



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 207 634**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **92925316 .9**

86 Fecha de presentación : **16.11.1992**

87 Número de publicación de la solicitud: **0614374**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.1994**

54 Título: **El anticuerpo monoclonal murino (5c8) reconoce una glicoproteína humana en la superficie de linfocitos T.**

30 Prioridad: **15.11.1991 US 792728**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.06.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.06.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.06.2008**

73 Titular/es: **The Trustees of Columbia University in the City of New York
Broadway and West 116th Street
New York, New York 10027-6699, US**

72 Inventor/es: **Lederman, Seth;
Chess, Leonard y
Yellin, Michael, J.**

74 Agente: **Dávila Baz, Ángel**

ES 2 207 634 T5

DESCRIPCIÓN

El anticuerpo monoclonal murino (5c8) reconoce una glicoproteína humana en la superficie de linfocitos T.

La invención descrita en este documento se realizó durante el trabajo bajo las becas N° PO1-AI-26886, RO-1-AI-14969, RO-1-CA-55713 y la beca de Formación en Inmunología AI-07132 de los Institutos Nacionales de la Salud. Por lo tanto, el gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

A lo largo de esta solicitud, se citan diversas publicaciones por el apellido de los autores, seguido del año de publicación entre paréntesis. Las citas completas de estas publicaciones se pueden encontrar al final de la memoria descriptiva, inmediatamente antes de las reivindicaciones. Las descripciones de estas publicaciones se incorporan como referencia en esta solicitud con el fin de describir con más detalle el estado de la técnica como se conoce por los especialistas hasta la fecha de la invención descrita y reivindicada aquí.

En un proceso dependiente de contacto denominado “función cooperadora de células T”, los linfocitos T CD4⁺ dirigen la activación y diferenciación de los linfocitos B y de este modo regulan la respuesta inmune humoral mediante la modulación de la especificidad, secreción y funciones codificadas por el isotipo de las moléculas de anticuerpo (Mitchell, *et al.*, 1968; Michison, 1971; White, *et al.*, 1978; Reinherz, *et al.*, 1979; Janeway, *et al.*, 1988; O’Brien, *et al.*, 1988; Rahemtulla, *et al.*, 1991; y Grusby, *et al.*, 1991). Las moléculas de superficie de las células T que median los elementos dependientes del contacto de la función cooperadora de células T aún no se conocen por completo (Noelle, *et al.*, 1991).

El proceso por el cual las células T ayudan a las células B a diferenciarse se ha dividido en dos fases distintas: las fases inductora y efectora (Vitetta, *et al.*, 1989; Noelle, *et al.*, 1990). En la fase inductora, las células T en reposo contactan con las células B sensibilizadas por antígeno y esta asociación permite a los complejos receptor de células T clonotípico (TCR)-CD4 interactuar con los complejos Ia/Ag en las células B (Janeway, *et al.*, 1988; Katz, *et al.*, 1973; Zinkernagel, 1976; Sprent, 1978a; Sprent, 1978b; Jones, *et al.*, 1981; Julius, *et al.*, 1982; Chestnut, *et al.*, 1981; Rogozinski, *et al.*, 1984). El reconocimiento de TCR/CD4 del Ia/Ag da como resultado la formación de pares afines T-B estables y la activación bidireccional de las células T y B (Sanders, *et al.*, 1986; Snow, *et al.*, 1983; Krusemeier, *et al.*, 1988; Noelle, *et al.*, 1989; Bartlett, *et al.*, 1989; Kupfer, *et al.*, 1987). En la fase efectora, las células T activadas dirigen la diferenciación de las células B secretando linfoquinas (Noelle, *et al.*, 1983; Thompson, *et al.*, 1985) y mediante estímulos dependientes de contacto (Noelle, *et al.*, 1989; Clement, *et al.*, 1984; Crow, *et al.*, 1986; Brian, 1988; Hirohata, *et al.*, 1988; Jover, *et al.*, 1989; Whalen, *et al.*, 1988; Pollok, *et al.*, 1991; Bartlett, *et al.*, 1990), siendo ambos necesarios para que las células T dirijan a las células B en reposo pequeñas a diferenciarse en último término en células secretoras de Ig (Clement, *et al.*, 1984; Martinez, *et al.*, 1981; Andersson, *et al.*, 1980).

Aunque la fase inductora de la cooperación de células T es dependiente de Ag y está restringida al MHC (Janeway, *et al.*, 1988; Katz, *et al.*, 1973; Zinkernagle, 1976; Sprent, 1978a; Sprent, 1978b; Jones, *et al.*, 1981; Julius, *et al.*, 1982; Chestnut, *et al.*, 1981; Andersson, *et al.*, 1980) la fase efectora de la función cooperadora de células T puede ser independiente de Ag y no restringida al MHC (Clement, *et al.*, 1984; Hirohata, *et al.*, 1988; Whalen, *et al.*, 1988; Andersson, *et al.*, 1980; DeFranco, *et al.*, 1984; Julius, *et al.*, 1988a; Julius, *et al.*, 1988b; Riedel, *et al.*, 1988; Owens, 1988; Cambier, *et al.*, 1988; Tohma, *et al.*, 1991; Lohoff, *et al.*, 1977). Una característica de contraste adicional es que la fase inductora de la cooperación de células T a menudo requiere moléculas CD4 y se inhibe por mAb anti-CD4 (Rogozinski, *et al.*, 1984), mientras que la función efectora de la cooperación no requiere moléculas CD4 (Friedman, *et al.*, 1986) y no se inhibe por mAb anti-CD4 (Brian, 1988; Hirohata, *et al.*, 1988; Whalen, *et al.*, 1988; Tohma, *et al.*, 1991). Se cree que la función efectora cooperadora no específica se centra en dianas de células B específicas por la naturaleza localizada de las interacciones de células T-B con pares afines específicos de antígeno (Bartlett, *et al.*, 1989; Kupfer, *et al.*, 1987; Poo, *et al.*, 1988).

