

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 307 502**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **00921181 .4**

⑯ Fecha de presentación : **19.04.2000**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1086137**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2001**

⑭ Título: **Composición y procedimiento para modular la interacción entre células dentríficas y linfocitos T.**

⑩ Prioridad: **19.04.1999 EP 99201204**
20.01.2000 US 176924 P

⑬ Titular/es: **Katholieke Universiteit Nijmegen**
Philips van Leydenlaan 25
6525 EX Nijmegen, NL

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

⑭ Inventor/es: **Figgdr, Carl, Gustav;**
Geijtenbeek, Teunis, Bernard, Herman;
Van Kooyk, Yvette y
Torensma, Ruurd

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

⑬ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Composición y procedimiento para modular la interacción entre células dendríticas y linfocitos T.

5 La presente invención se refiere a composiciones y a su utilización para reducir la respuesta inmune en un animal, tal como el hombre u otro mamífero.

10 En una forma de realización, la invención se refiere a composiciones y a su utilización para reducir la adhesión de las células dendríticas a los linfocitos T.

15 Más específicamente, esta forma de realización de la invención se refiere a composiciones y a su utilización para reducir la adhesión de receptores de lectina tipo C en la superficie de las células dendríticas a los receptores ICAM en la superficie de los linfocitos T. Modulando esta adhesión, ambas interacciones células dendríticas-linfocitos T, tal como la y la presentación antigenica, así como, por ejemplo, las respuestas primarias de los linfocitos T dependientes de ellas, pueden verse influenciadas, dando lugar a una modulación de la respuesta inmunitaria.

20 Las composiciones de la invención pueden por tanto utilizarse para alterar las respuestas inmunes a antígenos específicos, así como las respuestas inmunes producidas por trastornos del sistema inmunitario, tal como puede darse en las enfermedades autoinmunes o en las alergias.

25 En otra forma de realización, el procedimiento de la invención puede utilizarse además en el tratamiento de las infecciones por el VIH y trastornos similares del sistema inmune, así como para modular la respuesta inmune a injertos o después de trasplantes.

30 La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la adhesión de las células dendríticas a los linfocitos T está mediada por un receptor lectina de tipo C en la superficie de las células dendríticas. Asimismo, se ha encontrado que esta lectina de tipo C se une a receptores ICAM en la superficie de los linfocitos T. Con el término "receptor(es) ICAM" se quieren significar ambos receptores, el ICAM-2 y el ICAM-3, en particular el receptor ICAM-3.

35 La invención se basa además en el hallazgo de que la inhibición de este receptor de lectina tipo C en las células dendríticas por anticuerpos específicos dirigidos contra el receptor de lectina tipo C puede modular, y más específicamente reducir, la adhesión de los linfocitos T a las células dendríticas, pudiendo por tanto influenciar la respuesta inmune, en particular sus estados iniciales.

40 El documento WO 96/23882 da a conocer un receptor murino y humano con dominios de lectinas de tipo C que se expresa abundantemente en la superficie de células dendríticas y células epiteliales tímicas. El receptor murino -denominado "DEC-205"- se describe como una proteína de 295 kDa con un punto isoeléctrico de aproximadamente 7,5 que contiene 10 dominios de lectina de tipo C y que es homólogo al receptor macrofágico de la manosa (MMR).

45 El documento WO 96/23882 describe además anticuerpos monoclonales y policlonales contra DEC-205. Sin embargo, estos anticuerpos no pudieron bloquear la función de las células dendríticas. En particular, los anticuerpos monoclonales y policlonales anti-DEC-205 no pudieron inhibir la interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T auxiliadores, tanto *in vitro* (tal como se determinó por la incapacidad de los anti-DEC-205 para inhibir la proliferación de los linfocitos T alogénicos en una reacción leucocitaria mezclada de sentido único) como *in vivo* (tal como se determinó por la incapacidad de anti-DEC-205 para inhibir una respuesta *in vivo*, es decir, en una reacción injerto local- con respecto a un huésped (GVH). Estos resultados sugieren que el receptor DEC-205 no está implicado en la interacción célula dendrítica-linfocito T (es decir, la adhesión), y que los anticuerpos anti-DEC-205 no pueden utilizarse para modular la respuesta inmune.

50 Curtis *et al*, en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992), páginas 8356-8360, así como en el documento WO 93/01820, describe un receptor gp 120 no-CD4 aislado y clonado a partir del tejido de la placenta humana. Este receptor gp 120 se expresa en células de mamíferos que no exhiben altos niveles de CD4, tales como la placenta, músculo esquelético, cerebro, células neurales y mucosas, así como otros tejidos y células que incluyen colon, timo, corazón, linfocitos T, linfocitos B y macrófagos (pero no en el hígado o en el riñón). La secuencia aminoácida del receptor gp 120 de lectina de tipo C que se da a conocer en las SEC ID nº 1 y 2 de WO 93/01820 posee un alto grado de homología secuencial (>98%) con las lectinas de tipo C que se encuentran ahora presentes en las células dendríticas.

55 Curtis y WO 93/01820 consideran además la función que este receptor de lectina de tipo C juega en la infección de las células/tejidos mencionados anteriormente con el VIH, es decir, mediante la unión de la glicoproteína gp 120 de la envuelta principal del VIH antes de la internalización del virión en la célula. Se descubrió que la inhibición del receptor gp 120 de lectina de tipo C puede reducir o inhibir la infección por el VIH de estas células o tejidos. Como inhibidores apropiados, WO 93/01820 da a conocer hidratos de carbono de manosa, carbohidratos de fucosa, lectinas de plantas tales como concanavalina A, antibióticos específicos tales como pradimicina A, y azúcares tales como N-acetil-D-glucosamina y galactosa (que, sin embargo, se describen como menos potentes). Estos compuestos y las composiciones que los contienen se utilizan *in vitro* o *in vivo* para inhibir la unión del VIH a la superficie celular.

WO 93/01820 da a conocer además que la unión del VIH a las células COS-7 puede inhibirse mediante la preincubación de gp 120 con un anticuerpo monoclonal anti-gp 120 (denominado “anticuerpo 110.1”). Sin embargo, este anticuerpo no se dirige contra las lectinas de tipo C, sino contra la proteína gp 120.

5 Sin embargo, ni Curtis ni WO 93/01820 mencionan o sugieren la presencia de dicha lectina de tipo C en las células dendríticas, ni estas referencias mencionan o sugieren su función en la interacción de la célula dendrítica-linfocito T durante las etapas iniciales de una respuesta inmune.

10 WO 95/32734 describe composiciones puente (o de la reticulación) Fc_YRII (CD32) y su utilización para modular la respuesta inmune para antígenos específicos. Esta referencia está basada en el hallazgo de que la reticulación de las moléculas Fc_YRII (CD32) sobre las células presentadoras de antígenos (APC) afecta la expresión de las moléculas B7-1/2 coestimuladoras esenciales (es decir, evita su aumento regulado) y perjudica de ese modo la expresión de (es decir, provoca la disminución de la modulación de) la molécula de adhesión ICAM-3, con la consecuencia funcional de una afectación de la capacidad de los monocitos para coestimular la activación de los linfocitos T antígeno-específicos (es decir, dando lugar a la modulación de la insensibilidad de los linfocitos T antígeno específicos). El agente de reticulación se selecciona de entre moléculas IgG humanas agregadas o de sus fragmentos Fc; de anticuerpos monoclonales bi- o multivalentes para Fc_YRII o sus fragmentos; o de una fusión de dos o más partes de IgG Fc humanas.

15 El documento WO 95/32734 se dirige, por tanto, a la modulación (por ejemplo, inhibición) de la señal de coestimulación necesaria para la activación de los linfocitos T (además de la señal primaria de la interacción TcR/CD3), en particular para inducir la proliferación y maduración en las células efectoras. WO 95/32734 no se dirige a modular la adhesión de las células dendríticas-linfocitos T, ni da a conocer o sugiere la presencia de lectinas del tipo C en (la superficie de) las células dendríticas o su interacción con los receptores ICAM-3 en los linfocitos T.

20 25 El documento WO 98/02456 da a conocer un grupo de lectinas de tipo C II humano, aislado a partir de una biblioteca de macrófagos humanos estimulados. El documento WO 98/49306 da a conocer un grupo IV de lectinas de tipo C que se encuentran en proteínas asociadas a la pancreatitis humana (“PAP”). El documento WO 98/41633 da a conocer un grupo V de lectinas humanas de tipo C aisladas de un clon tumoral humano.

30 35 Los documentos WO 98/02456, WO 98/49306 y WO 98/41633 dan a conocer además procedimientos para producir anticuerpos contra estas lectinas de tipo C.

35 Sin embargo, ninguna de estas referencias se refiere a lectinas de tipo C en células dendríticas; las lectinas de tipo C que se dan a conocer en estas referencias, difieren de las lectinas de tipo C que se describen allí respecto al origen, en su función biológica, y en su estructura.

40 45 Las células dendríticas (DC) son células profesionales presentadoras de antígenos que capturan a éstos en los tejidos periféricos y migran mediante la linfa o la sangre al área de los linfocitos T de los nódulos linfáticos de drenaje y del bazo. Aquí presentan los antígenos procesados a los linfocitos T indiferenciados, iniciando respuestas antígeno-específicas primarias de los linfocitos T.

50 55 Debido a su posición en la superficie del organismo como células de inmunovigilancia, es probable que las DC sean las primeras células que se infecten con el VIH-1 después de la exposición de las mucosas y que estén implicadas, por tanto, en desempeñar una función importante en la inmunopatogénesis del VIH. Se cree generalmente ahora que el VIH transforma el proceso normal de tráfico de DC para poder penetrar en los nódulos linfáticos y acceder a las células CD4+ T, tal como se ha demostrado *in vivo* utilizando, como sistema modelo, la infección del macaco mediante el virus de la inmunodeficiencia simia primaria (Spira *et al.*, 1996) (Joag *et al.*, 1997). Varios investigadores han informado de la infección productora de DC con VIH-1 (Granelli-Piperno *et al.*, J. Virol 72(4), 2733-7, 1998) (Blauvelt *et al.*, Nat Med 3(12), 1369-75, 1997), y existe una evidencia sustancial que indica que las DC (sometidas a impulsos con el VIH-1 *in vitro*, pueden inducir una intensa infección cuando se cocultivan con linfocitos T (Cameron *et al.*, Science 257(5068), 383-7, 1992). Aunque no está todavía claro si una escena similar tiene lugar en los individuos infectados con el VIH-1, la transmisión del VIH-1 desde DC a los linfocitos T podría contribuir al vaciamiento observado de las células CD4+ T que se observa en el SIDA. El estudio de las interacciones VIH-DC podría contribuir al conocimiento de los eventos tempranos de la infección por VIH, y conduciría esperanzadamente a estrategias dirigidas a bloquear los eventos tempranos en la transmisión. Para ulteriores consideraciones, se hace referencia, asimismo, en WO 95/32734 y WO 96/23882.

60 65 Las DC son únicas en su capacidad para interaccionar con y activar los linfocitos T en reposo. Sin embargo, anteriormente a la presente invención, fue ampliamente desconocido cómo el contacto células DC-T es iniciado y regulado. En la presente memoria, se investiga la función de ICAM-3 en las interacciones celulares DC-T. Se ha demostrado que, aunque las DC se adhieren intensamente a ICAM-3, esta adhesión no es mediada por LFA-1, α D o cualquier otra integrina. En la búsqueda de este nuevo receptor ICAM-3 en DC, se clonó un receptor de lectina de tipo C, denominado DC-SIGN, que se expresa preferentemente por DC. Además de su función prominente en el agrupamiento de las células DC-T y del inicio de las respuestas de los linfocitos T, descubrimos que DC-SIGN constituye un receptor importante de VIH-1 implicado en la infección de DC y subsiguientemente en la transmisión del VIH-1 a los linfocitos T. De este modo, el VIH-1 y los linfocitos T en reposo explotan un receptor similar que se expresa intensamente para interaccionar con DC.

ES 2 307 502 T3

En un primer aspecto, la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo que se une al receptor denominado DC-SIGN en la superficie de una célula dendrítica, y que se representa como SEC ID nº 2 o una variante natural o un fragmento suyo, en la preparación de un medicamento para reducir una respuesta inmune en un animal, en el que dicho anticuerpo inhibe la interacción entre una célula dendrítica y un linfocito T.

5 En particular, el anticuerpo puede reducir la adhesión entre una célula dendrítica y un linfocito T.

Especialmente, el anticuerpo puede reducir la adhesión entre DC-SIGN en la superficie de una célula dendrítica y un receptor ICAM en la superficie de un linfocito T.

10 La secuencia aminoácida de una lectina de tipo C denominada DC-SIGN que se encontró que estaba implicada en la unión de las células dendríticas a los linfocitos T, se muestra en SEC ID nº 1 y en la figura 9. Este receptor de lectina de tipo C es esencialmente similar al receptor gp 120 de la lectina de tipo C, descrito por Curtis *et al* en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), páginas 8356-8360 y en el documento WO 93/01820. En particular, presenta un alto grado de homología (< 98%) con la secuencia aminoácida que se aprecia en SEC ID nº 1 de WO 93/01820. Es un grupo II de lectina de tipo C de 404 aminoácidos, con un Mr aparente de aproximadamente 44 kDa; y con un primer dominio (Met 1 a Ala 76) que comprende un extremo amino citoplásico, un segundo dominio (Ile 77 a Val 249) que comprende repeticiones en tandem, y un tercer dominio (Cys 253 a Ala 404) con un alto grado de homología para otras lectinas conocidas de tipo C que constituyen proteínas de membrana de tipo II. A continuación, se proporciona una caracterización posterior.

20 En la invención, se encontró que la lectina de tipo C en las células dendríticas se unía a los receptores ICAM en la superficie de los linfocitos T.

25 De acuerdo con esto, las composiciones de la invención pueden utilizarse para modular (es decir, alterar y/o modificar) y, más específicamente, inhibir (es decir, reducir y/o afinar) las interacciones entre las células dendríticas y los linfocitos T.

30 Dichas interacciones incluyen la adhesión de los linfocitos T a las células dendríticas, por ejemplo, en la agrupación de células dendríticas-linfocitos T, la activación de los linfocitos T y además, incluyen todas las interacciones que se basan en el contacto entre las células dendríticas y los linfocitos T, lo que pretende hacer referencia al contacto directo célula a célula, o la proximidad de las células dendríticas y los linfocitos T.

35 Dichas otras interacciones incluyen, pero no se limitan a procedimientos implicados en generar una respuesta inmune, en particular durante las etapas iniciales de dicha respuesta, tal como la sensibilización/activación primaria de los linfocitos T (es decir, la presentación del antígeno y/o de los péptidos unidos a MHC a los linfocitos T) y la coestimulación de los linfocitos T; así como procesos tales como señalización química, endocitosis y transporte trans-epitelial. Para un debate en general de las interacciones células dendríticas-linfocitos T, todas las cuales pueden estar influenciadas por las composiciones de la invención, a continuación se hace referencia al debate, así como a los documentos WO 95/32734 y WO 96/23882.

40 Las composiciones de la invención pueden, por tanto, utilizarse para influenciar la capacidad inmunomoduladora de las células dendríticas; para modular, y en particular reducir, las respuestas de los linfocitos T (primarias) mediadas por las células dendríticas, y/o generalmente para influenciar, y en particular inhibir, el sistema inmune.

45 Algunas aplicaciones específicas incluyen la prevención o la inhibición de las respuestas inmunes a antígenos específicos; inducción de la tolerancia; inmunoterapia; inmunosupresión, por ejemplo para prevenir el rechazo al trasplante; el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como tiroiditis, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico (SLE); esclerosis múltiple y diabetes autoinmune; y la prevención o el tratamiento de las alergias.

50 Las composiciones de la invención pueden también modular la activación de otros receptores en los linfocitos T, que dependen de la adhesión o de la proximidad de las células dendríticas a los linfocitos T. Además, el hallazgo de la invención de que una lectina de tipo C en las células dendríticas se une a los receptores ICAM en los linfocitos T, puede hacer accesibles nuevas estrategias o posibilidades para influenciar la interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T, y de ese modo modular el sistema inmune en general.

55 Además, las composiciones de la invención pueden utilizarse para prevenir o reducir la transferencia de sustancias desde las células dendríticas a los linfocitos T, tales como sustancias químicas, factores de señalización tales como quimiocinas y/o interleucinas, etc., y en particular de partículas víricas tales como el VIH. De esta forma, utilizando las composiciones de la invención, no sólo puede inhibirse la adhesión inicial de NV a las células dendríticas, sino también la propagación de la infección por el VIH desde las células dendríticas a los linfocitos T.

60 Este hallazgo es de particular importancia, pues se cree que las células dendríticas pueden servir como una "reserva" del VIH, en particular durante las etapas iniciales de la infección MV. Las composiciones de la invención pueden, por tanto, no sólo utilizarse para prevenir la infección por VIH de las células dendríticas, sino también para reducir la propagación de la infección por el VIH a los linfocitos T después de que las células dendríticas hayan sido infectadas, retardando, por lo tanto, el proceso de la enfermedad.

ES 2 307 502 T3

Asimismo, se sabe que la activación de los linfocitos T -a saber, en las glándulas linfáticas-, desempeña un papel importante en el desarrollo del SIDA en un paciente infectado con el VIH. Se cree que las composiciones de la invención pueden utilizarse para prevenir, inhibir o por lo menos, retrasar, dicha activación de los linfocitos T y, por tanto, ralentizar el comienzo y/ el progreso de la enfermedad.

5 Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere además a la utilización de un anticuerpo que se une al receptor denominado DC-SIGN, en la superficie de una célula dendrítica y que está representado como SEC ID nº 2 o una variante natural o fragmento suyo, en la preparación de un medicamento para inhibir la adhesión de la proteína superficial del VIH (es decir, gp 120) a la superficie de una célula dendrítica y por tanto, la entrada del VIH en dicha célula dendrítica.

10 Los compuestos que pueden utilizarse como inhibidores para las lectinas del tipo C, son conocidos *per se*, incluyendo los que se describen en el documento WO 93/01820, como se ha mencionado anteriormente.

