctg 1080
 cagatacgct gcatccgctg gccctgcct ggcactgga gcgactggag cccagcctg 1140
 gagctgagaa ctaccgaacg ggccccact gtcagactgg acacatggtg gcggcagagg 1200
 5 cagctggacc ccaggacagt gcagctgttc tggaagccag tgcccctgga ggaagacagc 1260
 ggacggatcc aaggttatgt ggtttcttgg agaccctcag gccaggctgg ggccatcctg 1320
 cccctctgca acaccacaga gctcagctgc accttcacc tgccttcaga agcccaggag 1380
 gtggcccttg tggcctataa ctcagccggg acctctcgcc ccaccccggt ggtcttctca 1440
 gaaagcagag gccagctct gaccagactc catgccatgg cccgagacc tcacagcctc 1500
 10 tgggtaggct gggagcccc caatccatgg cctcagggct atgtgattga gtggggcctg 1560
 ggcccccca gcgcgagcaa tagcaacaag acctggagga tggaacagaa tgggagagcc 1620
 acggggtttc tgctgaagga gaacatcagg ccctttcagc tctatgagat catcgtgact 1680
 cccttgtaac aggacacat gggaccctcc cagcatgtct atgcctactc tcaagaaatg 1740
 gctccctccc atgcccaga gctgcatcta aagcacattg gcaagacctg ggcacagctg 1800
 15 gagtgggtgc ctgagcccc tgagctgggg aagagcccc ttaccacta caccatcttc 1860
 tggaccaacg ctcagaacca gtccttctcc gccatcctga atgcctcctc ccgtggcttt 1920
 gtctccatg gcctggagcc cgccagtctg tatcacatcc acctcatggc tgccagccag 1980
 gctggggcca ccaacagtac agtcctcacc ctgatgacct tgaccccaga ggggtcggag 2040
 ctacacatca tcctgggcct gttcggcctc ctgctgttgc tcacctgcct ctgtggaact 2100
 20 gcctggctct gttgcagccc caacaggaag aatccccctt ggccaagtgt cccagacca 2160
 gctcacagca gcctgggctc ctgggtgccc acaatcatgg aggaggatgc cttccagctg 2220
 cccggccttg gcacgccacc catcaccaag ctcacagtgc tggaggagga tgaaaagaag 2280
 ccggtgccct gggagtcca taacagctca gagacctgtg gcctccccac tctggtccag 2340
 acctatgtgc tccaggggga cccaagagca gttccacc agcccacatc ccagtctggc 2400
 25 accagcgatc aggtccttta tgggcagctg ctgggcagcc ccacaagccc agggccaggg 2460
 cactatctcc gctgtgactc cactcagccc ctcttgccgg gcctcacc cagccccaaag 2520
 tcctatgaga acctctggtt ccaggccagc cccttgggga ccctggtaac cccagcccca 2580
 agccaggagg acgactgtgt ctttgggcca ctgctcaact tccccctcct gcaggggatc 2640
 cgggtccatg ggatggaggc gctggggagc ttctagggct tcctgggggt cccttcttgg 2700
 30 gcctgccttt taaaggcctg agctagctgg agaagagggg aggggtccata agcccatgac 2760
 taaaaactac cccagcccag gctctcacca tctccagtca ccagcatctc cctctcctcc 2820
 caatctccat aggctgggcc tcccaggcga tctgcatact ttaaggacca gatcatgctc 2880
 catccagccc cacccaatgg ccttttgtgc ttgtttccta taacttcagt att 2933

35 <210> 10
 <211> 836
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 10
 Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile
 40 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Pro Gly ser Leu Glu Glu cys Gly His Ile ser val ser

ES 2 368 092 T3

20 25 30
 Ala Pro Ile val His Leu Gly Asp Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile
 35 40 45
 Lys Gln Asn cys Ser His Leu Asp Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg
 5 50 55 60
 Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp
 65 70 75 80
 Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln
 85 90 95
 10 Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn Trp Gly Asn Ser Leu Gin Ile Leu
 100 105 110
 Asp Gln val Glu Leu Arg Ala Gly Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn
 115 120 125
 Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp
 15 130 135 140
 Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser
 145 150 155 160
 Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp
 165 170 175
 20 cys val Pro Lys Asp Gly Gln Ser His Cys Cys Ile Pro Arg Lys His
 180 185 190
 Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala
 195 200 205
 Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val
 25 210 215 220
 Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu
 225 230 235 240
 Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp
 245 250 255
 30 Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro
 260 265 270
 Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu
 275 280 285
 Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr
 35 290 295 300
 Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp
 305 310 315 320
 Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val
 325 330 335
 40 Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gin Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val
 340 345 350
 Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile
 355 360 365