Aunque la diferenciación terminal de células B necesita tanto el estímulo mediado por contacto como el mediado por linfoquinas que proporcionan las células T, las etapas intermedias de diferenciación de células B pueden inducirse por superficies de células T activadas en ausencia de factores secretados (Crow, *et al.*, 1986; Brian, 1988; Sekita, *et al.*, 1988; Hodgkin, *et al.*, 1990; Noelle, *et al.*, 1991; Kubota, *et al.*, 1991). Estos efectos intermedios sobre las células B incluyen la inducción de la expresión en la superficie de CD23 (Crow, *et al.*, 1989; Jover, *et al.*, 1989; Crow, *et al.*, 1989), enzimas asociadas con la progresión del ciclo celular (Pollok, *et al.*, 1991) y capacidad de responder a las linfoquinas (Noelle, *et al.*, 1989; Pollok, *et al.*, 1991; Tohma, *et al.*, 1991; Hodgkin, *et al.*, 1990; Noelle, *et al.*, 1991; Kubota, *et al.*, 1991). Aunque no se han identificado las moléculas de superficie de células T inducidas por activación que dirigen la activación de células B, ciertos estudios funcionales han caracterizado algunos aspectos de su inducción y su bioquímica. En primer lugar, las células T adquieren la capacidad de estimular a las células B de 4 a 8 h después de la activación (Bartlett, *et al.*, 1990; Tohma, *et al.*, 1991). En segundo lugar, la actividad estimuladora de células B asociada con las superficies de células T activadas se conserva en células fijadas en paraformaldehído (Noelle, *et al.*, 1989; Crow, *et al.*, 1986; Pollok, *et al.*, 1991; Tohma, *et al.*, 1991; Kubota, *et al.*, 1991) y en fragmentos purificados de membrana (Hodgkin, *et al.*, 1990; Martinez, *et al.*, 1981). En tercer lugar, la actividad estimuladora de células B es sensible al tratamiento con proteasa (Noelle, *et al.*, 1989; Sekita, *et al.*, 1988; Hodgkin, *et al.*, 1990). En cuarto lugar, el proceso de adquisición de estas estructuras activas de superficie que sigue a la activación de células T se inhibe por ciclohexamida (Tohma, *et al.*, 1991; Hodgkin, *et al.*, 1990). Aunque estos estudios sugieren claramente la existencia

de proteínas de superficie de células T inducidas por activación que envían estímulos dependientes de contacto a las células B, aún se desconoce la identidad molecular de tales estructuras.

Se ha publicado previamente (Yellin, *et al.*, 1991) el aislamiento de un subclón de Jurkat CD4⁻ (D1.1) que posee la capacidad funcional única de activar células B que expresen moléculas CD23 en la superficie y de sustentar la diferenciación terminal de las células B en presencia de lectinas. Las células B activadas por Jurkat D1.1 de un gran número de donantes no relacionados sugerían que el efecto de D1.1 era independiente de Ag y no restringido al MHC. Se descubrió que el mecanismo de activación de células B mediado por Jurkat D1.1 era dependiente del contacto célula-célula o de una estrecha proximidad ya que células D1.1 fijadas con paraformaldehído, pero no los factores secretados, poseían la capacidad de inducir CD23 en las células B. Además, el efecto de D1.1 sobre las células B no se inhibía por anticuerpos anti-IL-4. Por otro lado, el efecto de D1.1 sobre las células B era distinto del de la IL-4, porque la rIL-4, pero no D1.1, inducía la regulación positiva de la IgM de superficie de células B (IgMs) (Yellin, *et al.*, 1991; Shields, *et al.*, 1989). Considerados en conjunto, estos datos sugerían que Jurkat D1.1 y las células T CD4⁺ activadas compartían estructuras de superficie que proporcionan elementos dependientes de contacto de la cooperación de células T a las células B (Yellin, *et al.*, 1991).

En esta solicitud se generó un mAb IgG2a murino (5c8) que inhibe la activación de células B mediada por D1.1 y que inmunoprecipita una nueva proteína sin puentes disulfuro de 30 kilodaltons (kD) de la superficie de D1.1. En células T normales, el antígeno 5c8 se expresa transitoriamente en la superficie de células T CD4⁺ activadas de manera que necesita la síntesis del ARNm y de la proteína. En estudios funcionales, el mAb 5c8 inhibe la capacidad de las células T para mediar la activación y diferenciación terminal de células B. Considerados en conjunto, estos datos demuestran que el Ag 5c8 es un componente importante de las estructuras de superficie de la célula T inducidas por activación que median el estímulo dependiente de contacto para la diferenciación de células B.

25 Sumario de la invención

Esta invención proporciona las modalidades caracterizadas en las reivindicaciones. Así, proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente y forman un complejo con la proteína 5c8 situada sobre la superficie de células T activadas, inhibiendo de ese modo la activación por células T de células B, siendo la proteína 5c8 una proteína a la que se unen específicamente anticuerpos monoclonales 5c8 producidos por el hibridoma que tiene el N° de Registro de la ATCC HB 10916. Esta invención también proporciona el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC 10916.

Esta invención proporciona una línea celular de células T CD4⁻ de leucemia denominada D1.1 con el N° de Registro de la ATCC CRL 10915 capaz de proporcionar constitutivamente una función cooperadora dependiente de contacto con las células B. Esta invención también proporciona una proteína aislada de la superficie de células T activadas, donde la proteína es necesaria para la activación de células B por parte de células T. Esta invención también proporciona una proteína soluble aislada de la superficie de células T activadas, donde la proteína es necesaria para la activación de las células B por parte de células T.

Esta invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para una proteína que es reconocida específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916.

45 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Fenotipo de la superficie celular de Jurkat D1.1 CD4⁻. Se muestra el análisis de fluorescencia de los histogramas (FACS) de Jurkat D1.1 CD4⁻ y de B2.7 CD4⁺. El eje Y representa el número de células y el eje X representa la intensidad relativa de fluorescencia. Los mAb usados son: OKT3 (anti-CD3), OKT4 (anti-CD4), W6/32 (anti-MHC I). "Control" representa la tinción de fondo en ausencia de mAb primario añadido.

Figura 2. Jurkat D1.1 induce la expresión de CD23 en los linfocitos B en reposo. Se muestran los análisis FACS de doble tinción de células B de alta densidad de adherencia deplecionada después de 24 h de cultivo solas (medios) o con Jurkat CD4⁻ (D1.1) o Jurkat CD4⁺ (B2.7) usando anti-IgM-FITC o anti-CD20 (Leu-16)-FITC (en el eje X) y anti-CD23-PE (en el eje Y) (Becton-Dickinson). Los números mostrados en la esquina superior derecha de cada histograma representan el porcentaje de todas las células seleccionadas que expresan ambas moléculas. La población de células B cultivadas con Jurkat D1.1 expresaban el CD23 en el 66% de las células IgM⁺ y en el 69% de las células CD20⁺ en comparación con las células B cultivadas con B2.7 (16% de las células IgM⁺ y 16% de las células CD20⁺). En el experimento mostrado, la tinción FACS de un solo color demostró que la población de células B pequeñas de alta densidad constaba de un 2% de CD3 (OKT3)⁺, un 84% de IgM⁺, un 84% de CR2 (THB-5)⁺ y un 87% de CD20 (Leu-16)⁺.