15 En general, estos son compuestos que pueden unirse o adherirse a (por ejemplo, de forma reversible) o que pueden servir como un ligando para las lectinas de tipo C, en particular la lectina de tipo C de SEC ID nº 1/figura 9, o variantes naturales o equivalentes suyos. Ejemplos son carbohidratos de manosa, tales como el manano y la D-manaosa, los carbohidratos de fucosa tales como la L-fucosa; las lectinas vegetales tales como la concanavalina A; antibióticos tales como la pradimicina A; azúcares como la N-acetil-D-glucosamina y la galactosa (que sin embargo son descritos como menos potentes); así como compuestos peptidomiméticos apropiados y pequeñas moléculas medicamentosas, que pueden identificarse, por ejemplo, utilizando técnicas de visualización fágica. Además, pueden utilizarse proteínas tales como gp 120 y análogos o fragmentos suyos, o proteínas similares con capacidad de unión a lectinas de tipo C en células dendríticas, así como receptores-ICAM aislados y análogos suyos, incluyendo parte o sus fragmentos. Dichas partes o fragmentos deberán entonces ser todavía tales que puedan unirse a las lectinas de tipo C en la superficie de las células dendríticas.

20 Sin embargo, la utilización de carbohidratos se desea menos habitualmente desde un punto de vista terapéutico, pues pueden ser metabolizados rápidamente *in vivo*. Asimismo, la utilización de lectinas vegetales tal como la concanavalina A y el antibiótico pradimicina pueden presentar desventajas en una posición terapéutica, en particular cuando se tratan pacientes con trastornos autoinmunes y/o infecciones HN.

25 Pueden utilizarse uno o más compuestos fisiológicos tolerables y/o farmacéuticamente aceptables, tales como se definen en el documento WO 93/01820. Por ejemplo, la utilización de gp 120 o sus derivados puede provocar efectos secundarios indeseables, en particular sobre el sistema nervioso (véase el documento WO 93/01820).

30 35 Al contrario, según la invención, se utiliza un anticuerpo dirigido contra DC-SIGN como presente/expresado en la superficie de una célula dendrítica, o una parte, segmento o epítopo suyo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término anticuerpo incluye entre otros, anticuerpos policlónicos, monoclonales, químicos y de cadena única, así como fragmentos (Fab, Fv, Fa) y una biblioteca de expresión Fab. Además, pueden utilizarse anticuerpos "humanizados", por ejemplo tal como se describe en el documento WO 98/49306.

40 45 Dichos anticuerpos contra DC-SIGN de la invención, pueden obtenerse tal como se describe a continuación en la presente memoria o en cualquier otra de las maneras conocidas *per se*, tal como las que se describen en los documentos WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 y/o WO 98/49306.

50 55 Por ejemplo, los anticuerpos policlónicos pueden obtenerse inmunizando un huésped apropiado tal como una cabra, un conejo, una oveja, una rata, un cerdo o un ratón con DC-SIGN o una porción inmunogénica, fragmento o fusión suyos, utilizando, opcionalmente, un portador inmunogénico (tal como la albúmina sérica bovina o la hemocianina de lapa) y/o un adyuvante tal como el de Freund, saponina, ISCOM, hidróxido de aluminio o un gel mineral similar, o la hemocianina de lapa, o una sustancia activa superficial similar. Después de que se produjera una respuesta inmunológica contra DC-SIGN (entre 1 y 7 días habitualmente), pueden aislarse los anticuerpos a partir de la sangre o del suero extraídos del animal inmunizado de una forma conocida *per se*, que puede implicar opcionalmente una etapa de rastreo del anticuerpo con las propiedades deseadas (es decir, especificidad), utilizando técnicas conocidas de inmunoensayo, para las cuales se hace otra vez referencia a, por ejemplo, el documento WO 96/23882.

60 65 Los anticuerpos monoclonales pueden producirse utilizando progenies celulares continuas en cultivo, que incluyen hibridomas y técnicas similares, otra vez esencialmente tal como se describe en las referencias citadas anteriormente.

Fragments Fab tales como F(ab)₂, Fab' y Fab pueden obtenerse mediante la digestión de un anticuerpo con papaína u otra proteasa, la reducción de enlaces disulfuro y el tratamiento con papaína y un agente reductor, respectivamente. Las bibliotecas de expresión Fab pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el procedimiento de Huse *et al*, 1989, Science, 245: 1275-1281.

70 75 Preferentemente, se utiliza un anticuerpo monoclonal contra DC-SIGN en las células dendríticas, más específicamente contra el péptido con la secuencia aminoácida que se muestra en/y codificada por SEC ID nº 1 y 2 y figura 9 o una parte (antigénica) suya; constituyendo dichos anticuerpos monoclonales otro aspecto de la invención. En la memoria a continuación la invención se ilustrará mediante dos de dichos monoclonales, a los que se hará referencia como AZN-1 y AZN-2, aunque pueden utilizarse también monoclonales similares con una especificidad comparable para DC-SIGN.

En otro aspecto, la invención proporciona una progenie celular tal como un hibridoma que produce anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, contra DC-SIGN en las células dendríticas, más específicamente contra el péptido con la secuencia aminoácida que se muestra en/codificada por SEC ID nº 1 y 2 y en la figura 9 o una parte (antigénica) suya. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales AZN-1 y AZN-2 de la invención, se depositaron el 8 de abril de 1999, con la European Collection of Cell Cultures, con los números de registro EGACC (provisionales) de registro 990400818 y 99040819, respectivamente.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para producir un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, contra DC-SIGN en las células dendríticas, más específicamente contra el péptido con la secuencia aminoácida que se muestra en (o codificada) por SEC ID nº 1 y 2 y en la figura 9 o una parte (antigénica) suya, comprendiendo dicho procedimiento el cultivo de una célula o de una progenie celular que produce dicho anticuerpo y recuperar/aislar el anticuerpo a partir del cultivo celular.

Ni los anticuerpos (monoclonales) contra DC-SIGN en las células dendríticas, ni las células o las progenies celulares que producen dichos anticuerpos, se han descrito en la técnica hasta la fecha, y se prevé que los nuevos anticuerpos de la invención tendrán una amplia aplicabilidad (es decir, además de la utilización farmacéutica/terapéutica dada a conocer en la presente memoria). Algunas de estas aplicaciones -que forman todavía otro aspecto de la invención- resultarán evidentes para el experto en la materia, a partir de la exposición de la presente memoria.

Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para detectar la presencia de (y por tanto, determinar la expresión de) DC-SIGN en o sobre los tejidos de la totalidad de las células, así como detectar la presencia de DC-SIGN en otras muestras biológicas tales como fragmentos celulares o en preparaciones celulares. La información así obtenida puede entonces (también) utilizarse para determinar si el procedimiento o las composiciones de la invención pueden aplicarse a dichos tejidos o células. Los anticuerpos de la invención podrían utilizarse asimismo para detectar (cuantitativamente y/o cualitativamente), aislar, purificar y/o producir células dendríticas, por ejemplo en/o a partir de muestras biológicas, incluyendo líquidos biológicos tales como sangre, plasma o líquido linfático; muestras de tejidos o muestras celulares tales como médula ósea, tejido dérmico, tejidos tumorales, etc; o cultivos celulares o medios de cultivo.

Por ejemplo, los escasos procedimientos que están disponibles actualmente para el aislamiento/producción de células dendríticas a partir de muestras biológicas -tales como el procedimiento que se describe en el documento US-A-5.643.786, que comprende leucocitaféresis seguido por clasificación celular activada por fluorescencia-, es muy pesado, con muchas etapas, que proporciona sólo bajos rendimientos y muestras heterogéneas. Como resultado, la disponibilidad limitada de las células dendríticas ha dificultado severamente la investigación en este importante tipo de células.

Utilizando los anticuerpos monoclonales de la invención, se pudieron aislar y producir con un rendimiento mayor las células dendríticas y con una alta especificidad. En dicho procedimiento, los anticuerpos monoclonales podrían utilizarse de una forma conocida *per se* para la recolección, aislamiento y/o purificación de las células a partir de los líquidos biológicos utilizando anticuerpos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales podrían unirse a una columna o matriz, a perlas (para)magnéticas, o a un soporte sólido similar, que podría entonces ponerse en contacto con una muestra biológica o medio de cultivo que contuviera las células dendríticas. Las células que no se unieran ellas mismas al portador, se separarían entonces o se eliminarían - por ejemplo, mediante lavado, después del cual las células dendríticas se separarían del portador y se aislarían de una forma conocida *per se*.

Asimismo, los anticuerpos monoclonales de la invención podrían utilizarse para detectar/determinar la presencia de células dendríticas y/o DC-SIGN y/o la expresión de genes codificantes, por lo tanto, en muestras biológicas, en las que los anticuerpos podrían utilizarse otra vez de una forma conocida *per se* para el análisis de los anticuerpos, tal como ensayos de inhibición competitiva o inmunoensayos de tipo ELISA. Por ejemplo, los anticuerpos podrían utilizarse en combinación con técnicas de microscopía, técnicas de clasificación celular incluyendo la citometría de flujo y FACS, técnicas basadas en soportes sólidos y/o marcas detectables o marcadores (que podrían unirse a los anticuerpos), técnicas basadas en perlas (para)magnéticas o cualquier otra técnica de detección o ensayo conocido *per se*, en el cual pudieran utilizarse los anticuerpos. Dichos ensayos y equipos para ello -los cuales equipos, además de los anticuerpos de la invención, pueden contener *per se* todos los demás componentes conocidos para los ensayos basados en los anticuerpos, así como manuales, etc,- forman otro aspecto de la invención.

De este modo, los anticuerpos monoclonales de la invención constituyen una herramienta muy útil de investigación y diagnóstico, para utilizar tanto *in vitro* como *in vivo*. Campos posibles no limitantes de aplicación incluyen el estudio de las células dendríticas y sus funciones e interacciones; el estudio del sistema inmune; la detección de las células dendríticas y/o de DC-SIGN en las células, tejidos o líquidos biológicos tales como el tejido sinovial y el tejido dérmico/células dérmicas (células dendríticas dérmicas); así como el estudio del papel que las células dendríticas juegan en los procesos biológicos o en los mecanismos patológicos, tal como el cáncer (pues las células dendríticas son explotadas *in vivo* en ensayos clínicos para erradicar la formación y el desarrollo del tumor) y las enfermedades autoinmunes (incluyendo por ejemplo la artritis reumatoide).

Para una descripción posterior de los procedimientos y técnicas conocidos *per se*, en los que los anticuerpos de la invención pueden utilizarse, se hace referencia a los libros de texto generales, tales como D.P. Sites, A.I. Terr, T.G. Parslow, "Basic and clinical immunology", 8^a edición, Prentice-Hall (1994); I. Roitt, J. Brostoff, D. Male: "Immunology", 2^a edición., Churchill Livingstone (1994), incorporándose en su totalidad a la presente memoria como referencia. Se hace una referencia particular a la utilización general de anticuerpos y técnicas implicadas en la presente memoria, tal como se menciona en las secciones 2.7 a 2.17 del trabajo de referencia general realizado por Janeway-Travers "Immunobiology, the immune system in health and disease", tercera edición.

Una composición de la invención puede contener dos o más de los compuestos activos mencionados anteriormente o dichos compuestos pueden utilizarse en combinación. Por ejemplo, un anti-anticuerpo DC-SIGN puede formularse con carbohidratos de manosa o fucosa, lectinas y/antibióticos tales como la primamicina A, mediante el cual puede obtenerse un efecto sinérgico.

Las composiciones de la invención pueden contener asimismo o utilizarse en combinación con compuestos co-inhibidores conocidos, tales como anti-LF3A; así como otros principios activos conocidos *per se*, dependiendo de la situación que vaya a ser tratada. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden formularse o utilizarse en combinación con inmunosupresores (es decir, para prevenir el rechazo del trasplante), inmunomoduladores, antibióticos, autoantígenos o alérgenos (por ejemplo, tal como se describen en los documentos WO 95/3234 o WO 96/23882), el factor de necrosis tumoral (TNF), y agentes antivirales tales como agentes anti-VIH e inhibidores de CD4, incluyendo anticuerpos dirigidos contra CD4 tales como Leu-3A, por medio de los cuales pueden obtenerse otra vez un efecto sinérgico.

Las composiciones de la invención pueden además formularse utilizando portadores conocidos y/o adyuvantes para proporcionar una forma farmacéutica conocida *per se*, tal como un comprimido, cápsula, polvo, preparación liofilizada, solución para inyecciones, etc, preferentemente en una forma unitaria de dosificación. Dichas formas farmacéuticas, su utilización y administración (en forma de dosis única o multi), así como transportadores, excipientes, adyuvantes y/o formulantes para su utilización, se conocen generalmente en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/01820, WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 y/o WO 98/49306, incorporándose en su totalidad a la presente memoria como referencia. Además, la formulación puede ser en forma de liposoma, tal como se describe en el documento WO 93/01820.

Las formulaciones farmacéuticas de anticuerpos, su administración y/o utilización, se describen generalmente en los documentos WO 95/3274, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 y/o WO 98/49306.

Las composiciones de la invención pueden ulteriormente ser acondicionadas, por ejemplo, en viales, recipientes, saquitos, blísters, etc; opcionalmente, con folletos de información destacada de los pacientes y/o instrucciones de uso.

Las composiciones de la invención pueden utilizarse para la modulación de la respuesta inmune en un animal, en particular en el hombre o otro mamífero, administrando a dicho animal un anticuerpo que se une o puede unirse a un DC-SIGN en la superficie de una célula dendrítica, preferentemente en forma de una composición tal como la descrita anteriormente, en una cantidad suficiente para alterar o modificar una respuesta inmune.

El anticuerpo o composición se administra en particular en tal cantidad que las interacciones entre las células dendríticas y los linfocitos T están alteradas o modificadas, más en particular en tal cantidad que la adhesión de las células dendríticas a los linfocitos T se reduce.

Este procedimiento puede utilizarse para prevenir y/o tratar trastornos del sistema inmune, así como para prevenir el rechazo del trasplante, tal como se describe anteriormente.

La composición de la invención puede utilizarse para la prevención o tratamiento de las infecciones por VIH, administrando a un paciente infectado con el VIH, o a una persona con riesgo de infectarse por el VIH, un anticuerpo que pueda unirse o se una a DC-SIGN en la superficie de la célula dendrítica, en tal cantidad que la adhesión del VIH a las células dendríticas, y en particular de la proteína gp 120 de la envuelta de VIH para DC-SIGN en la superficie de las células dendríticas, es inhibida.

En todos los procedimientos anteriores y formas de realización, los compuestos/composiciones que se utilizan, se administrarán en una cantidad terapéuticamente efectiva, para el cual, el término de referencia se toma generalmente en los documentos WO 93/01820, WO 95/32734 y/o WO 96/23882. La administración puede ser una única dosis, pero es parte preferentemente de un régimen multidosis de administración que se decanta sobre uno o más días, semanas o meses.

Todos los términos que se utilizan en la presente memoria tienen el significado normal en la técnica, para los cuales puede hacerse referencia entre otros a las definiciones que se dan en los documentos WO 93/01820, WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 y/o WO 98/49306, aplicados análogamente.

Además, aunque la invención se describe con respecto al receptor específico de 44 kDa de la lectina de tipo C, denominado DC-SIGN y que se da a conocer en la presente memoria, no se excluye que otras lectinas, generalmente similares al tipo C, incluyendo las variantes naturales de la secuencia de SEC ID nº 1 y la figura 9, puedan estar

también presentes en las células dendríticas y/o puedan estar implicadas en la interacción célula dendrítica-linfocito T. Dichas variantes tendrán habitualmente un alto grado de homología aminoácida (más del 80% a más del 90%), y/o serán funcionalmente equivalentes a la lectina específica de tipo C que se da a conocer en la presente memoria. Asimismo, cualquier receptor de este tipo mostrará generalmente propiedades similares a las descritas en la presente memoria; en particular, que la inhibición de este receptor, mediante inhibidores carbohidratos o anticuerpos específicos, conducirá a una alteración de la interacción células dendríticas/linfocitos T. Cualesquiera de dichos receptores variantes se distinguirán, sin embargo, del receptor lectina de tipo C que se describe en el documento WO 96/23882, cuya inhibición no conduce a la inhibición de la interacción de las células dendríticas y los linfocitos T.

10 La invención se ilustrará además a continuación mediante la Parte Experimental que se proporciona a continuación en la presente memoria, así como las figuras, en las que:

15 - Las figuras 1A-1C son gráficos que muestran: adhesión espontánea de leucocitos a ICAM-1 e ICAM-3 (Fig. 1A); adhesión de leucocitos a ICAM-3 después de activación de integrinas $\beta 2$ (fig. 1B); adhesión de DC a ICAM-3 en presencia de anticuerpos bloqueantes (20 μ g/ml) contra integrinas $\beta 2$ (NKI-L19), integrinas $\beta 1$ (AIIB2), ICAM-3 (CBR-IC3/1), CBR-IC3/2) o en presencia de EDTA (5 mM) o EGTA (5 mM) (fig 1C).

20 - Las figuras 2A-2C son gráficos que muestran que los anticuerpos AZN-D1 y AZN-D2 inhiben la adhesión de DC a ICAM-3 y reconocen un antígeno que se expresa específicamente por DC.

25 - Las figuras 3A y 3B muestran que DC-SIGN es idéntico a la lectina de tipo C de la placenta humana que se une a gp 120 del VIH, tal como puede apreciarse a partir de SDS-PAGE (fig 3A) y mediante presentación esquemática de DC-SIGN aislado del DC humano (3B).

30 - Las figuras 4A y 4B muestran que DC-SIGN, que se sobreexpresa en las células COS7, es reconocido por el anticuerpo anti DC-SIGN AZN-D1 y se une a ICAM-3.

35 - La figura 5 muestra la distribución tisular de DC-SIGN, determinada mediante análisis inmunohistoquímico de la expresión de DC-SIGN en las amígdalas (A y B) y en los cortes de nódulos linfáticos (C y D) (OMx 100).

- Las figuras 6A-6D muestran que la adhesión mediada por DC-SIGN de DC a ICAM-3 está implicada en la interacción DC-linfocitos T, como se demuestra por la adhesión mediada por DC-SIGN de DC a ICAM-3 (fig 6A); grupos heterotípicos celulares de DC con células K562-ICAM-3 (fig 6B); grupos celulares dinámicos de DC con PBL en reposo (fig 6C); y el papel que la interacción DC-SIGN-ICAM-3 juega en la proliferación de linfocitos T inducida por DC (fig 6D).

- La figura 7 muestra que DC SIGN es un receptor para VIH-1 en DC.

- La figura 8 muestra que DC SIGN se une a tanto ICAM-3 como a las células K562 que expresan ICAM-3.