ES 2 368 092 T3

Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile
 370 375 380
 Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro
 385 390 395 400
 5 Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr
 405 410 415
 Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu
 420 425 430
 Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly
 10 435 440 445
 Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly
 450 455 460
 Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu
 465 470 475 480
 15 Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro
 485 490 495
 Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met
 500 505 510
 Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser
 20 515 520 525
 His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln
 530 535 540
 Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 25 His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala
 565 570 575
 Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro
 580 585 590
 Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala
 30 595 600 605
 Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser
 610 615 620
 Glu Leu His Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr
 625 630 635 640
 35 Cys Leu Cys Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys Ser Pro Asn Arg Lys Asn
 645 650 655
 Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala His Ser Ser Leu Gly Ser
 660 665 670
 Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala Phe Gln Leu Pro Gly Leu
 40 675 680 685
 Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Glu Asp Glu Lys
 690 695 700

ES 2 368 092 T3

Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser Ser Glu Thr Cys Gly Leu
 705 710 715 720
 Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln Gly Asp Pro Arg Ala Val
 725 730 735
 5 ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gly Thr Ser Asp Gln Val Leu Tyr
 740 745 750
 Gly Gln Leu Leu Gly Ser Pro Thr Ser Pro Gly Pro Gly His Tyr Leu
 755 760 765
 Arg Cys Asp Ser Thr Gln Pro Leu Leu Ala Gly Leu Thr Pro Ser Pro
 10 770 775 780
 Lys Ser Tyr Glu Asn Leu Trp Phe Gln Ala Ser Pro Leu Gly Thr Leu
 785 790 795 800
 Val Thr Pro Ala Pro Ser Gln Glu Asp Asp Cys Val Phe Gly Pro Leu
 805 810 815
 15 Leu Asn Phe Pro Leu Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly Met Glu Ala
 820 825 830
 Leu Gly Ser Phe
 835
 20 <210> 11
 <211> 288
 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 <400> 11
 gagtgcgggc acatcagtgt ctcagccccc atcgtccacc tgggggatcc catcacagcc 60
 25 tcttgcacat tcaagcagaa ctgcagccat ctggaccctg agccacagat tctgtggaga 120
 ctgggagcag agcttcagcc cgggggcagg cagcagcgtc tgtctgatgg gaccaggaa 180
 tctatcatca ccctgcccc cctcaaccac actcaggcct ttctctcctg ctgcctgaac 240
 tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc gcgcaggc 288
 30 <210> 12
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 12
 35 Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
 1 5 10 15
 Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
 20 25 30
 40 Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
 35 40 45
 Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr
 50 55 60

ES 2 368 092 T3

Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn
 65 70 75 80

Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly
 85 90 95

5 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> sCSF3R-F1

<400> 13
 atggcaaggc tgggaaactg 20

15 <210> 14
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> sCSF3R-R1

<400> 14

Thr Thr Thr Ala Gly Thr Ala Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

25 Thr Thr Thr Cys Gly
 20

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> sCSF3R-F1 anidado

<400> 15
 acttgggctg ccctgatcat cc 22

35 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial

40 <220>
 <223> scFS3R-R1 anidado

<400> 16
 tggccaggct gatcatgaac tc 22

45 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> scFS3R-EX1

50 <400> 17
 gaaactgcag cctgacttgg gctgccctga tca 33

<210> 18

ES 2 368 092 T3

<211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> sCSF3R-EX2

<400> 18
 gaggcggggt ttcgccttgc tggccaggct gatcatgaac 40

10 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> sCSF3R-EX3

15 <400> 19
 atggcaaggc tgggaaactg cagcctgact t 31

20 <210> 20
 <211> 38
 <212>ADN
 <213>artificial

<220>
 <223> sCSF3R-EX4

25 <400> 20
 atttttttgt attttttagta gaggcggggt ttcgcctt 38

30 <210> 21
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> sCSF3R-EX5

35 <400> 21
 gcaggcttcg ccaccatggc aaggctggga aactg 35

<210> 22
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial

40 <220>
 <223> 5CSF3R-EX6

<400> 22
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgccacc 37

45 <210> 23
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial

50 <220>
 <223> GCP sentido
 <400> 23
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgccacc 37

<210> 24
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> GCP Inverso

<400> 24
 ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtt tcaatggtga tggatgatggt g 51