Figura 3. Dosis-respuesta de la expresión de CD23 inducida por D1.1. Se muestran los porcentajes de células IgM⁺ que expresan CD23 después de 24 h de cultivo con variaciones de las proporciones de células D1.1 o B2.7 o sobrenadantes celulares. Las condiciones experimentales y el análisis FACS de doble tinción se realizaron como se describe en la leyenda de la figura 2, con la excepción de que la relación de Jurkat añadida a 2 x 10⁵ células se varió como se muestra. Los sobrenadantes se obtuvieron 48 h después de cultivar 1 x 10⁵ células D1.1 o B2.7 en 1 ml de medio Dulbecco modificado de Iscove/10% de FCS y de pasarse a través de filtros de 0,2 µm antes de la adición a

las células B. El nivel de fondo (células B solas) de la expresión de CD23 de las células IgM⁺ fue del 12%. En este experimento, la población de células B fue de un 65% de IgM⁺.

Figura 4. La figura demuestra que Jurkat D1.1 induce la proliferación de células B en presencia de PHA. Se muestra la captación de [³H]timidina de células B cultivadas con células Jurkat tratadas con mitomicina C en presencia de la combinación indicada de rIL-2 (25 U/ml), rIL-4 (25 U/ml), PHA (5 µg/ml) o medio de control. Las barras de error representan las desviaciones típicas de las medias de cultivos por triplicado.

Figura 5. Jurkat D1.1 induce la diferenciación de células B en células secretoras de Ig. A. Número de colonias formadoras de placas por 10⁵ células B inducidas por las relaciones indicadas de Jurkat D1.1 o B2.7 con respecto a células B en presencia o ausencia de PWM. B. IgG en los sobrenadantes del mismo experimento que 1A). Las células E⁻ son la población de Percoll de alta densidad de adherencia y roseta E deplecionadas que predominantemente son células B. Las células E⁺ son células T en reposo roseta E-positivas tratadas con mitomicina C. La medición de Ig se realizó mediante un ELISA de sándwich cuantitativo y las barras de error representan la desviación típica calculada basándose en las curvas patrón.

Figura 6. La rIL-4, pero no D1.1, aumentaba la expresión de IgMs en células B. Se muestran los análisis FACS de doble tinción resultantes de experimentos similares a los de la figura 3. La concentración mostrada de anti-IL-4 es de 1,25 µg/ml y la concentración de rIL-4 es de 50 U/ml. En la columna derecha se muestra el canal medio de fluorescencia de la IgM.

Figura 7. Unión del mAb 5c8 a células Jurkat D1.1. Se muestran los análisis de los histogramas de fluorescencia (FACS) de células Jurkat D1.1 CD4⁻ y células Jurkat B2.7 CD4⁺. El eje Y representa el número de células y el eje X representa la intensidad relativa de fluorescencia. Los mAb usados son: OKT3 (anti-CD3), OKT4 (anti-CD4), OKT8 (anti-CD8), W6/32 (anti-MHC I) y el mAb 5c8. FITC representa la tinción de fondo de un mAb de control de isotipo compatible.

Figura 8. El mAb 5c8 inhibe la expresión de CD23 inducida por Jurkat D1.1 en linfocitos B. Se muestran los análisis de doble tinción FACS de células B de alta densidad de adherencia deplecionada tras 24 h de cultivo solas o con clones de Jurkat D1.1 o B2.7 usando anti-IgM-FITC (en el eje X) y anti-CD23-PE (en el eje Y). El número que aparece en la esquina superior derecha de los trazados de FACS representa el porcentaje de células IgM⁺ que expresaban CD23. El mAb W6/32 estaba presente a 1 µg/ml, y el mAb 5c8 a una dilución 1:200 del sobrenadante del hibridoma. El mAb IgG2a murino W6/32 reconoce un determinante monomórfico en las moléculas de MHC de clase I.

Figura 9. Análisis por SDS/PAGE de las proteínas de superficie inmunoprecipitadas por el mAb 5c8 y por los mAb de control. Se muestran los autorradiogramas de los inmunoprecipitados con el mAb 5c8 o con los mAb de control procedentes de lisados celulares de células Jurkat D1.1 y Jurkat B2.7 de superficies yodadas que se separaron en geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia (reducido, R) o ausencia (no reducido, NR) de 2-ME. Los mAb mostrados son anti-CD28 (KOLT-4) y anti-MHC de clase I (W6/32). Los marcadores de peso molecular representan la migración de patrones premarcados. NMS: suero normal de ratón.

Figura 10. Efectos de la activación de células T e inhibidores metabólicos sobre la expresión del antígeno 5c8 en células T activadas. Se muestran los histogramas de FACS de células T en reposo y activadas usando el mAb 5c8 o anti-CD69 como se indica. La activación de células T se marcó por PMA (10 ng/ml) y PHA (10 µg/ml) durante 5 h en presencia de actinomicina D (10 µM) o ciclohexamida (100 µM).

Figura 11. Cinética de la expresión de 5c8 en subclases de células T CD4⁺ o CD8⁺ aisladas. Se muestran los histogramas de fluorescencia de (a, b, c) células CD4⁺ o (d, e, f) células CD8⁺ en los puntos de tiempo indicados después de que las subclases de células T recién purificadas se activaran con PHA (10 µg/ml) y PMA (10 ng/ml). Línea continua: unión de 5c8; línea discontinua: control de IgG2a; línea de puntos: anti-CD69.

Figura 12. D1.1 induce la expresión de CD23 en la superficie de células B o RAMOS 266 de una manera que se inhibe por el mAb 5c8 (anti-T-BAM) o el mAb G28-5 (anti-CD40). Se muestran los histogramas FACS de doble tinción de anti-IgM-FITC en el eje X y anti-CD23-PE en el eje Y de células B (columna izquierda) o RAMOS 266 (columna derecha), después del cultivo con los clones de Jurkat D1.1 y B2.7 como se indica. El número en la esquina superior derecha se refiere al porcentaje de células B IgM⁺ que expresan CD23 en la superficie en experimentos que implican a las células B, o la intensidad de fluorescencia media de CD23 en RAMOS 266 en experimentos de RAMOS 266.