40 - La figura 9 muestra la secuencia de DC-SIGN.

Parte Experimental

45 Las células dendríticas (DC) capturan antígenos y migran a tejidos linfoides secundarios donde presentan antígenos a los linfocitos T inocentes. El VIH-1 mina esta única capacidad para acceder a las células CD4+. En la invención, se clonó una lectina de tipo C específica de DC, denominada DC-SIGN, que no sólo se une a ICAM-2 y/o ICAM-3 con alta afinidad, sino que puede también unirse al VIH-1. Asimismo, se desarrollaron anticuerpos anti-DC-SIGN que no sólo inhibieron las interacciones transitorias DC-linfocitos T e indujeron la proliferación de los linfocitos T inducidos por DC, sino que también inhibieron de modo efectivo la infección por VIH-1 de DC. Estos hallazgos no sólo tienen importantes consecuencias para el entendimiento de la entrada del VIH independiente de CD4 en DC, sino que también arrojaron más luz sobre el papel de DC-SIGN para iniciar las respuestas inmunes primarias.

Ejemplo 1

La Adhesión de DC a ICAM-3 no es mediada por la integrina

55 Se investigó el papel de la adhesión mediada por el ICAM-3 en el primer contacto de las células DC-T. Explotando un nuevo ensayo de adhesión por citometría de flujo, que implicó perlas fluorescentes revestidas con quimeras ICAM-3-Fc (Geijtenbeek *et al*), se ensayó la capacidad de DC, de los linfocitos sanguíneos periféricos en reposo (PBL) y de los monocitos, para unirse a este ligando de integrina. DC inmaduras, obtenidas después de cultivar monocitos durante 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF, se unieron intensamente a ICAM-3 sin activación previa de las integrinas $\beta 2$ (72%, figura 1A). La figura 1 demuestra que la adhesión de DC a ICAM-3 es dependiente de Ca^{2+} e independiente de la integrina: en las figuras 1A, B y C se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 (SD<5%).

60 - 1A: Adhesión espontánea de leucocitos a ICAM-1 e ICAM-3. PBL recién aislados, monocitos y DC, se incubaron durante 30 minutos a 37°C con perlas fluorescentes ICAM-1 Fc o ICAM-3 Fc. Después de lavar, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células que se unieron a las perlas.

ES 2 307 502 T3

5 - 1B: Adhesión de los leucocitos a ICAM-3 después de activación de las $\beta 2$ integrinas. La unión de perlas fluorescentes ICAM-3Fc se midió después de 30 minutos a 37°C en presencia de PMA 980 nM, o activando el anticuerpo 185 anti- $\beta 2$ integrina (10 μ g/ml). La inhibición de la adhesión específica de LFA-1 después de la activación de PMA, se determinó en presencia del anticuerpo NKI-L15 anti-LFA-1 bloqueante (20 μ g/ml).

10 - 1C: Adhesión de DC a ICAM-3 en presencia de los anticuerpos bloqueantes (20 μ g/ml) contra las integrinas $\beta 2$ (NKI-L19), integrina $\beta 1$ (AlIB2), ICAM-3 (CBR-IC3/1, IC3/2), o en presencia de EDTA (5 mM), o EGTA (5 mM). La adhesión se determinó tal como se describe en la fig. 1A.

15 Esta unión espontánea de DC a ICAM-3 es más intensa que la de los monocitos, mientras que los PBL en reposo apenas se unen a ICAM-3 (figura 1A). La adhesión de DC a ICAM-3 podría no bloquearse con cualquier anticuerpo anti- αL o anti-integrina $\beta 2$ (figura 1A). Al contrario, la adhesión de monocitos a ICAM-3 depende de LFA-1, ya que la adhesión se bloquea por anticuerpos anti- αL (figura 1A). Ya que ni los anticuerpos dirigidos contra los otros miembros de las integrinas $\beta 2$ ($\alpha D\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, datos que no se muestran), ni los anticuerpos dirigidos contra otras integrinas (integrinas $\beta 1$, $\beta 7$, figura 1B) bloquearon la adhesión de DC a ICAM-3, se concluyó que la unión de DC a ICAM-3 no depende de las integrinas.

20 La interacción de DC con las perlas ICAM-3-Fc es específica para ICAM-3, ya que los anticuerpos anti-ICAM-3 CBR3/1 y CBR3/2 de la invención, y una combinación de ambos anticuerpos, es capaz de inhibir la adhesión en gran medida (figura 1B). De forma interesante, la adhesión de DC a ICAM-3 podría bloquearse completamente por EDTA y EGTA (figura 1B). Estos hallazgos sugieren de forma importante que las DC se unen a ICAM-3 mediante un receptor superficial dependiente de Ca^{2+} que no pertenece a la familia de las integrinas $\beta 1$ o $\beta 2$. Esta molécula se denominó No-integrina de agarre ICAM-3 específica de DC (DC-SIGN).

25 Ejemplo 2

Los Anticuerpos contra DC-SIGN inhiben la interacción DC-ICAM-3

30 Para investigar DC-SIGN con mayor detalle, se produjeron anticuerpos contra el receptor de unión ICAM-3. Bazos de ratones inmunizados con DC se fusionaron con células SP2/0 de mieloma, y los sobrenadantes de los hibridomas resultantes se rastrearon para revelar la presencia de anticuerpos capaces de inhibir la adhesión específica de DC a ICAM-3. Se seleccionaron dos hibridomas, se clonaron y los anticuerpos resultantes se denominaron AZN-D1 y AZN-D2. Ambos anticuerpos purificados inhibieron intensamente la adhesión de DC a ICAM-3, pero no afectaron la adhesión mediada por LFA-1 de los monocitos a ICAM-3 (figura 2A). La figura 2 demuestra que los anticuerpos AZN-D1 y AZN-D2 inhiben la adhesión de DC a ICAM-3 y reconocen un antígeno que se expresa específicamente por DC:

40 - 2A: Los anticuerpos monoclonales AZN-D1 y AZN-D2 (20 μ g/ml) bloquean la adhesión de DC, pero no la de monocitos aislados recién preparados a las perlas fluorescentes ICAM-3 Fc. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos (SD<5%).

45 - 2B: La expresión de DC-SIGN aumentó durante el desarrollo de DC. Las DC se cultivaron a partir de monocitos en presencia de GM-CSF e IL-4. A distintos tiempos, se analizaron las DC en desarrollo con respecto a la expresión de los marcadores monocíticos CD14, integrina $\beta 2$, LFA-1 y DC-SIGN. Las células se dirigieron a un dispersor en el lado delantero y la fluorescencia promedio se muestra en el ángulo superior derecho de los histogramas. Se muestra un experimento representativo además del 3.

50 - 2C: El desarrollo de las células DC a partir de los monocitos, en presencia de GM-CSF e IL-4, se une de forma creciente a ICAM-3 de una forma dependiente de DC-SIGN. A distintos tiempos durante el cultivo, las células se recuperaron e incubaron con perlas fluorescentes ICAM-3Fc en presencia del anticuerpo bloqueante anti-integrina $\beta 2$ AZN-L19 o del anticuerpo AZN-D1 (20 μ g/ml). La adhesión se determinó tal como se describe en la fig. 1A. AZN-D2 inhibió la adhesión a ICAM-3 de forma similar a AZN-1 (resultados que no se muestran). Se muestra un experimento representativo además de 3 (SD <5%).

55 - 2D: La contribución relativa de las integrinas $\beta 2$ y de DC-SIGN mediaron la adhesión a ICAM-3 desarrollando DC. La contribución relativa se calculó a partir de la inhibición de la adhesión en presencia de AZN-D1 o AZN-L19, tal como se describe en la fig. 2C.

60 Utilizando los anticuerpos AZN-D1 en los análisis de citometría de flujo, se demostró que DC-SIGN no se expresa por los monocitos (figura 2B). Las células que expresan DC-SIGN pueden ya detectarse después de 1 día de cultivo. El nivel que se expresa de DC-SIGN aumenta durante el cultivo (figura 2B). La expresión del marcador monocítico CD14 disminuye gradualmente durante el cultivo y en el día 7, sólo una escasa expresión de CD14 se observa (figura 2B). Otros análisis de citometría de flujo demostraron que en el día 7 las células también expresan altos niveles de los tipos I y II de MHC, de la integrina $\beta 2$ p150.95 y de CD86 (datos que no se representan), que están de acuerdo con la diferenciación de los monocitos a las DC inmaduras. Estos resultados demuestran que DC-SIGN se expresa abundantemente por las DC en el día 7, siendo el nivel de expresión varias veces más alto que el de LFA-1.

Simultáneamente, se investigó la implicación de DC-SIGN en la unión a ICAM-3 durante la diferenciación de los monocitos en células DC inmaduras (figura 2C). Al principio del cultivo (día 0), la unión a ICAM-3 por los monocitos depende completamente de la integrina $\beta 2$ (LFA-1), tal como se demostró por la inhibición de la adhesión con el anticuerpo bloqueante anti-integrina $\beta 2$ L9 (figura 2C). En el día 1, cuando se expresan bajos niveles de DC-SIGN (figura 2B), la adhesión específica de ICAM-3 depende tanto de la integrina $\beta 2$ (LFA-1) como de DC-SIGN (figura 2C). Desde el día 2 al 7, la adhesión específica a ICAM-3 aumenta, se convierte en independiente de la integrina $\beta 2$ (figura 2C) y a partir del día 2 es mediada solamente por DC-SIGN, ya que anti-DC-SIGN bloque completamente la adhesión. La adhesión máxima mediante DC-SIGN se alcanza en el día 7 (figura 2C).

Estos resultados demuestran conjuntamente que el aumento en la expresión de DC-SIGN coincide con el aumento que se observó en la unión a ICAM-3 (figura 2A y B). A partir de estos hallazgos puede concluirse que DC-SIGN, reconocido por los anticuerpos AZN-D1, y AZN-D2, es el nuevo receptor expresado por DC, que se une a ICAM-3.

Ejemplo 3

DC-SIGN es una proteína de 44 kDa

Para obtener información con respecto al pero molecular de DC-SIGN, se inmunoprecipitó DC-SIGN partir de un lisado de DC marcado superficialmente con I^{125} . El análisis mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, reveló una proteína única de 44 kDa (figura 3A, carriles 1-2). La figura 3 demuestra que DC-SIGN es idéntico a la lectina de tipo C de la placenta humana que se une al gp 120 del VIH:

- 3A: DC-SIGN es una proteína de 44 kDa. Se marcó con I^{125} las superficies de DC, se lisaron y DC-SIGN se inmunoprecipitó con los anticuerpos anti-DC-SIGN AZN-D1 (carril 1), AZN-D2 (carril 2) y AZN-L 19 (anti-integrina-J32, carril 3). Los inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE (gel 5-15%), seguido por autoradiografía. La migración de los marcadores del peso molecular se indica a la izquierda. Las flechas indican las cadenas α de LFA-1 (αL , 180 kDa), MAC-1 (αM , 165 kDa) y p150,95 (αX , 150 kDa), la cadena de la integrina $\beta 2$ (95 kDa) y DC-SIGN (44 kDa). Resultados similares se obtuvieron en otros 3 experimentos.
- 3B: presentación esquemática de DC-SIGN aislado de las DC humanas. Los dos péptidos encuadrados (posiciones aminoácidas 296-306 y 187-197 de la lectina de tipo C placentaria humana que se une a gp 120, se identificaron mediante secuenciación interna de los péptidos del DC-SIGN inmunoprecipitado, utilizando la degradación de Edman. El ADNc que codifica DC-SIGN se aisló a partir de DC. La secuencia aminoácida deducida es un 100% idéntica a la de la lectina de tipo C de la placenta humana que se une al gp 120 del VIH. Se indican la región transmembranosa, el dominio de la lectina y las repeticiones (siete completas y una octava parcial) (R1-R8).

El análisis del inmunoprecipitado en un gel SDS-PAGE no reductor muestra que DC-SIGN existe como un monómero (resultados no representados). Además, utilizando perlas revestidas con ICAM-3-Fc, también pudo extraerse una proteína de 44 kDa a partir del lisado DC, mientras que en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-DC-SIGN, esta proteína no pudo precipitarse con perlas revestidas con ICAM-3-Fc (resultados que no se muestran). Estos hallazgos demuestran que DC-SIGN se expresa mediante DC como una proteína de 44 kDa bajo condiciones reductoras. La observación de que las perlas acopladas con ICAM-3-Fc extrajeron sólo una proteína de 44 kDa fuera del lisado de DC, indica que DC-SIGN posee una alta afinidad por ICAM-3, mucho mayor que LFA-1 o $\alpha D\beta 2$, que se expresan también mediante las DC (figura 3A) y de las que se ha informado que se unen a ICAM-3 (Vandervieren *et al.*, *Immunity*, 3, 683-690, 1995). Ya que cantidades muy pequeñas de LFA-1 se inmunoprecipitan, en comparación con DC-SIGN (figura 3A, carril 1 y 3), esto confirma que DC-SIGN se expresa más abundantemente mediante las DC que LFA-1. Juntos, estos datos demuestran que DC-SIGN es un polipéptido sencillo de 44 kDa y constituye el receptor primario para ICAM-3 en las células DC.

Ejemplo 4

DC-SIGN es idéntico a la lectina de tipo C humana que se une al gp 120 del VIH

Para identificar DC-SIGN, se llevó a cabo una inmunoprecipitación preparativa a partir de un lisado de células DC con el anticuerpo anti-DC-SIGN AZN-D1, extrayéndose la proteína de 44 kDa a partir del SDS-PAGE. Después de digestión tríptica, los péptidos resultantes se extrajeron a partir del gel, y se purificó utilizando HPLC preparativa. A continuación, las secuencias aminoácidas de 2 péptidos (0,5-1 pmol) se determinaron utilizando el procedimiento de degradación de Edman. Ambos péptidos consistieron en 11 residuos aminoácidos (figura 3B) utilizando las secuencias péptidos para rastrear la base de datos EMBL con respecto a la homología con proteínas conocidas. Ambos péptidos mostraron una identidad del 100% con la secuencia aminoácida deducida de la lectina de tipo C humana que se une al gp 120 del VIH (Curtis *et al.*, 1992). Esta proteína se había identificado previamente de modo exclusivo en la placenta como un receptor independiente de CD4 para la glicoproteína gp 120 de la envuelta del virus humano de la inmunodeficiencia (VIH).

El análisis RT-PCR con cebadores basados en la secuencia de la lectina de tipo C que se une a la gp 120, sobre el ARN aislado a partir de las células DC, dio lugar a un producto PCR con la longitud esperada de 1237 nt. El producto

ES 2 307 502 T3

PCR específico de DC, se clonó y la secuenciación confirmó una identidad del 100% con la lectina humana que se une al gp 120 (figura 3B). El análisis de la citometría de flujo de las células COS7, transfectadas con el ADNc que codifica la lectina de tipo C humana que se une a gp 120, prueba inequívocamente que la secuencia de la lectina de tipo C que se une a la gp 120, es verdaderamente idéntica a DC-SIGN (figura 4A). La figura 4 demuestra que DC-SIGN, que se 5 sobreexpresa en las células COS7, es reconocido por el anticuerpo anti-DC-SIGN AZN-D1 y se une a ICAM-3:

- 4A: AZN-D1 reconoce a las células COS7 transfectadas con el ADNc que codifica DC-SIGN (rellenas) y no a las células COS7 transfectadas simuladas (no llenas). AZN-D2 produjo una tinción similar (resultados que no se muestran). 10
- 4B: Adhesión de COS7-DC-SIGN a ICAM-3. Las células COS7 fueron transfectadas y se determinó la adhesión tal como se describe en la fig. 1A, respectivamente. La adhesión de las células COS7-DC-SIGN a ICAM-3 se midió en presencia de EGTA (5 mM) y los anticuerpos bloqueantes contra DC-SIGN (AZN-D1), ICAM-3 (CBR-IC3/1, CBR-IC3/2) e integrinas $\beta 2$ (AZN-L19). Se muestra un experimento representativo 15 además de 3 (SD<5%).

Aproximadamente 30% de las células COS7 transfectadas se tiñeron con anticuerpo anti-DC-SIGN y por tanto, expresaron DC-SIGN. Además, las células COS7-DC-SIGN pueden unirse a ICAM-3, mientras que las células COS7 transfectadas simuladas son incapaces de unirse a ICAM-3 (figura 4B). La unión de DC-SIGN expresado por COS7 20 podría ser completamente inhibida por anticuerpos contra ICAM-3 y DC-SIGN, y fue dependiente del Ca^{2+} , ya que EGTA bloquea completamente la adhesión (figura 4B).

Se concluye que el receptor que se une a ICAM-3, expresado por DC (DC-SIGN), es idéntico a la lectina de tipo C placentaria que se une al gp 120 del VIH (Curtis *et al.*, 1992), una proteína transmembranosa de tipo II que comprende 25 404 aa (aminoácidos) con tres dominios distintos. El dominio citoplásmico N-terminal de 40 residuos está separado por un segmento hidrofóbico de 15 aa de una región que está formada por repeticiones en tandem, siete completas y una incompleta de secuencias casi idénticas. La restante región C-terminal (Cys253-Ala404) muestra homología para las lectinas (de tipo C) dependientes del Ca^{2+} (figura 3B).

30 Ejemplo 5

DC-SIGN se expresa superficialmente mediante DC

El análisis mediante citometría de flujo de un extenso conjunto de células hematopoyéticas con los anticuerpos 35 AZN-D1/D2 demuestra que el antígeno se expresa preferentemente por DC (Tabla 1). Todas las células hematopoyéticas que se ensayaron, fueron negativas con respecto a la expresión de DC-SIGN, excepto para DC. Además, un análisis RT-PCR confirma que el ARNm que codifica DC-SIGN se transcribe específicamente en DC, lo que está de acuerdo con el patrón de expresión de la proteína DC-SIGN (Tabla 1).

40 Para investigar posteriormente la expresión de DC-SIGN *in vivo*, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de los tejidos linfoides secundarios con los anticuerpos anti DC-SIGN. Estos tejidos son conocidos porque contienen células dendríticas. Cortes de amígdalas y nódulos linfáticos contenían células que expresaban DC-SIGN, que se observaron predominantemente en el área de los linfocitos T de ambas amígdalas y en los nódulos linfáticos (figura 5). La figura 5 muestra la distribución del tejido de DC-SIGN: análisis inmunohistoquímico de la expresión de DC-SIGN 45 en las amígdalas y en los cortes de nódulos linfáticos (OM x100). Se fijaron los cortes con acetona y se realizó la tinción nuclear con hemateína. La tinción de DC-SIGN se llevó a cabo con AZN-D1. Se muestran el centro germinal (GC), y las áreas celulares T-(T) y (B).