10 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> pEAK12F

<400> 25
 gccagcttgg cacttgatgt 20

20 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> pEAK12R

25 <400> 26
 gatggaggtg gacgtgtcag 20

<210> 27

<211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> 21M13

<400> 27
 tgtaaaacga cggccagt 18

35 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial

40 <220>
 <223> M13REV

<400> 28
 caggaaacag ctatgacc 18

45 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial

50 <220>
 <223> T7

<400> 29
taatacgact cactatagg 19

5 <210> 30
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> T3

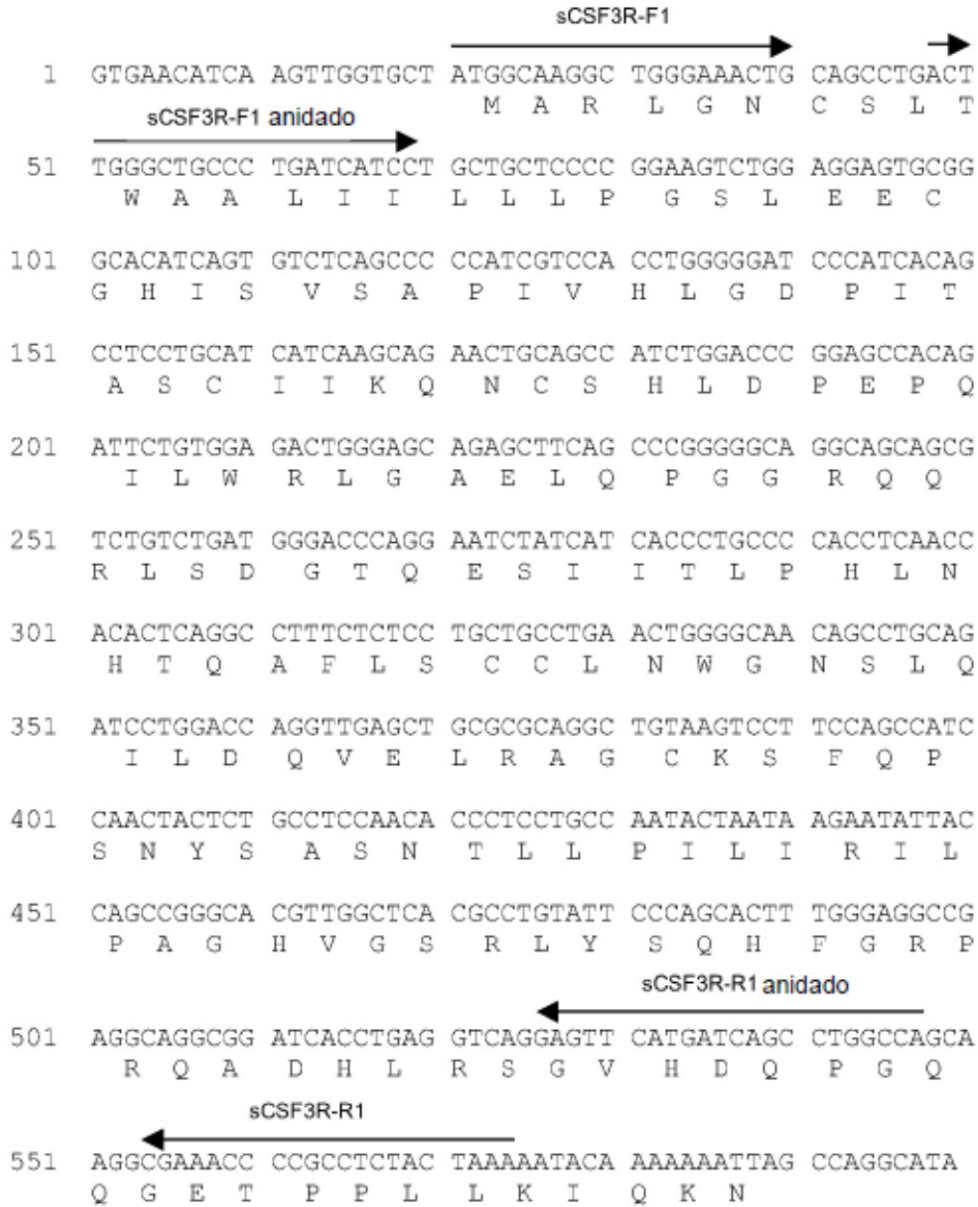
10 <400> 30
attaaccctc actaaagg 18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante del polipéptido aislado soluble del CSF3R, donde dicha variante de polipéptido comprende o consiste en una secuencia de un dominio de unión al ligando, carece de dominio funcional transmembrana y carece de dominio citoplasmático, donde dicho dominio de unión al ligando es un dominio tipo inmunoglobulina del CSF3R, donde dichos polipéptidos incluyen además a continuación del dominio tipo inmunoglobulina los residuos de aminoácidos 97-165 de la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de al menos 50 aminoácidos de los residuos de aminoácidos 97-165 de la SEQ ID NO: 4 y
- 10 donde dichos polipéptidos retienen la habilidad de unir los ligandos naturales del CSF3R y están caracterizados además por que la variante del polipéptido soluble aislado del CSF3R se selecciona de la SEQ ID NO: 2, una forma madura de la SEQ ID NO: 2, una forma glicosilada de la SEQ ID NO: 2, una forma pegilada de la SEQ ID NO: 2 o un equivalente funcional de la SEQ ID NO: 2, donde el equivalente funcional tiene al menos más de un 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 2
- 15 2. La variante del polipéptido aislado soluble del CSF3R de la reivindicación 1, donde dicha forma madura es la SEQ ID NO: 4.
- 20 3. La variante del polipéptido aislado soluble del CSF3R de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que la variante es una variante soluble de origen natural.
4. La variante del polipéptido aislado soluble del CSF3R de conformidad con la reivindicación 2, donde dicha variante se selecciona de su forma su forma glicosilada, su forma pegilada o su equivalente funcional, donde el equivalente funcional tiene al menos un 75% de identidad, preferentemente al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 4.
- 25 5. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido soluble del CSF3R de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ligado operativamente a un dominio de aminoácido adicional.
- 30 6. La proteína de fusión de la reivindicación 5, donde dicho dominio adicional de aminoácidos comprende un péptido señal, un marcador, un péptido dirigido, el dominio constante de una inmunoglobulina, un dominio de multidimerización o su proteína biológicamente activa o un fragmento de esta.
- 35 7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, que comprende un polipéptido del CSF3R de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ligado operativamente al dominio constante de una inmunoglobulina.
- 40 8. Un conjugado que comprende un polipéptido del CSF3R de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
9. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 10. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9 que es una molécula de ADNc.
11. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1, SEQ 10 NO: 3, SEQ 10 NO: 5, SEQ 10 NO: 7, o una hebra complementaria o su secuencia degenerada.
- 50 12. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
- 55 13. Una célula huésped recombinante, donde dicha célula comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o un vector de la reivindicación 12.
14. La célula huésped de la reivindicación 13, que expresa un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 60 15. La célula huésped de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que es una célula procariota o eucariota.