Figura 13. Efecto de D1.1 sobre células B de amígdala. Se muestra el porcentaje de células B IgM⁺ que expresan CD23 mediante análisis FACS de doble tinción después de cultivar las células D1.1 y B2.7 con células B de amígdala durante 18 h en presencia del mAb 5c8 (IgG2a anti-T-BAM), W6/32 (IgG2a anti-MHC de clase I), anti-LFA-1a (IgG1) y B-B20 (IgG1 anti-CD40).

Figura 14. Papeles de T-BAM y CD40 en la activación de células B por D1.1. Se muestran gráficos de barras que representan datos de FACS de doble tinción de los porcentajes de células B IgM⁺ que expresan CD23 en la superficie (eje Y izquierdo, barras rayadas) o la intensidad media de fluorescencia de CD23 (eje Y derecho, barras cuadrículadas) de RAMOS 266 tras 18 h en cultivo con clones de Jurkat D1.1 o B2.7, o en presencia de linfoquinas como se indica.

(a.) rIL-4 y rIL-2 estaban presentes a 10 unidades/ml, anti-IL-4 y anti-GM-CSF ("CSF") estaban presentes a 10 μ g/ml.
 (b.) Los mAb indicados se añadieron al inicio del cultivo a concentraciones saturantes.

Figura 15. Efecto de los mAb anti-CD40 sobre la activación por D1.1 de células B periféricas. Se muestran los resultados del análisis FACS de doble tinción de células B IgM⁺ cultivadas con células D1.1 en presencia de los mAb indicados durante 18 h.

Figura 16. Efecto de anti-CD40 en células L CD32⁺ sobre la expresión de CD23 en células B. Se muestran los resultados del análisis FACS de doble tinción de cultivos de (a.) células B periféricas o RAMOS 266 y (b.) células B de amígdala y bazo después de 18 h de cultivo con monocapas de células L I-A⁺ (células L) o células L FcRgII⁺ (células CD32⁺) en presencia del mAb indicado o de medio de control. En (a.) el eje Y izquierdo muestra el porcentaje de células B IgM⁺ que expresan CD23 y el eje Y derecho muestra la MFI (intensidad media de fluorescencia) de CD23 en RAMOS (descrito en la leyenda de la fig. 1). En (b.) "control" se refiere a anti-LFA1a para el experimento de amígdala y anti-CR2 (THB-5) para el experimento de bazo.

Figura 17. Expresión de T-BAM en tejidos linfoides normales humanos. La expresión de T-BAM se evaluó en cortes de tejido congelado de (A., B.) amígdala normal [A. x25, B. x40] y (C.) ganglios linfáticos normales (x25) y bazo normal (D. x25; E. x63) usando el mAb 5c8 y una técnica de ABC modificada (véase la sección de Materiales y Métodos). La positividad de T-BAM se manifiesta como tinción de la membrana.

Figura 18. Modelo de interacciones moleculares T-B.

Figura 19. Expresión de T-BAM en linfocitos T CD4⁺ en pannus sinovial de artritis reumatoide. Se muestran los cortes teñidos inmunohistoquímicamente de un folículo linfoide en el pannus sinovial de un paciente con artritis reumatoide celular activa. (a,b) tinción con diaminobencidina (DAB) de anti-CD3 (a. baja resolución, b. alta resolución). (c.) doble tinción anti-CD4 (tinción azul fucsina, APAP) y anti-T-BAM (mAb 5c8, marrón, DAB). (d.) anti-CD8 (tinción azul fucsina, APAP) y anti-T-BAM (mAb 5c8, marrón, DAB). En conjunto, estas muestras demuestran que T-BAM se expresa en células T CD4⁺ implicadas en la inflamación sinovial de la artritis reumatoide.

Figura 20. Expresión de T-BAM en linfocitos T que infiltran lesiones psoriásicas. Se muestra la tinción inmunohistoquímica de una muestra de biopsia de piel de una lesión psoriásica (a. baja resolución), (b. alta resolución) - infiltración de células T en la dermis. Expresión de T-BAM detectada por el mAb 5c8 y diaminobencidina (DAB) (marrón).

Figura 21. Expresión de T-BAM en células de linfoma no-Hodgkin. Se muestran las preparaciones inmunohistoquímicas de ganglios linfáticos de dos pacientes con linfoma no-Hodgkin manifestándose las células T T-BAM⁺ (marrón, DAB) (a. 630x y b. 400x).

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona las modalidades caracterizadas en las reivindicaciones. Así, proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente y forman un complejo con la proteína 5c8 situada sobre la superficie de células T activadas, inhibiendo de ese modo la activación por células T de células B, siendo la proteína 5c8 una proteína a la que se unen específicamente anticuerpos monoclonales 5c8 producidos por el hibridoma que tiene el N° de Registro de la ATCC HB 10916.

Esta invención proporciona un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente y forma un complejo con una proteína localizada en la superficie de células T activadas, inhibiendo de esta manera la activación de las células T. Las células T activadas se encuentran normalmente sólo en los centros germinales de los ganglios linfáticos de un animal. Sin embargo, se encuentran células T activadas en la sangre periférica de animales que padecen tumores de células T, por ejemplo, leucemias y linfomas de células T, o en tejidos infiltrados de enfermedades tales como la artritis reumatoide y la psoriasis.

El anticuerpo monoclonal descrito y reivindicado en la presente invención se une a células T que están interactuando con células B en los centros germinales de los ganglios linfáticos y no a otras células T en individuos sanos. Los anticuerpos monoclonales conocidos por los especialistas en la técnica que reconocen específicamente y se unen a proteínas de la superficie de células T y, por tanto, inhiben la activación de células B, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD28 y el anticuerpo monoclonal anti-LFA-1, no distinguen las células activadas.

Para los fines de esta invención, las "células T activadas" son células T capaces de proporcionar una función cooperadora de células T a células B en reposo. Para los fines de esta invención, "centros germinales de ganglios linfáticos" son las áreas en los ganglios linfáticos donde las células T proporcionan la función cooperadora de células T a las células B.

Para los fines de esta invención, un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por una célula de hibridoma. Los métodos de preparación de células de hibridoma que sintetizan anticuerpos monoclonales son bien conocidos por los especialistas en la técnica, por ejemplo, mediante la fusión de un linfocito B productor de anticuerpos con una línea celular de linfocitos B immortalizada.