50 De acuerdo con la distribución y morfología de las células dendríticas, las células que expresan DC-SIGN no se detectan en los centros germinales y en la zona del manto de los tejidos linfoides (figura 5). La tinción de cortes en serie con respecto a CD3 y CD14 confirmó que las células que expresaban DC-SIGN son distintas de los linfocitos T y de los monocitos (datos que no se muestran), como también se demostró mediante ambos análisis mediante citometría de flujo y RT-PCR de estas células (Tabla 1).

55 Ejemplo 6

Las interacciones DC-SIGN/ICAM-3 median los conjuntos transitorios DC-linfocitos T

Para demostrar que las CD se unen a los transfectantes que expresan ICAM-3 de una forma dependiente de DC-SIGN, se investigó la capacidad de la progenie celular leucémica K562 transfectada con el ADNc que codifica ICAM-3 (K562-ICAM-3), para unirse a DC. Tal como se muestra en la figura 6A, el conjunto de células DC se conjuntaron con K562-ICAM-3 de una forma dependiente de DC-SIGN, ya que la interacción puede bloquearse mediante anticuerpos anti-DC-SIGN. No se observó la entre DC y K562, demostrando que ICAM-3 es el ligando para DC-SIGN. La figura 6 muestra que la adhesión mediada por DC-SIGN, de DC a ICAM-3, está implicada en la interacción 65 DC-linfocitos T.

- 6A: La adhesión mediada por DC-SIGN de DC a ICAM-3, depende de un citoesqueleto intacto. La adhesión de DC a las perlas ICAM-3, se determinó con (cuadro abierto) o sin (cuadro lleno) el anticuerpo de bloqueo

ES 2 307 502 T3

DC-SIGN AZN-D1 en presencia de citocalasina D, que se tituló en varias concentraciones. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos (SD<5%).

5 - 6B: de células heterotípicas de DC con células K562-ICAM-3. Las células estables K562 y K562 que se transfectaron con el ADNc que codifica ICAM-3 (K562-ICAM-3) se marcaron con el colorante rojo HE (hidroetidina). Las DC se marcaron con el colorante verde SFDA. K562 y K562-ICAM-3 se incubaron con DC (5×10^3 células/tipo celular) con o sin anticuerpos bloqueantes anti-DC-SIGN (AZN-D1:10 min preincubación) a 37°C. A distintos tiempos, las células se fijaron con paraformaldehído (0,5%), y la de células heterotípicas se midió mediante citometría de flujo. Se proporciona un experimento representativo de 2 experimentos.

10 - 6C: La formación de conjuntos celulares dinámicos de las DC con los Pbl en reposo es mediada por DC-SIGN. Las DC (50×10^3 células) se preincubaron con/o sin los anticuerpos anti-DC-SIGN AZN-D1 y AZN-D2 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) durante 10 minutos a TA. Se añadieron PBL alogénicos (1×10^6 células), marcados con el colorante fluorescente Calceína-A ($25 \mu\text{g}/10^7$ células/ml durante 30 minutos a 37°C) y la mezcla celular se incubó a 37°C. La formación de conjuntos se midió mediante citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo además de 2.

15 - 6D: La interacción DC-SIGN-ICAM-3 es importante en la proliferación de los linfocitos T inducida por DC. Los T-linfocitos alogénicos receptivos (100×10^3) se añadieron a las DC estimuladoras ($1,5 \times 10^3$) en presencia de anticuerpos bloqueantes ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) contra LFA-3 (TS2/9) y DC-SIGN (AZN-D1, AZN-D2). Las células se cultivaron durante 4 días. En el día 4 a las células se aplicaron impulsos durante 16 horas con [^3H]metyl-timidina, determinándose la captación. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de CPM, por triplicado, a partir de los pocillos.

25 La formación de conjuntos dependiente de DC-SIGN es transitoria, con un máximo a los 60 minutos, que indica que las interacciones DC-SIGN-ICAM-3 pueden estar activamente reguladas por las DC. Además, este fenómeno permite a las DC interaccionar transitoriamente con múltiples linfocitos T, hasta que la interacción se intensifica después del compromiso de TCR.

30 Para probar esto, se investigó si la agrupación de DC con los linfocitos T es mediada por DC-SIGN y si esta interacción es también transitoria. Las DC se incubaron con los linfocitos T alogénicos en reposo (DC:linfocitos T, 1:20) y se determinó la agrupación celular DC-T. Tal como se aprecia en la fig. 6B, la de DC con los linfocitos T es transitoria y alcanza un máximo después de 20 minutos (32%). Además, la interacción celular DC-T puede inhibirse (aproximadamente el 50%) mediante anticuerpos anti DC-SIGN, lo que sugiere que la agrupación celular DC-T está también mediada por otros receptores superficiales. De este modo, la agrupación de células DC-T es verdaderamente transitoria y está mediada parcialmente por las interacciones DC-SIGN-ICAM-3. De forma similar, la figura 8 muestra que DC-SIGN se une no sólo con las células K562 que expresan el ADNc que codifica ICAM-3, sino también con las células K562 que expresan el ADNc que codifica ICAM-3, y que dicha unión puede inhibirse mediante anticuerpos, tanto de manana, como anti-DC-SIGN.

Ejemplo 7

La proliferación de los linfocitos T en reposo inducida por las células DC alogénicas, depende de DC-SIGN

45 Como la unión de DC-SIGN a ICAM-3 es importante para la de las células DC con las T, también se investigó la función de DC-SIGN en la proliferación de los linfocitos T inducida por DC. Los linfocitos T en reposo se estimularon con DC alogénicas en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes anti-DC-SIGN. Tal como se aprecia en la figura 6C, los anticuerpos anti-DC-SIGN AZN-D1 y AZN-D2 inhibieron ambos la proliferación de los linfocitos T en más de un 75%. De modo similar, los anticuerpos contra la molécula estimuladora LFA-3, que se une a CD2 en los linfocitos T y que también es conocida por mediar la proliferación de los linfocitos T, inhiben la proliferación de las células T. Una combinación de los anticuerpos anti-LFA-3 y anti-DC-SIGN inhibe completamente la proliferación de los linfocitos T. (figura 6C).

Ejemplo 8

DC-SIGN está implicado en la infección por VIH-1 de las células DC

50 Como se demostró anteriormente en la presente memoria que DC-SIGN es idéntico a la lectina placentaria que se une a gp 120 del VIH, y que se expresa abundantemente por DC, DC-SIGN podría facilitar la entrada del VIH-1 en las células DC. Para investigar esto, se emitieron impulsos con VIH-1 a las células DC, y se midió la infección productiva en cocultivos de células DC-T. Las células DC que recuperaron 7 días después del cultivo en presencia de IL-4 y GM-CSF, expresaron niveles bajos de CD4 (Blaauwelt *et al.*, 1997; Granelli-Piperno *et al.*, J. Exp. Med 184(6), 2433-8, 1996) y niveles altos de DC-SIGN (figura 7). Tal como se muestra en la figura 7, se produce una intensa infección productiva cuando se emitieron impulsos con VIH-1 a las células DC durante 2 horas, lavándose y cultivándose en presencia de células PBMC activadas. En el día 3 del cocultivo de las células DC-T, la proteína p24 Gag, una medida de la replicación del VIH-1, empieza a acumularse en el medio (figura 7), demostrando que el VIH-1 se replica eficientemente en el cocultivo, de forma similar a lo mostrado por otros investigadores (Blaauwelt *et*

al., 1997; Granelli-Piperno *et al.*, 1998; Granelli-Piperno *et al.*, Curr Biol 9 (1), 21-29, 1999). Sin embargo, cuando las células DC antes de la emisión de los impulsos del VIH-1, se preincubaron con anticuerpos anti-DC-SIGN, y se incubaron con PBMC activados, se inhibió la replicación del VIH-1 en más del 75%, tal como se muestra en el día 3 del cocultivo de las células DC-T (figura 7). Cuando las DC se incubaron con anticuerpos anti-DC-SIGN después de la emisión de impulsos con el VIH-1, se observó todavía una eficiente replicación del VIH-1 en el cocultivo de células DC-T (figura 7). Estos hallazgos demuestran que los anticuerpos anti DC-SIGN bloquean la infección por el VIH-1 mediante la inhibición de la unión del VIH-1 a las células DC y (entonces) no tiene lugar la transmisión del VIH-1 desde las células DC a los linfocitos T, indicando que DC-SIGN actúa como un receptor importante para el VIH-1 en las células DC. Así, DC-SIGN es altamente expresado en las células DC y funciona como un receptor específico de las células DC para tanto el ICAM-3 como el VIH-1.

A partir de los resultados experimentales anteriores, puede concluirse entre otros, que la interacción inicial de DC con los linfocitos T es independiente del antígeno y transitoria. Esta naturaleza transitoria proporciona que DC posea la capacidad de interaccionar con una multitud de linfocitos T hasta que tenga lugar un productivo compromiso de TCR. Hasta ahora no está claro el mecanismo por el cual se inicia este proceso transitorio. En la presente memoria, se demuestra que la interacción de un nuevo receptor específico de las células DC, DC-SIGN, media, con el ICAM-3, esta interacción transitoria de las células DC-T. DC-SIGN es expresado abundantemente por DC, y se ha mostrado que DC-SIGN sirve como un receptor importante del VIH-1 en las células DC.

Una importante función para las DC durante el curso de la infección por VIH-1 es la capacidad para extender el VIH-1 a los linfocitos T, promoviendo la replicación extensa que conduce a la muerte de las células CD4+T (Cameron *et al.*, 1992, Cameron: AIDS Res Hum Retroviruses 10 (1), 61-71, 1994). Se demostró claramente una infección de DC productora de VIH-1, que depende del estado de desarrollo de DC (Granelli-Piperno *et al.*, 1998). Células DC inmaduras, cultivadas a partir de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF, son infectadas productivamente por cepas M-trópicas de VIH-1 (Granelli-Piperno *et al.*, 1996, Granelli-Piperno *et al.*, 1998) (Blauvelt *et al.*, 1997), mientras que la penetración de ambos VIH-1 M- y T-trópicos en las DC maduras no conduce a una infección productiva (Granelli 1998). Sin embargo, la penetración de VIH-1 en ambos tipos de DC conduce a una replicación explosiva después del cocultivo con linfocitos T en reposo o activadas (Granelli 1998, 1999). Los eventos iniciales en la infección por VIH-1 de las células diana incluyen la unión del receptor y la fusión de la membrana. Este proceso se inicia por la unión de alta afinidad de la glicoproteína gp 120 de la envuelta a CD4. Sin embargo, la CD4 sola no basta para iniciar la fusión, y son necesarios receptores quimiocina tales como CCR5 y CXCR4 como coreceptores para que tenga lugar el evento de la fusión final (revisado por Littman *et al.*, 1998) (Dragic *et al.*, Nature 381 (6584), 667-73, 1996; Feng *et al.*, Science 272 (5263), 872-7, 1996). Las células DC expresan pequeñas cantidades de CD4, mientras que altos niveles de DC-SIGN se expresan en la superficie celular. Se ha sugerido que la infección productiva de DC y su capacidad para capturar y subsiguientemente, transmitir el VIH-1, son mediadas a través de vías separadas. La infección productiva de DC es medida mediante una vía dependiente de CD4, mientras que el VIH-1 puede ser capturado mediante DC a través de una vía independiente de CD4 que todavía permite que DC transmita el VIH-1 a los linfocitos T (Blauvelt *et al.* (1997). En la presente memoria, se mostró que DC-SIGN media específicamente la penetración del VIH-1 en las células DC, tal como se midió por la falta de infección productiva en el cocultivo de las células DC-T después de la preincubación de DC con anticuerpos anti-DC-SIGN antes de la emisión de impulsos de VIH-1. Los anticuerpos anti-DC-SIGN no inhiben completamente la penetración de VIH-1 en DC. Esta vía independiente de DC-SIGN es mediada probablemente por CD4(), que se expresa a niveles bajos en DC. Estos resultados confirman la presencia de una vía tanto dependiente como independiente de CD4 para la penetración viral en DC. Se ha mostrado que varias moléculas adhesivas pueden inhibir la transmisión de VIH-1 desde DC a los linfocitos T, mediante la interferencia del contacto DC-linfocitos T (Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 1997). Anticuerpos anti-DC-SIGN no pudieron prevenir la transmisión de VIH-1 a los linfocitos T cuando anticuerpos anti-DC-SIGN se añadieron después del envío de impulsos VIH-1 para inhibir la interacción DC-linfocitos T. Estos datos indican que DC-SIGN sirve como un receptor importante para la penetración del VIH-1 en las células DC. El hecho de que DC exprese niveles altos de DC-SIGN y niveles bajos de CD4 (figura 7) demuestra además que la penetración de VIH-1 en DC está mediada predominantemente por DC-SIGN. El descubrimiento de DC-SIGN como un receptor de VIH-1 podría ser importante para una mejor comprensión de la penetración de VIH-1 en DC. Además, la inhibición de la infección por VIH-1 observada en presencia de los anticuerpos anti-DC-SIGN, permitirá el desarrollo de anticuerpos anti-DC-SIGN en estrategias terapéuticas, contra la infección vírica y la propagación regional del VIH-1.

Las células DC constituyen una población heteróloga de células que se encuentran a niveles indiciarios en varios tejidos. Para definir mejor las distintas poblaciones, se ha hecho un gran esfuerzo para generar anticuerpos que se dirijan contra moléculas superficiales celulares específicas de progenies de DC. Hasta ahora, sólo se han generado algunos anticuerpos que reconocen antígenos específicos de DC humanas (Hock *et al.*, Immunol, 83, 573-581, 1994), (de Saint Vis *et al.*, Immunity 9(3), 325-36, 1998) (Hart *et al.*, 1997). DC-SIGN puede ahora añadirse a esta lista de antígenos específicos DC humanos, ya que se ha demostrado en la presente memoria que a nivel proteico, así como a nivel del ARNm, de todas las células hematopoyéticas ensayadas, sólo las DC expresan DC-SIGN (Tabla 1). *In situ*, DC-SIGN se expresa exclusivamente mediante subconjuntos de DC que se encuentran en el área de los linfocitos T de las amígdalas y de los nódulos linfáticos. Estas DC maduras son muy potentes en la activación de los linfocitos T indiferenciados. Por tanto, la expresión de DC-SIGN *in situ*, se correlaciona con su función como un mediador importante de la formación de conjuntos DC-T y la subsiguiente activación de los linfocitos T.

La activación de los linfocitos T en reposo mediante las células presentadoras de antígenos, constituye una etapa críticamente importante en la respuesta inmune adquirida. Localizadas en muchos tejidos, las DC capturan y procesan

antígenos, y migran a los tejidos linfoides, donde interaccionan con y activan linfocitos T indiferenciados específicamente-antígenicos. Los linfocitos T son dirigidos por las quimiocinas a estos sitios de presentación antigenica. Recientemente, se identificó una quimiocina DC-CK1 específica de DC, que atrae específicamente a los linfocitos T indiferenciados en sitios de iniciación inmune (Adema *et al.*, *Nature*, 387, 713-717, 1997). Después de la llegada a los tejidos linfoides secundarios, los linfocitos T interaccionan con DC, teniendo lugar la activación después del reconocimiento por TCR de los péptidos unidos a las moléculas MHC. Sin embargo, ya que la afinidad de TCR por el antígeno presentado por las moléculas MHC es muy baja, y el número de complejos específicos MHC-péptido sobre APC es limitado, la interacción de TCR con el antígeno es habitualmente insuficiente para gobernar la formación de un contacto íntimo de la membrana entre DC y el linfocito T, necesario para la plena activación.

Hasta ahora, la LFA-1 constituyó el receptor más importante para ICAM-3 en las DC. Sin embargo, su función en la unión a ICAM-3 se ha convertido ahora en discutible, debido al descubrimiento en la presente memoria de DC-SIGN. Se demostró que la adhesión de DC a ICAM-3 está completamente mediada por DC-SIGN. DC-SIGN se expresa más abundantemente por DC que por LFA-1 (figura 2B). Además, LFA-1 es inactiva sobre DC (figura 2C) y su afinidad por ICAM-3 es mucho menor que la de DC-SIGN por ICAM-3. Estos datos demuestran claramente que DC-SIGN constituye el receptor primario para ICAM-3 en las células DC. La función para DC-SIGN en DC se aclaró ulteriormente por el hallazgo de que anticuerpos anti-DC-SIGN inhibieron *parcialmente* la formación de conjuntos transitorios DC-linfocitos T. Por tanto, DC-SIGN está implicado en la interacción inicial DC-linfocitos T en la respuesta inmune. Una función que se atribuyó previamente a LFA-1. La naturaleza transitoria de la interacción DC-linfocitos T mediada por DC-SIGN permite a DC interaccionar con un gran número de linfocitos T en reposo, hasta que se consigue una interacción productiva mediada por TCR, después de la cual la interacción se estabiliza. La importancia de la interacción DC-SIGN-ICAM-3 es subrayada además por el hallazgo de que los anticuerpos contra DC-SIGN pueden inhibir la proliferación alogénica de linfocitos T inducida por DC. Además, la combinación de anticuerpos contra DC-SIGN y LFA-3, una molécula coestimuladora conocida(), inhibe casi completamente la proliferación de los linfocitos T. Por tanto, la adhesión transitoria de alta afinidad de DC-SIGN a ICAM-3, desempeña un importante papel en la interacción inicial antígeno-independiente entre DC y los linfocitos T indiferenciados. Presumiblemente, esta interacción inicial de alta afinidad permite el compromiso de TCR mediante la unión antigenica a MHC, que inicia a continuación varias otras interacciones de adhesión entre DC y los linfocitos T, tales como la interacción LFA-1. ICAM-1. Ya que LFA-1 es inactiva sobre los linfocitos T, la activación del complejo TCR/CD3 después de la presentación antigenica por DC(), dará lugar a la activación de LFA-1 y la intensa unión subsiguiente de LFA-1 a ICAM-1, expresada en DC. La intensificación de la interacción entre DC y los linfocitos T mediante múltiples contactos, conducirá entonces a la activación completa de los linfocitos T mediante las células DC estimuladoras().