- 5
16. Un método para producir un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, método que comprende cultivar una célula huésped recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 en condiciones que permiten la expresión de la molécula de ácido nucleico y recuperar el polipéptido producido.
17. Una composición farmacéutica que comprende una variante de polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, un conjugado de la reivindicación 8 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1



→ Posición y sentido de los cebadores PCR

2/3

Figura 2

```

1  ACTTGGGCTG CCCTGATCAT CCTGCTGCTC CCCGGAAGTC TGGAGGAGTG
   T W A A L I I L L L P G S L E E
51  CGGGCACATC AGTGTCTCAG CCCCATCGT CCACCTGGGG GATCCCATCA
   C G H I S V S A P I V H L G D P I
101 CAGCCTCCTG CATCATCAAG CAGAACTGCA GCCATCTGGA CCCGGAGCCA
   T A S C I I K Q N C S H L D P E P
151 CAGATTCTGT GGAGACTGGG AGCAGAGCTT CAGCCCAGGG GCAGGCAGCA
   Q I L W R L G A E L Q P G G R Q
201 GCGTCTGTCT GATGGGACCC AGGAATCTAT CATCACCTTG CCCCACCTCA
   Q R L S D G T Q E S I I T L P H L
251 ACCACACTCA GGCCTTTCTC TCCTGCTGCC TGAAGTGGGG CAACAGCCTG
   N H T Q A F L S C C L N W G N S L
301 CAGATCCTGG ACCAGGTTGA GCTGCGCGCA GGCTGTAAGT CCTTCCAGCC
   Q I L D Q V E L R A G C K S F Q
351 ATCCAACACTAC TCTGCCTCCA ACACCCTCCT GCCAATACTA ATAAGAATAT
   P S N Y S A S N T L L P I L I R I
401 TACCAGCCGG GCACGTTGGC TCACGCCTGT ATTCCCAGCA CTTTGGGAGG
   L P A G H V G S R L Y S Q H F G R
451 CCGAGGCAGG CGGATCACCT GAGGTCAGGA GTTCATGATC AGCCTGGCCA
   P R Q A D H L R S G V H D Q P G

```