En una realización de esta invención, las células B son células B en reposo. En otra realización de esta invención, las células B son células B sensibilizadas. Para los fines de esta invención, células B “en reposo” son células B inactivas, es decir, células B indiferenciadas que no sintetizan moléculas de anticuerpo. Para los fines de esta invención, células B “sensibilizadas” son células B que han estado en contacto con el antígeno y, por lo tanto, se han activado parcialmente, pero aún no sintetizan moléculas de anticuerpo.

En una realización de esta invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino. En otra realización de esta invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal quimérico. En otra realización más de esta invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado. Sin embargo, en la realización preferida de esta invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano.

Para los fines de esta invención, un anticuerpo monoclonal “quimérico” es un anticuerpo monoclonal murino que contiene fragmentos de la región constante (F_c) de un animal diferente. En una realización preferida de esta invención, el anticuerpo monoclonal quimérico contiene el F_c humano y el F_{ab} murino. Para los fines de esta invención, un anticuerpo monoclonal “humanizado” es un anticuerpo monoclonal murino en el que todas las secuencias de proteínas murinas se han substituido por secuencias de proteínas humanas, excepto las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas ligera y pesada murinas.

En una realización de esta invención, el anticuerpo monoclonal está dirigido contra el epítipo que reconoce específicamente el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB10916. En otra realización más de esta invención, el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal 5c8.

Esta invención también proporciona una célula de hibridoma productora del anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una proteína que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916. Para los fines de esta invención, una “célula de hibridoma” es una célula formada por la fusión de una célula inmortalizada y una célula productora de anticuerpos, formando de este modo una célula que fabrica un anticuerpo monoclonal. En una realización, la célula de hibridoma correspondía con el N° de Registro de la ATCC HB 10916 que se depositó el 14 de noviembre de 1991 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A. según la disposición del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes.

En una realización de esta invención, el anticuerpo monoclonal está marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, enzima, colorante o biotina. En otra realización de esta invención, el anticuerpo monoclonal está conjugado con un agente terapéutico, por ejemplo, un radioisótopo, toxina, toxoide o agente quimioterapéutico. En otra realización más de esta invención, el anticuerpo monoclonal está conjugado con un agente para la formación de imágenes, por ejemplo, un radioisótopo.

Esta invención proporciona una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para los fines de esta invención “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales. Los ejemplos de vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con fosfato que contiene Polysorb 80, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas.

Típicamente, tales vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sus sales, magnesio o estearato cálcico, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Tales vehículos también pueden incluir aditivos aromatizantes y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por métodos convencionales bien conocidos.

Tales vehículos son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles, comprimidos, comprimidos recubiertos y cápsulas.

Los anticuerpos monoclonales descritos y reivindicados en la presente invención son útiles para el aislamiento de las proteínas a las que se unen los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales también son valiosos en nuevos métodos para: inhibir la respuesta inmune en un animal; modular la respuesta inmune en enfermedades caracterizadas por disfunciones inmunes tales como enfermedades autoinmunes o enfermedades infecciosas con manifestaciones autoinmunes tales como la enfermedad de Lyme, sífilis, tuberculosis e infecciones por VIH; formar imágenes de tumores o neoplasias en un animal; detectar la presencia de un tumor o neoplasia en un animal; determinar si un animal porta las células tumorales que lo componen; inhibir la proliferación de células T tumorales en un animal que padece un cáncer de células T; e inhibir la infección viral de las células T de un animal.

Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal. En una realización de esta invención, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN. Preferiblemente, la molécula de ADN es una molécula de ADNc.

A lo largo de esta solicitud, las referencias a nucleótidos específicos se refieren a nucleótidos presentes en la cadena codificante del ácido nucleico. A lo largo de la memoria descriptiva, se usan las siguientes abreviaturas convencionales para indicar nucleótidos específicos:

C=citosina	A=adenina
T=timidina	G=guanosa

Las moléculas de ADN de la presente invención también incluyen moléculas de ADN que codifican para análogos polipeptídicos, fragmentos o derivados de polipéptidos antigénicos que se diferencian de las formas naturales en términos de la identidad o localización de uno o más restos aminoacídicos (análogos de delección que contienen menos restos que los especificados para la proteína, análogos de sustitución donde uno o más restos aminoacídicos se han reemplazado por otros restos y análogos de adición donde uno o más restos aminoacídicos se añaden a una porción media o terminal de los polipéptidos) y que comparten algunas o todas las propiedades de las formas naturales. Éstas incluyen: la incorporación de codones "preferidos" para la expresión en hospedadores no mamíferos seleccionados; el suministro de sitios de escisión para enzimas endonucleasas de restricción; y el suministro de secuencias de ADN inicial, terminal o intermedia adicionales que faciliten la construcción de vectores que se expresen fácilmente.

Las secuencias de ácidos nucleicos descritas y reivindicadas en la presente invención son útiles para generar nuevos vectores virales y plasmídicos circulares descritos más adelante. Las moléculas de ácido nucleico también son valiosas en un método nuevo y útil de terapia génica, es decir, mediante la transformación estable de células aisladas de un animal con las moléculas de ácido nucleico y la posterior readministración de las células transformadas de forma estable al animal. Los métodos de aislamiento de células incluyen cualquiera de los métodos convencionales de extracción de células de un animal. Las células aisladas adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de médula ósea. Los métodos de readministración de células incluyen cualquiera de los métodos convencionales de readministración de células a un animal.

Esta invención proporciona un vector de transferencia génica, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal unida operativamente a un promotor de transcripción de ARN. Esta invención también proporciona un vector de transferencia génica, por ejemplo un vector plasmídico o viral, que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal unida operativamente a un promotor de transcripción de ARN.

Los vectores de transferencia génica descritos y reivindicados en la presente invención son valiosos como productos útiles para generar células hospedadoras eucariotas transformadas de forma estable y, por lo tanto, en métodos nuevos y útiles de crecimiento de tales células hospedadoras en condiciones adecuadas para la producción de una proteína.

Esta invención proporciona un sistema de vector hospedador que contiene los vectores de transferencia génica descritos y reivindicados en la presente invención en una célula hospedadora adecuada. En una realización de esta invención, la célula hospedadora adecuada es una célula eucariótica transformada de forma estable, por ejemplo, una célula transformada de forma estable de levadura o de mamífero. En la realización preferida de esta invención, la célula eucariótica transformada de forma estable es una célula de mamífero transformada de forma estable.

El sistema de vector hospedador descrito y reivindicado en la presente invención es valioso en un método nuevo y útil para la síntesis de un anticuerpo monoclonal, que comprende cultivar el sistema de vector hospedador en condiciones adecuadas para la producción del anticuerpo monoclonal.