En conclusión, se ha identificado un nuevo receptor ICAM-3 en las células DC, denominado DC-SIGN, el cual se expresa específicamente por las células DC humanas y está implicado en la interacción inicial transitoria DC-linfocitos T, necesaria para iniciar una respuesta inmune. De forma interesante, DC-SIGN es también capaz de unirse a la proteína gp 120 de la envuelta del VIH-1 y facilitar la penetración del virus en las células DC. Al experto en la materia, y basándose en los hallazgos que se han expuesto en la presente memoria, le serán sugeridas varias técnicas y distintas posibilidades profilácticas y terapéuticas.

Ejemplo 9

45 *Procedimientos experimentales*

Ej. 9A

Anticuerpos

50 Se utilizaron los siguientes anticuerpos: KLM 185 (anti-integrina β 2, (Andrew *et al.*, *Eur. J. Immunol* 23, 2217-2222, 1993), AZN-L19 (anti-integrina β 2), NKI-L15 (anti- α L, (Keizer *et al.*, *Eur. J. Immunol* 15, 1142-1147, 1985)), AIIB2 (anti-integrina β 1, (Da Silva *et al.*, *J. Immunol*, 143, 617-622, 1989)), CBR-IC3/1 y CBR-IC3/2 (anti-ICAM-3 (de Fougerolles *et al.*, *J. Exp. Med.*, 177, 1187-1192, 1993)), CD14 (WT140), CD4 (wt40). Los anticuerpos aniy-55 DC-SIGN AZN-D1 y AZN-D2 se obtuvieron inmunizando ratones BALB/c con DC y rastreando a continuación los sobrenadantes de hibridoma, en cuanto a su capacidad para bloquear la adhesión de DC a ICAM-3, tal como se midió mediante el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes.

Ej. 9B

Células

Se cultivaron células DC a partir de monocitos, tal como se describe (Sallusto y Lanzavecchia, *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118, 1994; Romani *et al.*, *J. Exp. Med.* 180; 83-93, 1994). Brevemente, se aislaron monocitos a partir de PBMC recién preparados mediante una etapa de adherencia. Se cultivaron los monocitos en presencia de IL-4 (Schering-55 Plough, Bruselas, Bélgica; 500 U/ml) y GM-CSF (Schering-Plough, Bruselas, Bélgica, 1000 U/ml) durante 7 días. En el día 4, se añadieron citoquinas recién preparadas. En el día 7 el fenotipo de las células DC cultivadas se confirmó mediante análisis de citometría de flujo de la expresión de los tipos I y II de MHC, de CD1a, de p150,95 y de CD80. Se

ES 2 307 502 T3

generaron transfectables estables K562 que expresaban ICAM-3 (K562-ICAM 3) mediante la transfección de K562 con 10 μ g del plásmido PCRII ICAM-3 R1 (donación del Dr. D. Simmons) y 2 μ g del vector PGK-hyg (Riele *et al.*, 1990) mediante electroporación, tal como se describe en (Lub *et al.*, Mol. Biol. Cell 8, 719-728, 1997). Los linfocitos T en reposo (CD3 positivas > 90%) se obtuvieron mediante elutriación centrífuga de PBMC a partir de la médula ósea de donantes sanos, tal como se describe (Figdor *et al.*, Immunol Methods 68, 73-87, 1984).

Ej. 9C

Marcado radioactivo, inmunoprecipitación y análisis de la secuencia proteica

Se marcaron células superficialmente con Na¹²⁵I (Amersham Buckinghamshire, Reino Unido) mediante el procedimiento de la lactoperoxidasa (Pink y Ziegler, 1979, en: Research Methods in Immunology, editores L. Lefkovits y B. Pernis, (New York Academic Press), págs 169-180). Las células DC se lisaron durante una hora a 4°C en tampón de lisis (NP-40 al 1%, 50 mM trietanolamina (pH 7,8), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0,02 mg/ml leupeptina). Se eliminaron los restos nucleares del lisado mediante centrifugación a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C. Antes de desalojar los lisados, se incubaron durante 3 horas con un mAb específico unido covalentemente a perlas 4B-Proteína A-sefarosa CL (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ). Los inmunoprecipitados se lavaron extensamente con tampón de lisis y se analizaron mediante SDS-PAGE según una modificación del procedimiento Laemmli (Laemmli, Nature 227, 680-685, 1970). La digestión tríptica de la proteína extirpada, la purificación de los péptidos resultantes y el análisis secuencial, se llevaron a cabo mediante Eurosequence BV (Groningen, Holanda).

Ej. 9D

Aislamiento y expresión del ADNc que codifica DC-SIGN

Se aisló el ARN total mediante un procedimiento ácido guanidinio isotiocianato-fenolclorofórmico (Chomczynski y Sacchi, Anal Biochem 162 (1), 156-9, 1987). El ADNc que codifica la lectina placentaria de tipo C que se une a gp 120 se amplificó mediante RT-PCR sobre el ARN total de las células DC. Los cebadores PCR se basaron en la secuencia nucleótida de la lectina placentaria de tipo C que se une a gp 120 (nº de registro M98457, (Curtis *et al.*, 1992) y las secuencias nucleótidas (5' a 3') son las siguientes: XF29, AGAGTGGGGTGACATGAGTG; XR1265, GAAAGTTCTGCTACGCA GGAG. El fragmento PCR se clonó en el vector pGEM-T (Promega, Madison WI) y se secuenció. La secuencia nucleótida del ADNc clonado era idéntica a la de la lectina placentaria de tipo C que se une a pg120 (Curtis *et al.*, 1992). El ADNc se clonó a continuación en el vector eucariótico de expresión (pRc/CMV (pRc/CMV-DC-SIGN), y las células COS7 fueron transfectadas de forma transitoria con pRc/CMV-DC-SIGN, utilizando el procedimiento de DEAE dextrano (Seed y Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365-3369, 1987).

Ej. 9E

Ensayo de adhesión de las perlas fluorescentes

Trans-Flúor Esferas modificadas por carboxilato (488/645 nm, 1,0 μ m; Molecular Probes. Eugene.OR) se revisaron con ICAM-1 Fc e ICAM-3 Fc, tal como se ha descrito previamente (Geijtenbeek *et al.*, presentado en 1999). Brevemente, se añadieron 20 μ l de estreptavidina (5 mg/ml en 50 mM de tampón MES) a 50 μ l de Esferas Trans-Flúor. Se añadieron 30 μ l de EDAC (1,33 mg/ml) y la mezcla se incubó a TA durante 2 horas. La reacción se detuvo añadiendo glicina a una concentración final de 100 mM. Las perlas revestidas con estreptavidina se lavaron tres veces con PBS (50 mM fosfato, NaCl al 0,9%, pH 7,4) y se volvieron a suspender en 150 μ l de PBS, BSA al 0,5% (peso/vol). Las perlas revestidas con estreptavidina (15 μ l) se incubaron con fragmentos de cabra biotinilados antihumanos anti-Fc-Fab2 (6 μ g/ml) en 0,5 ml de PBA durante 2 horas a 37°C. Las perlas se lavaron una vez con PBS, BSA al 0,5% y se incubaron con ligandos humanos fusionados IgG1 Fc (ICAM-1 Fc, VCAM-1 Fc; 250 ng/ml) en 0,5 ml, por la noche, a 4°C. Las perlas revestidas con los ligandos se lavaron, se volvieron a suspender en 100 μ l de PBS, BSA al 0,5%, y se guardaron a 4°C. ICAM-1 Fc e ICAM-3 Fc consisten en la parte extracelular de la proteína fusionada a un fragmento IgG1 Fc humano (proporcionado por el Dr. D. Simmons). El ensayo de adhesión de las perlas fluorescentes se llevó a cabo tal como se ha descrito por Geijtenbeek *et al* (presentado). Brevemente, las células se volvieron a suspender en tampón Tris-Sodio-BSA (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, BSA al 0,5%; 5 x 10⁶ células/ml). Se preincubaron 50.000 células con o sin bloqueo mAb (20 μ g/ml) durante 10 minutos a TA en una placa con fondo en forma de V, de 96 pocillos. Se añadieron perlas fluorescentes revestidas con ligandos (20 perlas/célula) y distintos estimulantes/inhibidores, incubándose la suspensión durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron las células y se volvieron a suspender en 100 μ l de TSA. La adhesión se determinó midiendo, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células que se habían unido a las perlas fluorescentes, utilizando el FACScan (Becton y Dickinson & Co., Oxnard, CA).

ES 2 307 502 T3

Ej. 9F

Ensayos de agrupación de células heterotípicas

5 La agrupación entre las células DC y las que expresan ICAM-3 se evaluó mediante citometría de flujo. Las células DC y las células que expresan ICAM-3 (2×10^6 células/ml) se marcaron respectivamente con sulfofluoresceína (Molecular Probes, Eugene, OR; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e hidroetidina (Molecular Probes, Eugene, OR; 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1 hora a 37°C. Después de lavado, las células DC y las que expresan ICAM-3 se mezclaron (50×10^3 células cada una de ellas) y se incubaron a 37°C. A distintos tiempos, las células se fijaron con paraformaldehído (0,5%) y se midió la agrupación de células heterotípicas mediante citometría de flujo, utilizando el FACScan (Becton and Dickinson & Co, Oxnard, CA).

10 La agrupación entre las células DC y los linfocitos T que permanecen se evaluó mediante un procedimiento diferente. Las DC (50×10^3 células) se preincubaron con/sin los anticuerpos anti-DC-SIGN AZN-D1 y AZN-D2 (10 g/ml) 15 durante 10 minutos a TA. Se añadieron PBC alogénicos (1×10^6 células), marcados con el colorante fluorescente calceína-A (Molecular Probes, Eugene, OR; 25 $\mu\text{g}/10^7$ células/ml durante 30 minutos a 37°C) y la mezcla celular se incubó a 37°C. La agrupación se determinó midiendo el porcentaje de DC que se ha unido a los linfocitos T fluorescentes por citometría de flujo utilizando el FACScan (Becton and Dickinson & Co., Oxnard, CA).

Ej. 9G

Ensayo de proliferación de los linfocitos T inducidos por las células DC

20 Linfocitos T alogénicos sensibles (100×10^3) se añadieron a las células DC estimuladoras ($1,5 \times 10^3$) en presencia de 25 anticuerpos bloqueantes (20 g/ml). Las células se cultivaron durante 4 días. En el día 4, se emitieron impulsos de [³H] metil-timidina a las células durante 16 horas (1,52 TBq/mmol, 0,5 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$; Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), y se cuantificó la absorción.

Ej. 9H

Infección de las células DC por el VIH-1

30 Se desarrolló el VIH-1_{Ba-L} a un título más alto en macrófagos derivados de monocitos (MDM). Siete días después de la titulación de la reserva vírica en los MDM, se determinó TCID₅₀ mediante un ensayo ELISA para el antígeno p24 35 (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, Francia), y se estimó en $10^4/\text{ml}$. Células DC (50×10^3) que se preincubaron con anticuerpos (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 20 minutos, a TA, se sometieron a la emisión de impulsos con el VIH-1_{Ba-L} de tipo salvaje, durante 2 horas (con una infección múltiple de 10^3 unidades infecciosas por 10^5 células), se lavaron y 40 cocultivaron con PBMC activados con PHA/IL-2 (50×10^3). Se recuperaron los sobrenadantes 3 y 5 días después del cocultivo de las células DC con los linfocitos T, midiéndose los niveles del antígeno p24 mediante un ensayo ELISA del antígeno p24 (Diagnostics Pasteur Marnes la Coquette, Francia). Los PBMC se activaron cultivándolos en presencia de IL-2 (10 U/ml) y PGA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Ej. 9I

Análisis inmunohistoquímico

45 Criocortes ($8 \mu\text{m}$) de amígdalas y nódulos linfáticos se fijaron en acetona al 100% (10 minutos), se lavaron con PBS y se incubaron con el primer anticuerpo (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 60 minutos a TA. Después del lavado, se llevó a cabo la tinción final con el equipo ABC-AP Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA), según el protocolo del 50 fabricante. La tinción nuclear se realizó con hemateína().

TABLA 1

55 *Nivel de expresión de DC-SIGN en las células hematopoyéticas, determinado mediante análisis de citometría de flujo y RT-PCR*

Tipo celular	Expresión DC-SIGN*	DC-SIGN ARNm ‡
Monocitos	-	-
Día 7 de DC	+++	+
PBL	-	-
Células T	-	-
Linfocitos B	-	-
Linfocitos B (amígdalas)\$	-	n.d.

ES 2 307 502 T3

TABLA 1 (continuación)

Tipo celular	Expresión DC-SIGN*	DC-SIGN ARNm ‡
Timocitos	-	-
Granulocitos	-	-
Células CD34+	-	n.d.
PBMC (activados#)	-	-
Progenies celulares T †	-	-
Prog. cel. monocíticas ‡‡	-	-

* significa fluorescencia: = <20., +++, >400 (tinción con AZN-D1)
 ‡ RT-PCR con los cebadores específicos XF29 y XR1265 de DC-SIGN sobre el ARN total aislado de las distintas células.
 \$ Aislado de las amígdalas
 # Activado con PHA (10 µg/ml) e IL-2 (10 U/ml) durante 2 días
 † Progenies celulares T: HSB, PEER, CEM y Jurkat
 ‡‡ Progenies celulares monocíticas: THP-1, MM6 y U937
 n.d., no determinado

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un anticuerpo que se une al receptor denominado DC-SIGN, en la superficie de una célula dendrítica y que se representa como SEC ID nº 2 o una variante natural o fragmento del mismo, en la preparación de un medicamento destinado a reducir una respuesta inmune en un animal, en la que dicho anticuerpo inhibe la interacción entre una célula dendrítica y un linfocito T.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la preparación de una composición para reducir una o más interacciones entre una célula dendrítica y un linfocito T.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1 y/o 2, en la preparación de una composición para reducir la adhesión entre un DC-SIGN en la superficie de una célula dendrítica y un receptor ICAM en la superficie de un linfocito T.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 3, en la que el receptor ICAM es el receptor ICAM-3 en la superficie de un linfocito T.
- 25 5. Utilización de un anticuerpo que se une al receptor denominado DC-SIGN en la superficie de una célula dendrítica y que se representa como SEC ID nº 2 o una variante natural o fragmento del mismo, en la preparación de un medicamento destinado a inhibir la adhesión de la proteína superficial del VIH a la superficie de una célula dendrítica.
- 30 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el animal es humano.
- 40 8. Anticuerpo dirigido contra el receptor denominado DC-SIGN en la superficie de una célula dendrítica y que se representa como SEC ID nº 2 o una variante natural o fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo inhibe la interacción entre una célula dendrítica y un linfocito T.
- 45 9. Anticuerpo según la reivindicación 8, que es un anticuerpo monoclonal.
- 50 10. Anticuerpo según la reivindicación 9, que es AZN-D1 y que se identifica como el número de registro de ECACC 99040818, o AZN-D2 que se identifica en la presente memoria como número de registro de ECACC 99040819.
- 55 11. Composición farmacéutica, que contiene por lo menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, y por lo menos otro portador, excipiente, adyuvantes y/o formulantes conocidos *per se*.
- 60 12. Utilización de un anticuerpo según las reivindicaciones 8 a 10, en la detección de células dendríticas en una muestra biológica.
- 65 13. Utilización de un anticuerpo según las reivindicaciones 8 a 10, en el aislamiento, preparación y/o purificación de células dendríticas a partir de una muestra biológica o de un medio de cultivo.
- 70 14. Procedimiento para producir, aislar y/o purificar células dendríticas a partir de una muestra biológica o de un medio de cultivo, que comprende las etapas que consisten en: a) poner en contacto una muestra biológica o un medio de cultivo que contiene células dendríticas con un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10; b) separar las células que se unen a dicho anticuerpo de las células que no se unen a dicho anticuerpo, y opcionalmente de cualquier otro constituyente de la muestra o del medio; y que comprende además opcionalmente la etapa que consiste en: c) separar las células que se unen al anticuerpo a partir de dicho anticuerpo.
- 75 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo se une a una columna o matriz, a perlas (para magnéticas o a un soporte sólido similar).
- 80 16. Procedimiento según la reivindicación 14 ó 15, en el que la muestra biológica es un líquido biológico, tal como sangre, plasma o líquido linfático.

60

65

Fig 1a

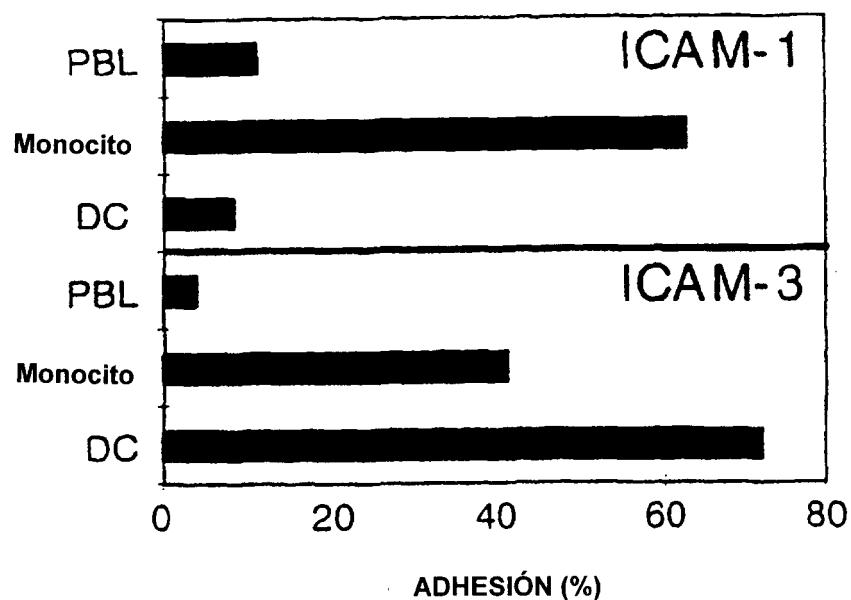


Fig 1b

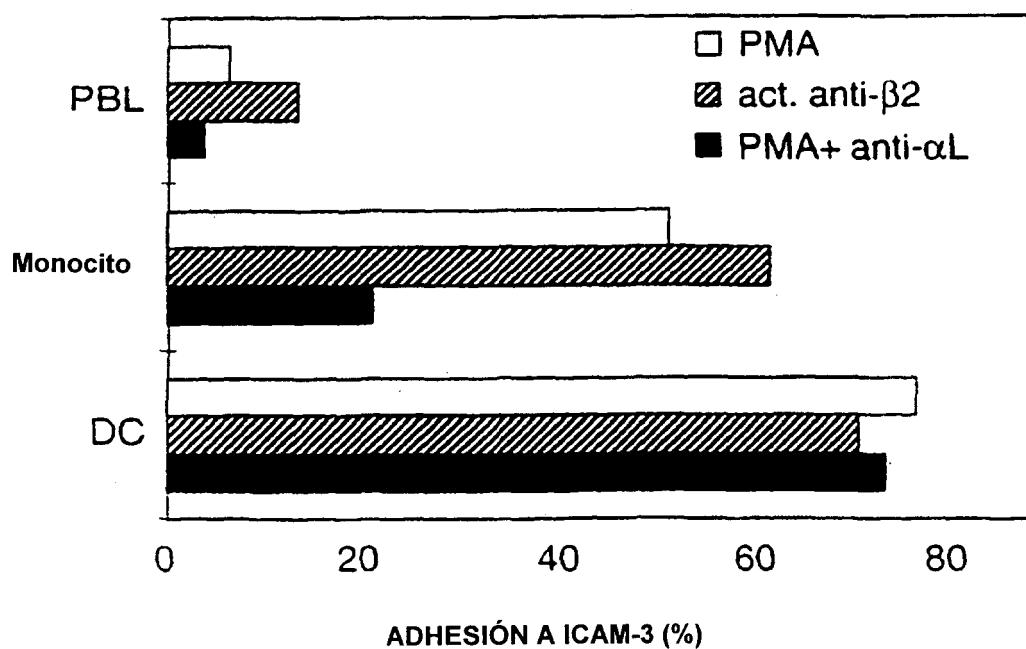


Fig 1c

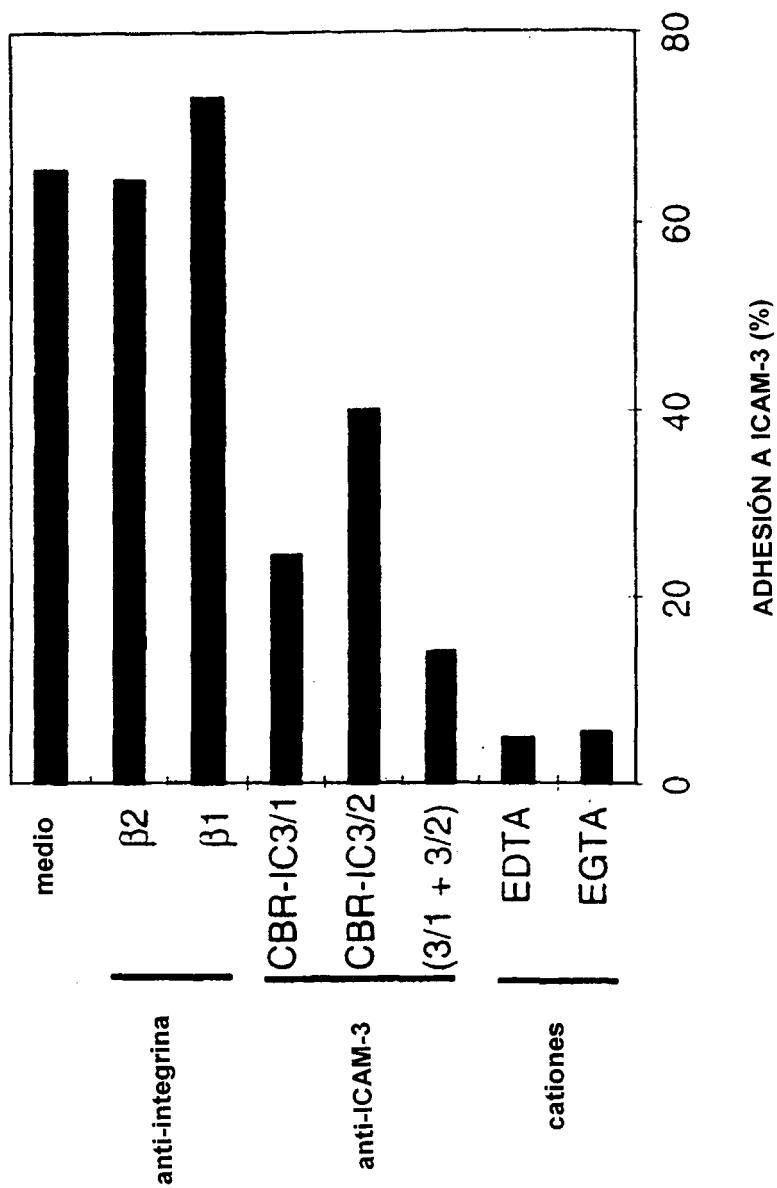


Fig 2a

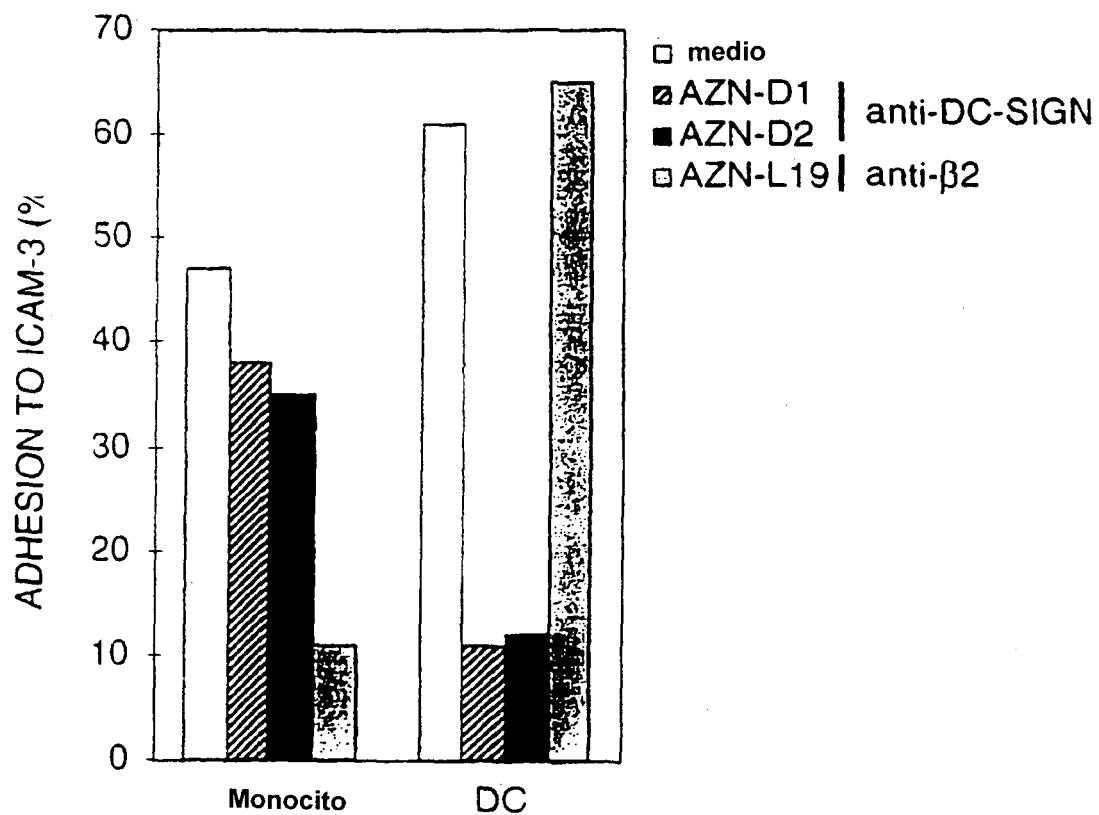


Fig 2b

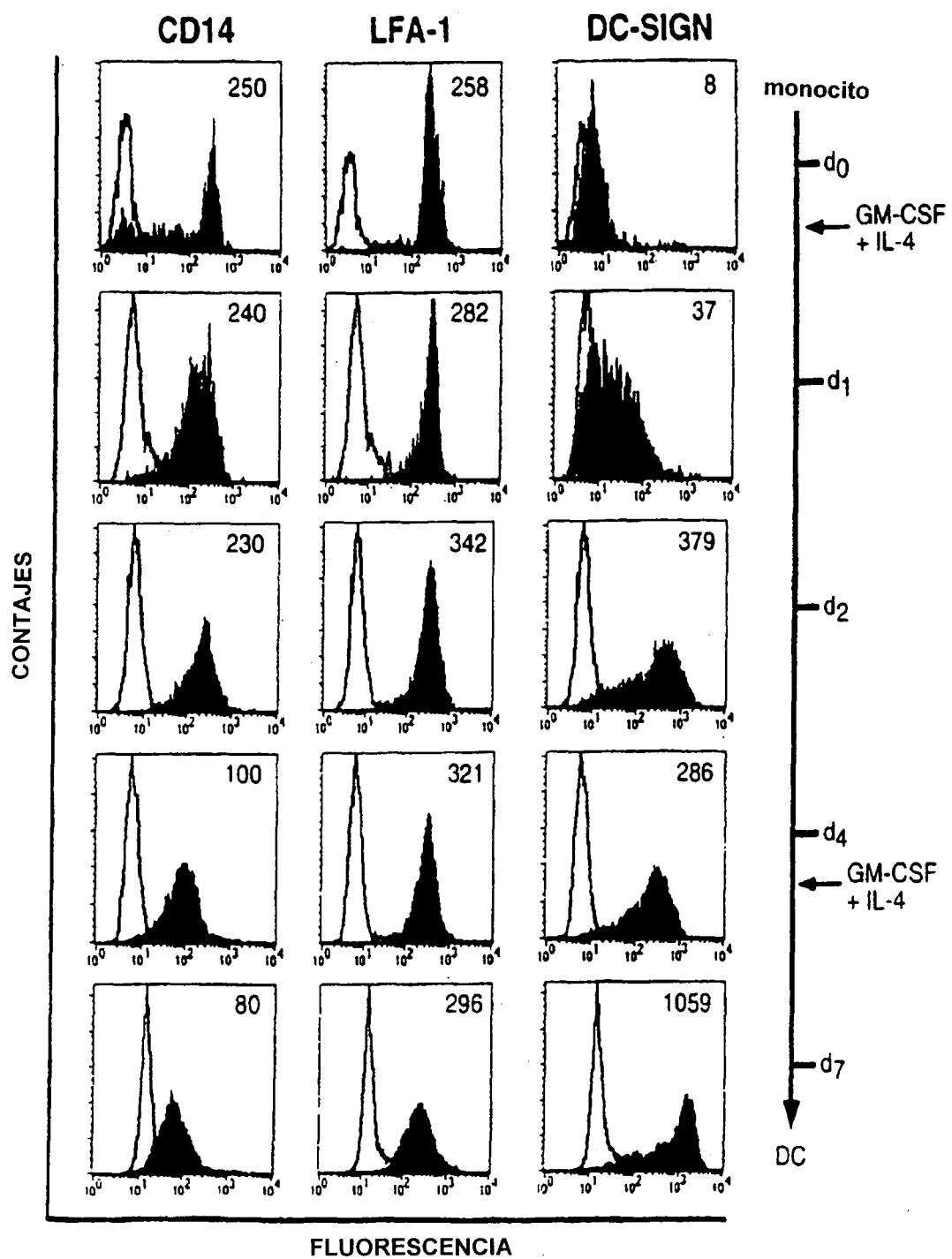


Fig 2c

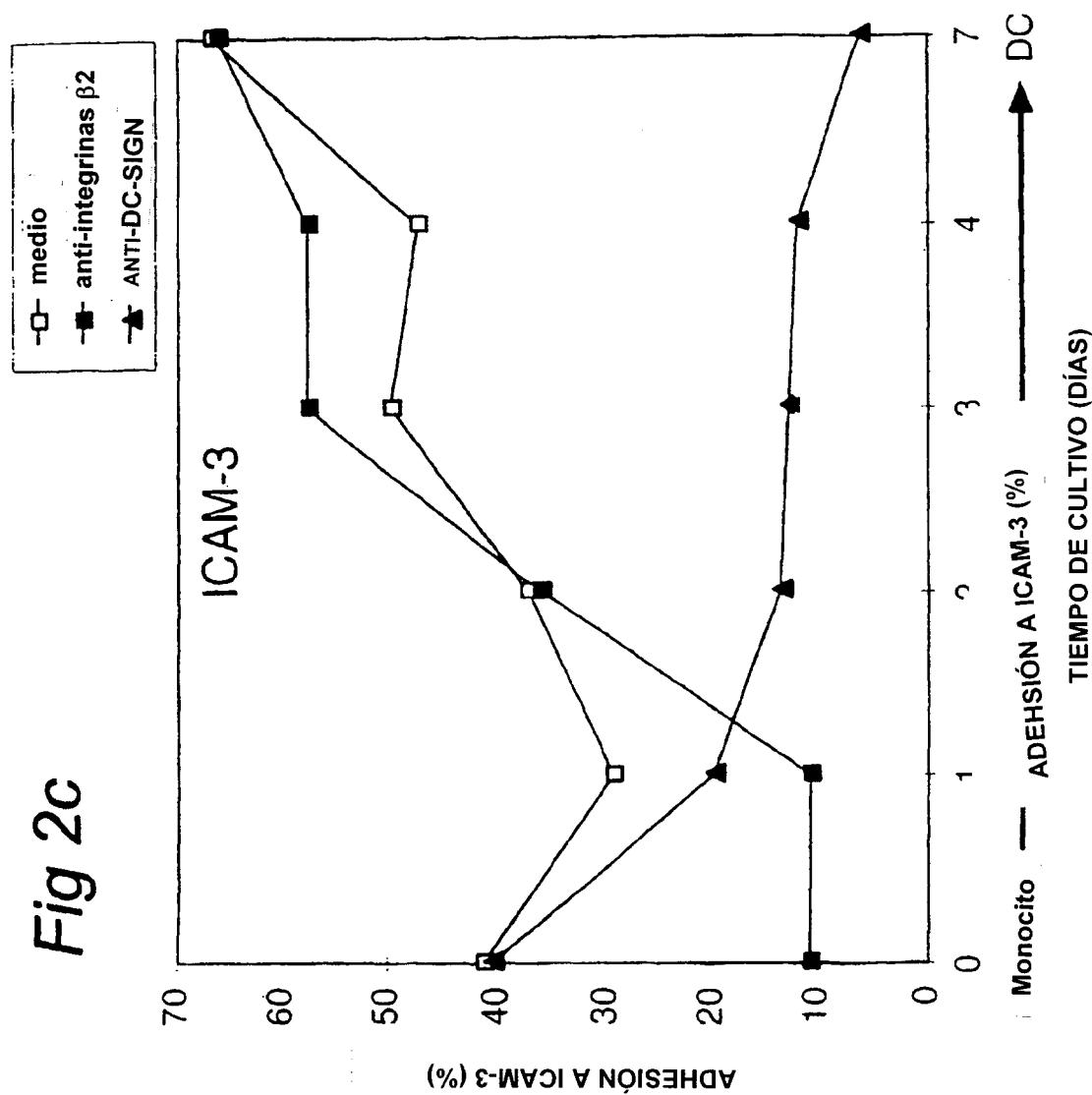


Fig 2d