Esta invención proporciona una línea celular de leucemia de células T CD4⁺ humana denominada D1.1 con el N° de Registro de la ATCC CRL 10915, capaz de proporcionar constitutivamente una función cooperadora dependiente de contacto con células B. Las células D1.1 se depositaron el 14 de noviembre de 1991 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A. según la disposición del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes. En una realización de esta invención, las células B son células B en reposo. En otra realización de esta invención, las células B son células B sensibilizadas.

La línea celular descrita y reivindicada en la presente invención, es valiosa como fuente de la proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC 10916. La proteína aislada es valiosa por la información que proporciona con respecto a las secuencias de nucleótidos que la codifican. Las secuencias de nucleótidos son valiosas en un método nuevo y útil de producción de la proteína soluble de la superficie de la célula T activada descrita y reivindicada en la presente invención. La línea celular también es valiosa en métodos nuevos y útiles para inmunizar a un animal contra un antígeno proteico y para la selección de compuestos farmacéuticos por su capacidad para inhibir la activación de células B por células T.

Esta invención proporciona una proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916.

Esta invención también proporciona la proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC 10916, donde la proteína aislada procede de la superficie de células T activadas y es necesaria para la inducción y diferenciación terminal de células B por las células T. En esta solicitud, “diferenciación terminal” significa que las células están comprometidas para una cierta secreción de Ig y este término es bien conocido por un especialista habitual.

Esta invención también proporciona una proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC 10916 y con un peso molecular aparente de 30 kilodaltons. La proteína procede de la superficie de células T activadas y es necesaria para la activación de células B por células T.

En una realización de esta invención, las células B son células B en reposo. En otra realización de esta invención, las células B son células B sensibilizadas.

Esta invención también proporciona una proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916 que tiene la secuencia, Xaa-Ile-Glu-Xaa-Tyr-Asn-Gln-Xaa-Ser-Pro- (SEC ID N°. 11) en el extremo N-terminal. En la solicitud, “Xaa” puede ser cualquier resto aminoácido.

Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de superficie de las células T. En una realización de esta invención, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN. Preferiblemente, la molécula de ADN es una molécula de ADNc. Las moléculas de ácido nucleico son valiosas como productos para generar nuevos vectores virales y plasmídicos circulares descritos más adelante. Las moléculas de ácido nucleico también son valiosas en un método nuevo y útil de terapia génica, es decir, mediante la transformación estable de células aisladas de un animal con las moléculas de ácido nucleico y la posterior readministración de las células transformadas de forma estable al animal. Los métodos de aislamiento de células incluyen cualquiera de los métodos convencionales de extracción de células de un animal. Las células aisladas convencionales incluyen, pero sin limitación, células de médula ósea. Los métodos de readministración de células incluyen cualquiera de los métodos convencionales de readministración de células a un animal.

Esta invención también proporciona un vector de transferencia génica, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, que contiene la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de superficie de la célula T activada.

Los vectores de transferencia génica descritos y reivindicados en la presente invención son valiosos como productos útiles para la generación de células hospedadoras eucarióticas transformadas de forma estable y, de ese modo, en métodos nuevos y útiles de desarrollo de tales células hospedadoras en condiciones adecuadas para la producción de una proteína.

Esta invención también proporciona un sistema de vector hospedador que contiene el vector de transferencia génica en una célula hospedadora adecuada. En una realización de esta invención, la célula hospedadora adecuada es una célula bacteriana, célula de insecto, célula de levadura o célula de mamífero.

El sistema de vector hospedador es valioso como producto útil para la síntesis a gran escala de la proteína de superficie de la célula T activada mediante el crecimiento del sistema de vector hospedador en condiciones adecuadas para la producción de la proteína. De este modo, también se proporciona un método de producción de la proteína de superficie de la célula T activada. Esta invención también proporciona la proteína producida por este método.

Esta invención proporciona una proteína aislada soluble procedente de la superficie de las células T activadas necesaria para la activación de células B por las células T. En una realización de esta invención, las células B son células B en reposo. En otra realización de esta invención, las células B son células B sensibilizadas.

Para los fines de esta invención, una “proteína soluble” es una proteína sin membranas celulares y sin otros componentes celulares. Preferiblemente, la proteína soluble es la proteína que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916. En una realización de esta invención, la proteína soluble está marcada con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, enzima, colorante o biotina. La proteína soluble es valiosa como producto para la fabricación una composición farmacéutica nueva y útil.

De este modo, también se proporciona una composición farmacéutica que contiene la proteína soluble y un vehículo farmacéuticamente aceptable. “Vehículos farmacéuticamente aceptables” significa cualquiera de los vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, solución salina tamponada con fosfato, solución salina fisiológica, agua y emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua.

Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína soluble. En una realización de esta invención, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN. Preferiblemente, la molécula de ADN es una molécula de ADNc.

Las secuencias de ácido nucleico descritas y reivindicadas en la presente invención son útiles para generar nuevos vectores virales y plasmídicos circulares descritos más adelante. Las moléculas de ácido nucleico también son valiosas en un método nuevo y útil de terapia génica, es decir, mediante la transformación estable de células aisladas de un animal con las moléculas de ácido nucleico y la posterior readministración de las células transformadas de forma estable al animal. Los métodos de aislamiento de células incluyen cualquiera de los métodos convencionales de extracción de células de un animal. Las células aisladas adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de médula ósea. Los métodos de readministración de células incluyen cualquiera de los métodos convencionales de readministración de células a un animal.

Esta invención también proporciona un vector de transferencia génica, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector viral, que contiene la molécula de ácido nucleico aislada unida operativamente a un promotor de la transcripción de ARN.

Los vectores de transferencia génica descritos y reivindicados en la presente invención son valiosos como productos útiles para generar células hospedadoras eucarióticas transformadas de forma estable y, de ese modo, en métodos nuevos y útiles de crecimiento de tales células en condiciones adecuadas para la producción de una proteína.

Esta invención también proporciona un sistema de vector hospedador que contiene el vector de transferencia génica en una célula hospedadora adecuada. En una realización de esta invención, la célula hospedadora adecuada es una célula eucariótica transformada de forma estable, por ejemplo, una célula eucariótica de mamífero o de levadura transformada de forma estable. Preferiblemente, la célula transformada de forma estable es una célula de mamífero.

El sistema de vector hospedador es valioso como producto útil para la síntesis a gran escala de la proteína soluble de la superficie de la célula T activada mediante el crecimiento del sistema de vector hospedador en condiciones adecuadas para la producción de la proteína y para la recuperación de la proteína así producida. De este modo, también se proporciona un método de producción de la proteína soluble. Esta invención también proporciona la proteína soluble producida por este método.

Esta invención proporciona un método de inhibición de la activación de células B en un animal, que comprende la administración al animal de una cantidad inhibidora eficaz de una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la proteína de superficie de la célula T activada y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para los fines de esta invención, una “cantidad inhibidora eficaz” de una composición farmacéutica es cualquier cantidad de la composición farmacéutica que sea eficaz para unirse a una proteína en la superficie de las células T activadas y, de ese modo, para inhibir la activación de células B por las células T. Esta cantidad inhibidora eficaz puede determinarse fácilmente por un especialista habitual utilizando experimentos bien conocidos en la técnica. Una de tales estrategias experimentales es por titulación. En una realización de esta invención, las células B son células B en reposo. En otra realización de esta invención, las células B son células B sensibilizadas.

Los métodos para determinar la “cantidad eficaz” son bien conocidos por los especialistas en la técnica y dependerán de factores que incluyen, pero sin limitación, el tipo de animal implicado y el peso corporal del animal. En una realización de esta invención, el animal es un mamífero, por ejemplo un ratón o un ser humano. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Para los fines de esta invención, “administración” significa cualquiera de los métodos convencionales de administración de una composición farmacéutica conocida por los especialistas en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, la administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular.

El método de inhibición de la activación de células B es valioso en un método nuevo y útil para inhibir la respuesta inmune de un animal. En una realización de esta invención, el animal es un mamífero, por ejemplo, un ratón o un ser humano. Preferiblemente el mamífero es un ser humano.

En una realización de esta invención, la inhibición de la respuesta inmune de un animal es valiosa como método de inhibición del rechazo de un órgano trasplantado por el animal, por ejemplo, un corazón, riñón o hígado.

En otra realización de esta invención, la inhibición de la respuesta inmune de un animal es valiosa como método de inhibición de la respuesta autoinmune en un animal que padece una enfermedad autoinmune idiopática. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes idiopáticas incluyen, pero sin limitación, psoriasis, artritis reumatoide, miastenia grave, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, síndrome de hiper IgE, diabetes mellitus y enfermedades autoinmunes inducidas por fármacos, por ejemplo, lupus inducido por fármacos.

En otra realización, esta invención proporciona un método de inhibición de la respuesta autoinmune en seres humanos que padecen manifestaciones autoinmunes de enfermedades infecciosas. Las manifestaciones autoinmunes pueden derivar del síndrome de Reiter, espondiloartritis, enfermedad de Lyme, infecciones por VIH, sífilis o tuberculosis.

En otra realización más de esta invención, la inhibición de la respuesta inmune en un animal es valiosa como un método de inhibición de respuestas alérgicas, por ejemplo, fiebre del heno o una alergia a la penicilina, en el animal.

“Administración” significa cualquiera de los métodos convencionales de administración de una composición farmacéutica conocidos por los especialistas en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, la administración intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Los métodos para detectar la formación de complejos de anticuerpo monoclonal/proteína, por ejemplo, mediante exposición de una película de rayos-x, son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

Para los fines de esta invención, una “proteína soluble” es una proteína sin membranas celulares y sin otros componentes celulares. En la realización preferida de esta invención, la proteína soluble es la proteína que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916.

“Aislamiento” de sangre de un animal significa cualquiera de los métodos aceptables generalmente de extracción de sangre y su colocación inmediata en un receptáculo que contenga un anticoagulante, por ejemplo, heparina, EDTA o citrato. Los métodos para detectar los complejos de anticuerpo monoclonal/proteína son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, exposición de película de rayos-x y ELISA.

Una “cantidad eficaz” de la composición farmacéutica es cualquier cantidad de la composición farmacéutica eficaz para detectar la presencia de la proteína soluble en la sangre del animal. Los métodos para determinar una “cantidad eficaz” son bien conocidos por los especialistas en la técnica y dependen de varios factores incluyendo, pero sin limitación: el tipo de animal implicado, el tamaño de la muestra de sangre ensayada y el marcador detectable usado. En una realización de esta invención, el marcador detectable es un radioisótopo, enzima, colorante o biotina.

En una realización de esta invención, el animal es un mamífero, por ejemplo, un ratón o un ser humano. Preferiblemente el mamífero es un ser humano.

Esta invención proporciona un método de selección de un compuesto farmacéutico, por ejemplo, ciclosporina, ciclofosfamida o azatioprina, por su capacidad para inhibir la función cooperadora de células T, que comprende: aislar una muestra de sangre de un animal; cultivar dicha muestra en condiciones que permiten la activación de las células B contenidas en ella; poner en contacto la muestra con una cantidad eficaz de la línea celular D1.1 o de células que expresan la proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916 para activar células B; poner en contacto la muestra con una cantidad eficaz de un compuesto farmacéutico para inhibir la inducción de la diferenciación terminal de células B por células T si el compuesto farmacéutico es capaz de inhibir la activación de células T; y determinar si la línea celular T activa las células B en presencia del compuesto farmacéutico.

En una realización de esta invención, las células B son células B en reposo. En otra realización de esta invención, las células B son células B sensibilizadas.

En una realización de esta invención, la sangre se aísla de un mamífero, por ejemplo, un ratón o un ser humano.

El “aislamiento” de sangre de un animal significa cualquiera de los métodos generalmente aceptables de extracción de sangre y su colocación inmediata en un receptáculo que contiene un anticoagulante, por ejemplo, heparina, EDTA o citrato. El cultivo de células B en “condiciones que permiten la activación de células B” comprende el cultivo de células B en presencia de linfoquinas. Una “cantidad activadora eficaz” de la línea celular D1.1 es cualquier concentración eficaz de células en cultivo para activar las células B en el cultivo. Los métodos para determinar una “cantidad activadora eficaz” son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

Un método de inmunización de un animal contra un antígeno proteico comprende: aislar una muestra de sangre que incluya linfocitos B en reposo del animal; recuperar las células B en reposo de dicha muestra; cocultivar dichas células B en reposo con una cantidad de la línea celular D1.1 o con células que expresen la proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916 para estimular la diferenciación de las células B en condiciones que permitan la diferenciación de las células B; poner en contacto dichas células B diferenciadas con una cantidad eficaz del antígeno proteico para inducir que las células B diferenciadas produzcan un anticuerpo que reconozca el antígeno proteico; y administrar dichos linfocitos B productores de anticuerpo al animal a partir del cual se aisló la muestra de sangre.