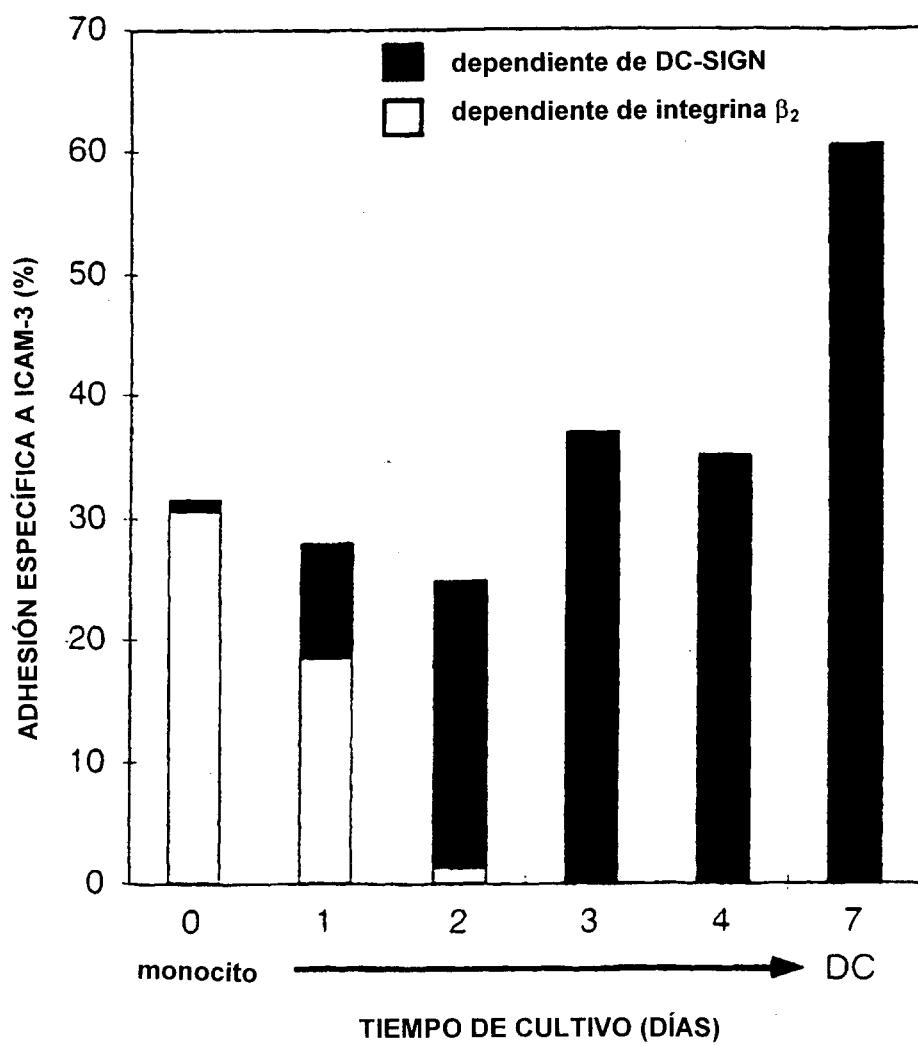


Fig 3a

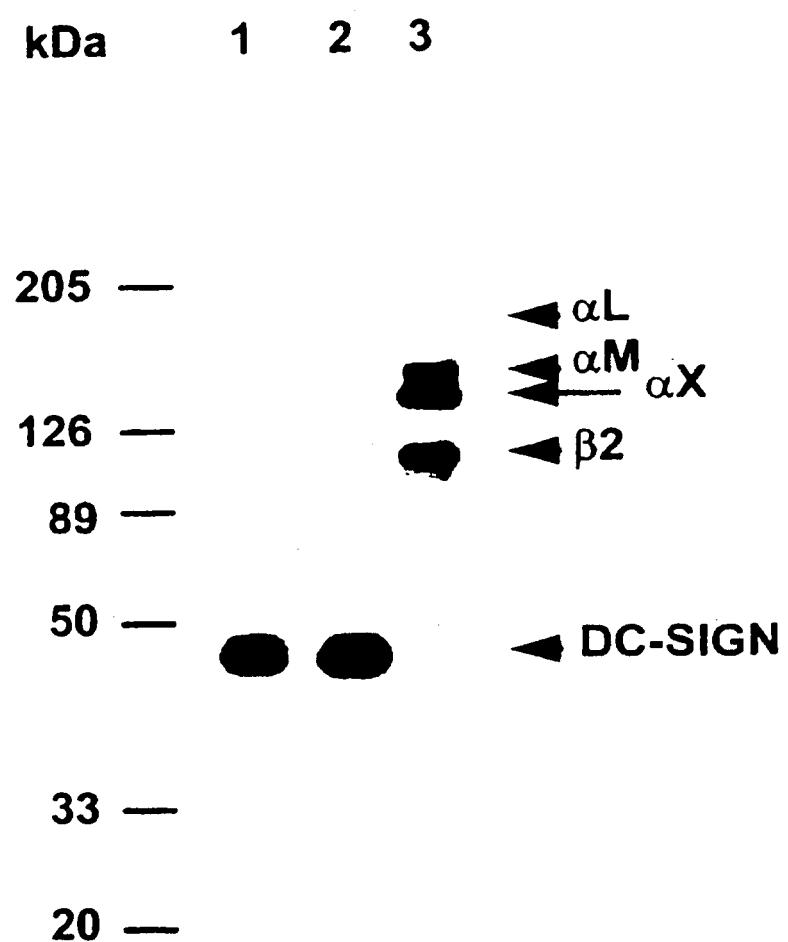


Fig 3b

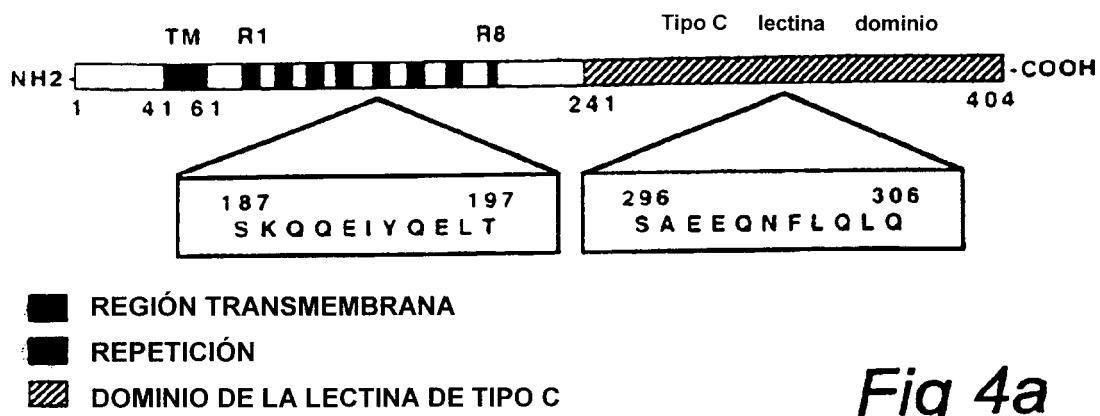


Fig 4a

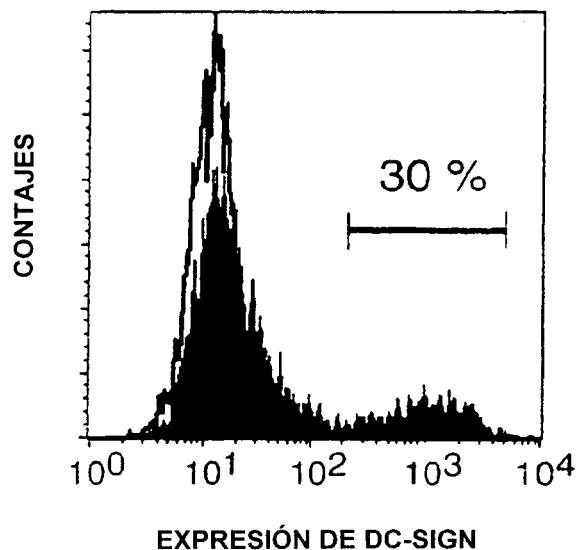


Fig 4b

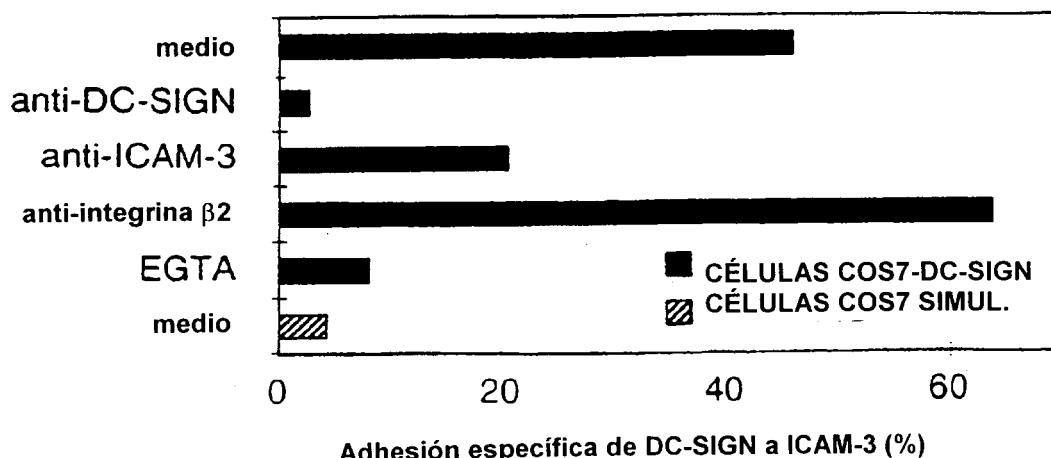
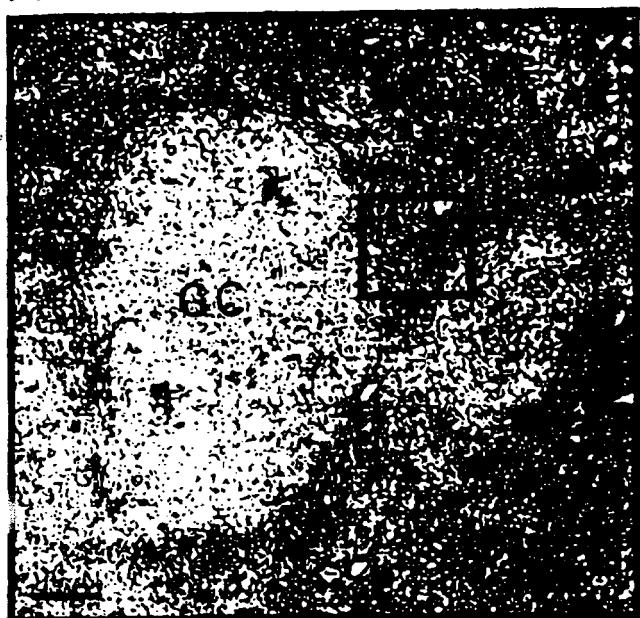
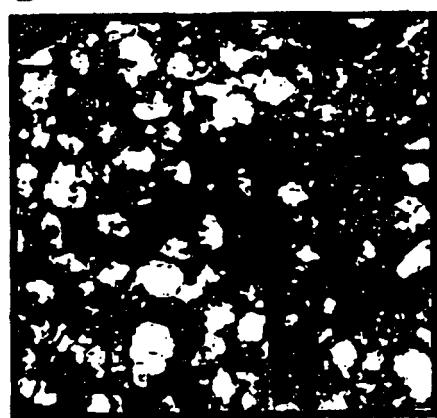


Fig 5

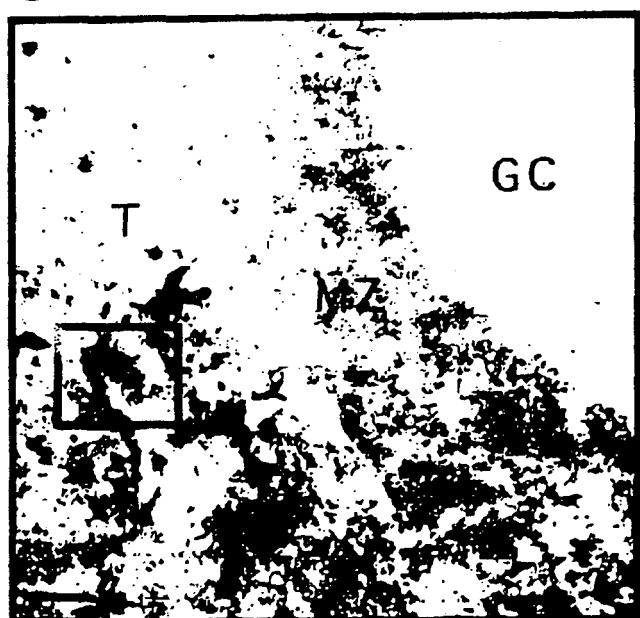
A



B



C



D

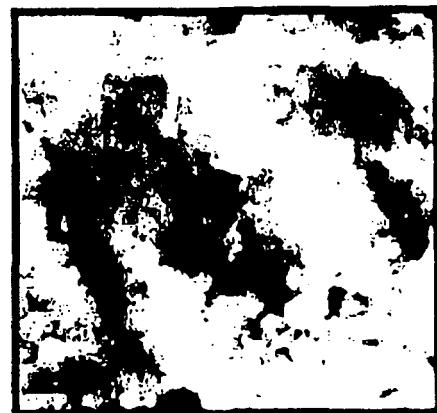


Fig 6a

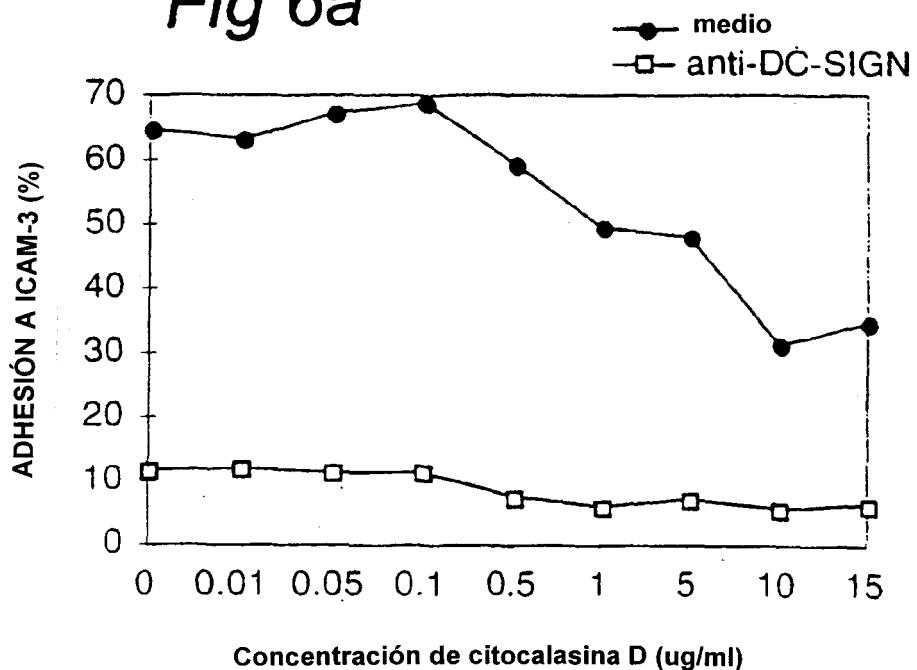


Fig 6c

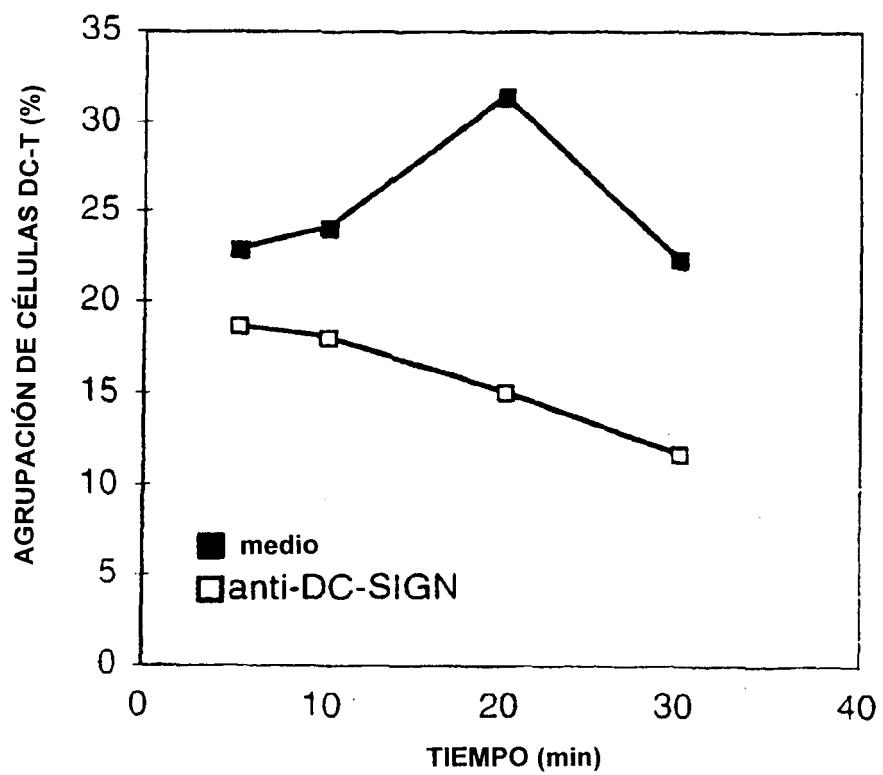


Fig 6b

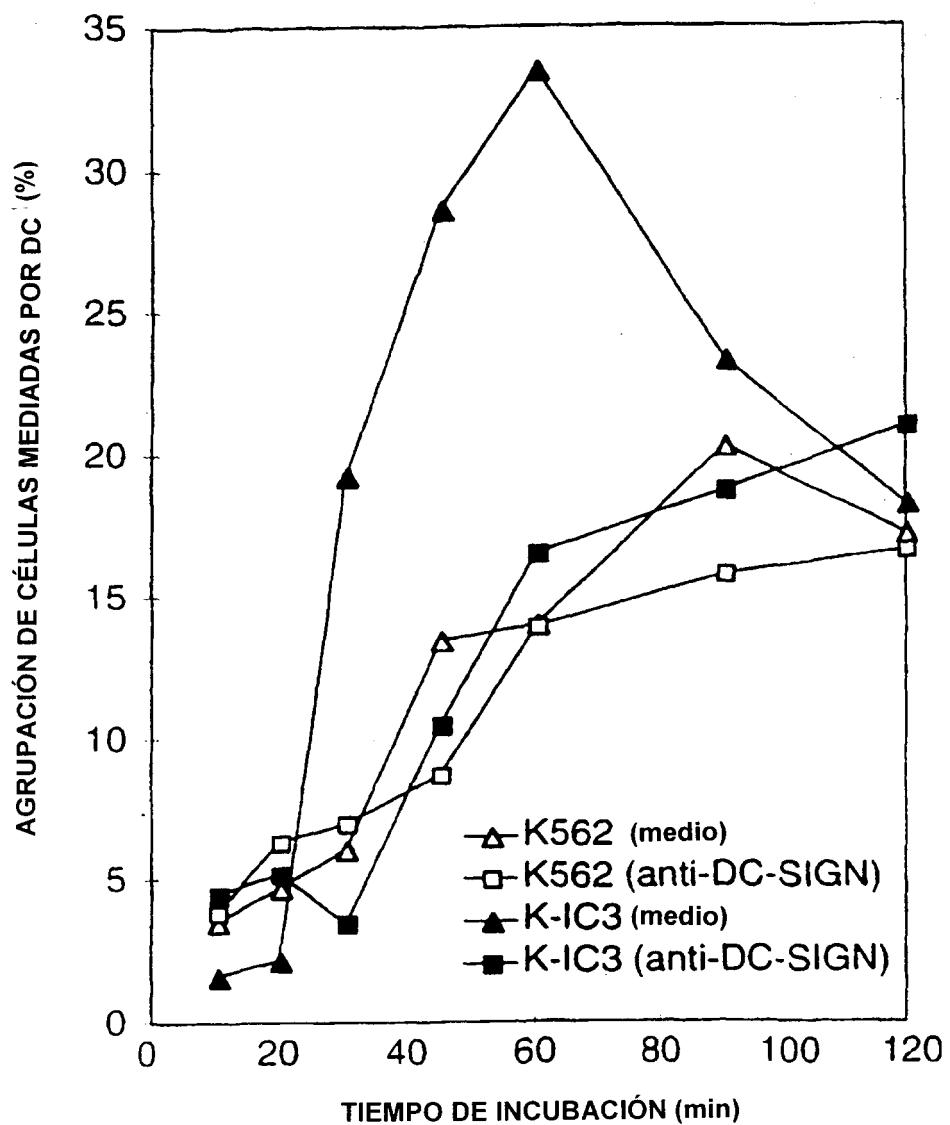


Fig 6d

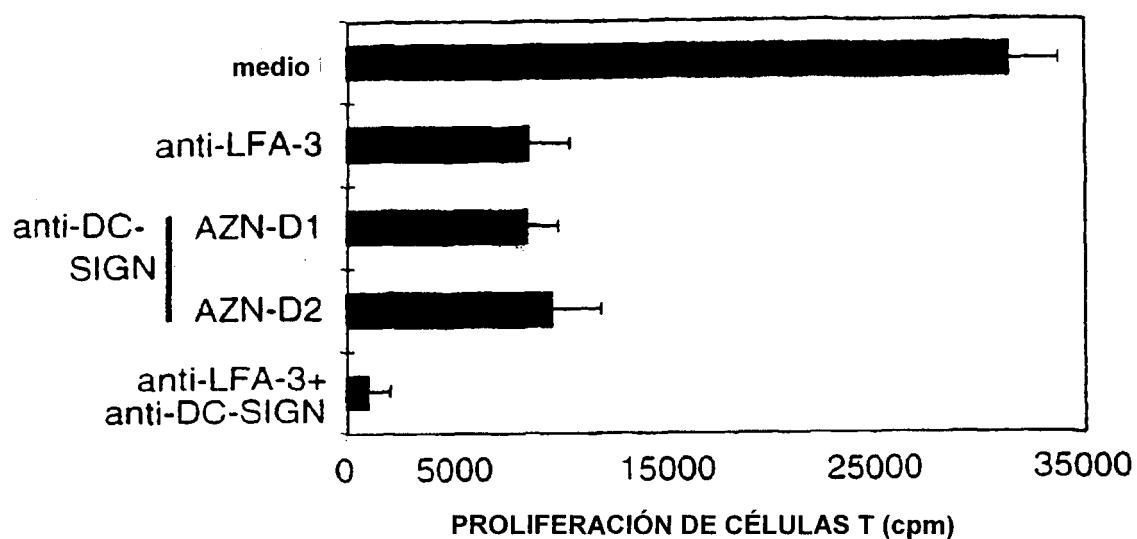


Fig 7

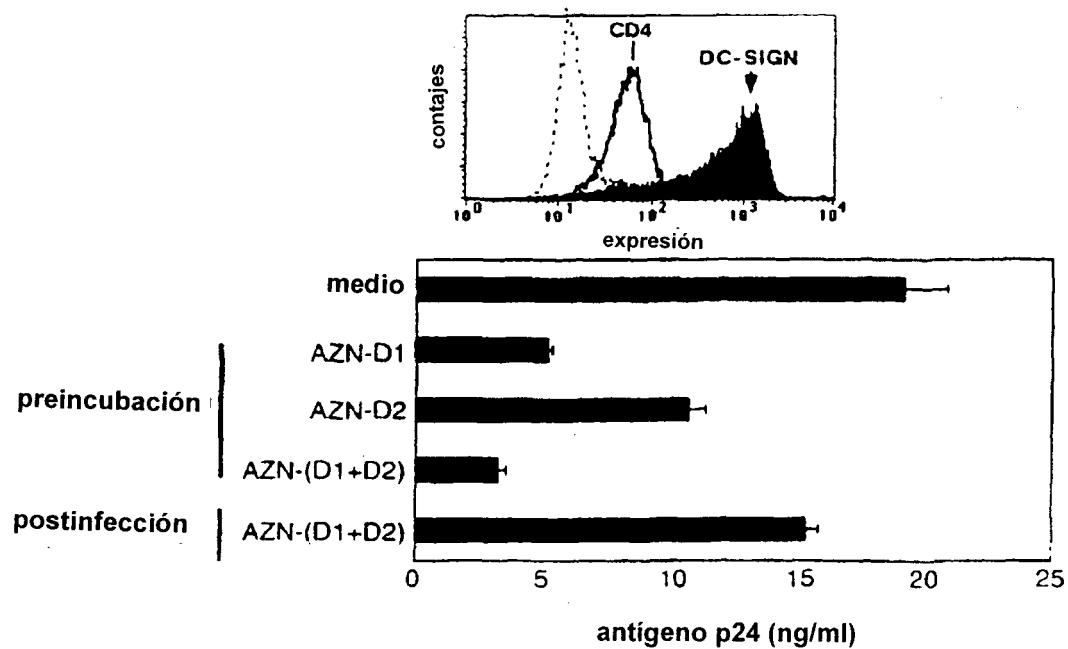


Fig 8

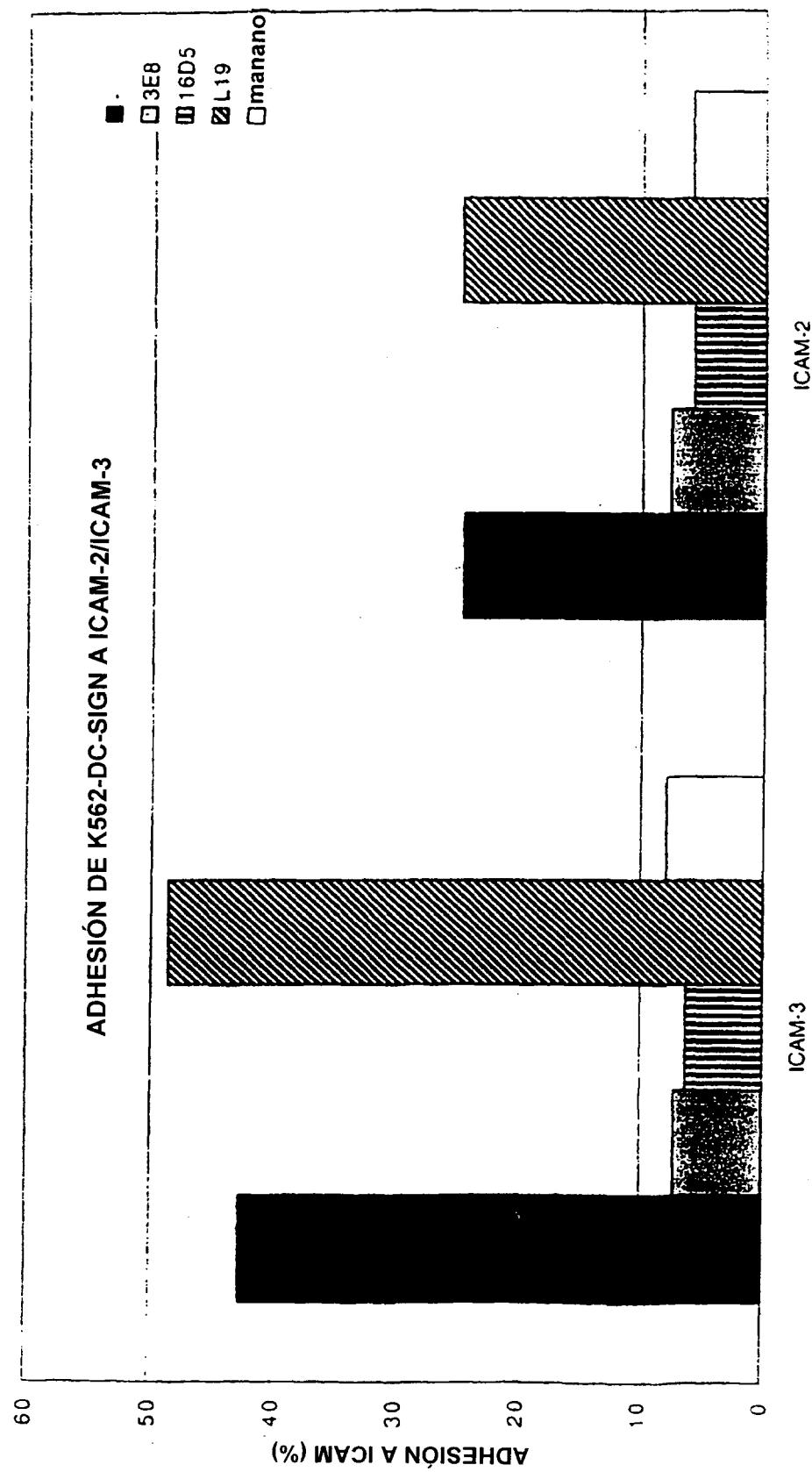


Fig 9

1/1 31/11
 ATG AGT GAC TCC AAG GAA CCA AGA CTG CAG CAG CTG GGC CTC CTG GAG GAA CAG CTG
 Met ser asp ser lys glu pro arg leu gln gln leu gly leu leu glu gln gln leu
 61/21 91/31
 AGA GGC CTT GGA TTC CGA CAG ACT CGA GGA TAC AAG AGC TTA GCA GGG TGT CTT GGC CAT
 arg gly leu gly phe arg gln thr arg gly tyr lys ser leu ala gly cys leu gly his
 121/41 151/51
 GGT CCC CTG GTG CTG CAA CTC CTC TCC TTC ACG CTC TTG GCT GGG CTC CTT GTC CAA GTG
 gly pro leu val leu gln leu leu ser phe thr leu leu ala gly leu leu val gln val
 181/61 211/71
 TCC AAG GTC CCC AGC TCC ATA AGT CAG GAA CAA TCC AGG CAA GAC GCG ATC TAC CAG AAC
 ser lys val pro ser ser ile ser gln glu gln ser arg gln asp ala ile tyr gln asn
 241/81 271/91
 CTG ACC CAG CTT AAA GCT GCA GTG GGT GAG CTC TCA GAG AAA TCC AAG CTG CAG GAG ATC
 leu thr gln leu lys ala ala val gly glu leu ser glu lys ser lys leu gln glu ile
 301/101 331/111
 TAC CAG GAG CTG ACC CAG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CTG
 tyr gln glu leu thr gln leu lys ala ala val gly gln leu pro glu lys ser lys leu
 361/121 391/131
 CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC CGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA
 gln glu ile tyr gln glu leu thr arg leu lys ala ala val gly glu leu pro glu lys
 421/141 451/151
 TCT AAG CTG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC TGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT
 ser lys leu gln glu ile tyr gln glu leu thr trp leu lys ala ala val gly glu leu
 481/161 511/171
 CCA GAG AAA TCT AAG ATG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACT CGG CTG AAG GCT GCA GTG
 pro glu lys ser lys met gln glu ile tyr gln glu leu thr arg leu lys ala ala val
 541/181 571/191
 GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC CGG CTG AAG
 gly glu leu pro glu lys ser lys gln gln glu ile tyr gln glu leu thr arg leu lys
 601/201 631/211
 GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC
 ala ala val gly glu leu pro glu lys ser lys gln gln glu ile tyr gln glu leu thr
 661/221 691/231
 CGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG
 arg leu lys ala ala val gly gln leu pro glu lys ser lys gln gln glu ile tyr gln
 721/241 751/251
 GAG CTG ACC CAG CTG AAG GCT GCA GTG GAA CGC CTG TGC CAC CCC TGT CCC FGG GAA TGG
 glu leu thr gln leu lys ala ala val glu arg leu cys his pro cys pro trp glu trp
 781/261 811/271
 ACA TTC TTC CAA GGA AAC TGT TAC TTC ATG TCT AAC TCC CAG CGG AAC TGG CAC GAC TCC
 thr phe phe gln gly asn cys tyr phe met ser asn ser gln arg asn trp his asp ser
 841/281 871/291
 ATC ACC GCC TGC AAA GAA GTG GGG GCC CAG CTC GTC GTA ATC AAA AGT GCT GAG GAG CAG
 ile thr ala cys lys glu val gly ala gln leu val val ile lys ser ala glu gln
 901/301 931/311
 AAC TTC CTA CAG CTG CAG TCT TCC AGA AGT AAC CGC TTC ACC TGG ATG GGA CTT TCA GAT
 asn phe leu gln leu gln ser ser arg ser asn arg phe thr trp met gly leu ser asp
 961/321 991/331
 CTA AAT CAG GAA GGC ACG TGG CAA TGG GTG GAC GGC TCA CCT CTG TTG CCC AGC TTC AAG
 leu asn gln glu gly thr trp gln trp val asp gly ser pro leu leu pro ser phe lys
 1021/341 1051/351
 CAG TAT TGG AAC AGA GGA GAG CCC AAC AAC GTT GGG GAG GAA GAC TGC GCG GAA TTT AGT
 gln tyr trp asn arg gly gln pro asn val gly gln glu asp cys ala glu phe ser
 1081/361 1111/371
 GGC AAT GGC TGG AAC GAC GAC AAA TGT AAT CTT GCC AAA TTC TGG ATC TGC AAA AAG TCC
 gln asp gly trp asn asp asp lys cys asn leu ala lys phe trp ile cys lys lys ser
 1141/381 1171/391
 GCA GCC TCC TGC TCC AGG GAT GAA GAA CAG TTT CTT TCT CCA GCC CCT GCC ACC CCA AAC
 ala ala ser cys ser arg asp glu gln phe leu ser pro ala pro ala thr pro asp
 1201/401
 CCC CCT CCT GCG TAG
 pro pro pro ala END

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: Koninklijke Universiteit Nijmegen, Afdeling tumorimmunologie
(B) DIRECCIÓN: Philips van Leydenlaan 25
10 (C) CIUDAD: Nijmegen
(E) PAÍS: Netherlands
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 6525 EX
(G) TELÉFONO: + 31 243 617 600
15 (H) TELEFAX: + 31 243 540 339

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: disquete
20 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0. Versión #1.30

25 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Composición y procedimiento para modular la interacción entre células dendríticas y linfocitos T.

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1215 pares de bases
35 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO FILAMENTO: sencillo
(D) TOPOLOGÍA: linear

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:

50

55

60

65

ES 2 307 502 T3

	ATGAGTGACT CCAAGGAACC AAGACTGCAG CAGCTGGCC TCCTGGAGGA GGAACAGCTG	60
	AGAGGCCCTTG GATTCCGACA GACTCGAGGA TACAAGAGCT TAGCAGGGTG TCTTGGCCAT	120
5	GGTCCCCCTGG TGCTGCACT CCTCTCCTTC ACGCTTTGG CTGGGCTCCT TGTCCAAGTG	180
	TCCAAGGTCC CCAGCTCCAT AAGTCAGGAA CAATCCAGGC AAGACGCGAT CTACCAGAAC	240
	CTGACCCAGC TTAAAGCTGC AGTGGGTGAG CTCTCAGAGA AATCCAAGCT GCAGGAGATC	300
10	TACCAAGGAGC TGACCCAGCT GAAGGCTGCA GTGGGTGAGC TTCCAGAGAA ATCTAAGCTG	360
	CAGGAGATCT ACCAGGAGCT GACCCGGCTG AAGGCTGCAG TGGGTGAGCT TCCAGAGAAA	420
	TCTAAGCTGC AGGAGATCTA CCAGGAGCTG ACCTGGCTGA AGGCTGCAGT GGGTGAGCTT	480
15	CCAGAGAAAT CTAAGATGCA GGAGATCTAC CAGGAGCTGA CTCGGCTGAA GGCTGCAGTG	540
	GGTGAGCTTC CAGAGAAATC TAAGCAGCAG GAGATCTACC AGGAGCTGAC CCGGCTGAAG	600
	GCTGCAGTGG GTGAGCTTCC AGAGAAATCT AAGCAGCAGG AGATCTACCA GGAGCTGACC	660
20	CGGCTGAAGG CTGCAGTGGG TGAGCTTCCA GAGAAATCTA AGCAGCAGGA GATCTACCAAG	720
	GAGCTGACCC AGCTGAAGGC TGCAAGTGGAA CGCCTGTGCC ACCCCTGTCC CTGGGAATGG	780
	ACATTCTTCC AAGGAAACTG TTACTTCATG TCTAACTCCC AGCGGAACGT GCACGACTCC	840
25	ATCACCGCCT GCAAAGAAGT GGGGGCCAG CTCGTCGTAAC TCAAAAGTGC TGAGGAGCAG	900
	AACTTCCCTAC AGCTGCAGTC TTCCAGAAAGT AACCGCTTCA CCTGGATGGG ACTTTCAGAT	960
	CTAAATCAGG AAGGCACGTG GCAATGGGTG GACGGCTCAC CTCTGTTGCC CAGCTTCAAG	1020
30	CAGTATTGGA ACAGAGGAGA GCCCAACAAC GTTGGGGAGG AAGACTGCAG GGAATTTAGT	1080
	GGCAATGGCT GGAACGACGA CAAATGTAAT CTTGCCAAAT TCTGGATCTG CAAAAAGTCC	1140
	GCAGCCTCCT GCTCCAGGGA TGAAGAACAG TTTCTTCTC CAGCCCCCTGC CACCCCCAAC	1200
35	CCCCCTCCTG CGTAG	1215

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA ID nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

- (A) LONGITUD: 415 aminoácidos
- (B) TIPO: amino ácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 2:

50

55

60

65

ES 2 307 502 T3

	Met Ser Asp Ser Lys Glu Pro Arg Leu Gln Gln Leu Gly Leu Leu				
	1	5	10	15	
5	Glu Glu Glu Gln Leu Arg Gly Leu Gly Phe Arg Gln Thr Arg Gly				
	20	25	30		
10	Tyr Lys Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly His Gly Pro Leu Val Leu				
	35	40	45		
	Gln Leu Leu Ser Phe Thr Leu Leu Ala Gly Leu Leu Val Gln Val				
	50	55	60		
15	Ser Lys Val Pro Ser Ser Ile Ser Gln Glu Gln Ser Arg Gln Asp				
	65	70	75		
20	Ala Ile Tyr Gln Asn Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu				
	80	85	90		
	Leu Ser Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr				
	95	100	105		
25	Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu				
	110	115	120		
30	Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly				
	125	130	135		
	Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu				
	140	145	150		
35	Thr Trp Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys				
	155	160	165		
40	Met Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val				
	170	175	180		
	Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln Glu				
	185	190	195		
45	Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser				
	200	205	210		
50	Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala				
	215	220	225		
	Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln				
	230	235	240		
55	Glu Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Glu Arg Leu Cys His Pro				
	245	250	255		
60	Cys Pro Trp Glu Trp Thr Phe Phe Gln Gly Asn Cys Tyr Phe Met				
	260	265	270		

ES 2 307 502 T3

Ser Asn Ser Gln Arg Asn Trp His Asp Ser Ile Thr Ala Cys Lys
275 280 285

10 Asn Phe Leu Gln Leu Gln Ser Ser Arg Ser Asn Arg Phe Thr Trp
305 310 315

Met Gly Leu Ser Asp Leu Asn Gln Glu Gly Thr Trp Gln Trp Val
320 325 330

15 Asp Gly Ser Pro Leu Leu Pro Ser Phe Lys Gln Tyr Trp Asn Arg
225 240 245

Gly Glu Pro Asn Asn Val Gly Glu Glu Asp Cys Ala Glu Phe Ser
 20 350 355 360

Gly Asn Gly Trp Asn Asp Asp Lys Cys Asn Leu Ala Lys Phe Tr
 365 370 375

380 385 390

35

40

45

50