Para los fines de esta invención, “células B en reposo” son células B indiferenciadas que no sintetizan anticuerpo o células B de memoria.

El “aislamiento” de sangre de un animal significa cualquiera de los métodos generalmente aceptables de extracción de sangre y su colocación inmediata en un receptáculo que contiene un anticoagulante, por ejemplo, heparina, EDTA o citrato. El cultivo de células B en “condiciones que permiten la diferenciación de células B” comprende el cultivo de células B en presencia de linfoquinas. Los métodos de administración al animal de linfocitos B incluyen cualquiera de los métodos generalmente aceptables de administración de células B a un animal.

La “cantidad eficaz” de la línea celular D1.1 o de la proteína soluble de la superficie de células T activadas es cualquier cantidad de la línea celular o de la proteína soluble eficaz para inducir la diferenciación de células B. Los métodos para determinar una “cantidad eficaz” son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

Una "cantidad eficaz diferenciadora" de un antígeno proteico es cualquier cantidad de antígeno eficaz para inducir en las células B diferenciadas la producción de un anticuerpo que reconozca específicamente el antígeno.

En una realización de esta invención, el animal es un mamífero, por ejemplo, un ratón o un ser humano. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

En una realización de la invención, el antígeno es un antígeno proteico viral, por ejemplo, un antígeno proteico del virus de la hepatitis B, un antígeno proteico del virus de la leucemia de células T humana o un antígeno proteico del virus de la inmunodeficiencia humana. En otra realización de esta invención, el antígeno es un autoantígeno o un antígeno tumoral. Son ejemplos de tales autoantígenos Ro, La, RNP y factor reumatoide (IgG), que son bien conocidos por una persona especialista habitual en la técnica.

Esta invención también proporciona un método para inducir un cambio de isotipo de una célula productora de anticuerpos que comprende (i) poner en contacto la célula productora de anticuerpos con una cantidad eficaz de la línea celular D1.1 o de células que expresan la proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916 para inducir el cambio de isotipo en condiciones que permiten la diferenciación de células B; y (ii) detectar el isotipo de la célula productora de anticuerpos. En una realización, la célula productora de anticuerpos es una célula de hibridoma. En otra realización, la célula productora de anticuerpos es una línea celular transformada con el EBV.

Esta invención también proporciona un método para incrementar la afinidad de un anticuerpo producido por una célula productora de anticuerpos que comprende poner en contacto la célula productora de anticuerpos con una cantidad eficaz de la línea celular D1.1 o de células que expresan la proteína aislada que se reconoce específicamente por el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916 en las condiciones que permiten el contacto de las células; y determinar la afinidad de unión del anticuerpo producido por la célula productora de anticuerpos.

La invención proporciona un método para tratar a un paciente que padece hipogammaglobulinemia que comprende administrar al paciente una cantidad de la proteína soluble de superficie de la célula T activada eficaz para tratar la hipogammaglobulinemia del paciente. Los métodos para determinar una "cantidad eficaz" son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Un ejemplo de tal método es por titulación.

La invención se entenderá mejor por referencia a los detalles experimentales que siguen, pero los especialistas en la técnica apreciarán fácilmente que los experimentos detallados específicamente son sólo ilustrativos, y no pretenden limitar la invención como se describe en esta invención, la cual se define por las reivindicaciones que se muestran más adelante.

Primera serie de experimentos

Materiales y Métodos

Generación y caracterización del anticuerpo monoclonal 5c8. Se inmunizaron cinco ratones Balb/c con 2×10^6 células D1.1 en solución salina por vía intravenosa y posteriormente se reinmunizaron por vía intraperitoneal cinco veces a intervalos de aproximadamente dos semanas. Se titularon los sueros de estos ratones para ensayar la presencia de anticuerpos que se unían preferentemente a células Jurkat D1.1 frente a B2.7 por FACS. Un ratón que mostró el mejor título diferencial, recibió una reinmunización de 2×10^6 células D1.1 por vía intravenosa 3 días antes de la fusión. Los esplenocitos de este ratón se fusionaron con 7×10^7 células de mieloma SP2/0 murinas como se ha descrito previamente (Kirchevsky, *et al.*, 1988). La mezcla de células se cultivó durante toda una noche en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía un 15% de FCS antes de sembrar el producto de fusión en 360 pocillos de 8 mm. Aparecieron colonias en 220 pocillos y todos se sometieron a una selección por FACS para la unión diferencial a células D1.1 y B2.7. Se encontró un mA b denominado 5c8 que se unía a las células D1.1 y no a las células B2.7. Se subclonó el clon 5c8 múltiples veces hasta que se estableció la monoclonalidad. Por medio de ELISA (Hyclone, Logan, UT) se descubrió que el mA b 5c8 era IgG2a.

Anticuerpos monoclonales. Se produjeron los siguientes mA b a partir de los hibridomas disponibles en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd, Manassas, VA, USA): OKT11 (anti-CD2), OKT10 (anti-38), OKT8 (anti-CD8), OKT6 (anti-CD1a), OKT4 (anti-CD4), OKT3 (anti-CD3), OKT1 (anti-CD5), 3A1 (anti-CD7), tac (anti-CD25), TBH-5 (anti-CD21, CR2), W6/32 (anti-MHC de clase I), AB2.06 (anti-MHC de clase II), L243 (anti-MHC de clase II), 93F10 (anti-MHC de clase II), TS1/22.1.13 (anti-LFA-1a), TS1/18.1.2.11.4 (anti-LFA-1 β), TS2/9.1.4.3 (anti-LFA-3) y 187.1 (anti-Ig(Fab) humana). Estos mA b se usaron a concentraciones saturantes de los sobrenadantes del hibridoma o purificados a partir de líquido ascítico en columnas de proteína A (Biorad, Rockville Center, NY). El mA b 16G8 anti-TCR clonotípico de Jurkat (anti-v β 8) y un panel de otros mA b anti-TCR se adquirieron en Diversi-T, T Cell Science (Cambridge, MA). El mA b OKT4A se adquirió en Ortho Pharmaceutical (Raritan, NJ). TCR δ -1 fue cedido por el Dr. Michael Brenner, Harvard Medical School (Boston, MA). M241 (anti-CD1c) fue cedido por el Dr. Cox Terhorst del Harvard Medical Collage. Los mA b anti-CD23-PE y marcado con FITC, y anti-CD69 sin marcar se adquirieron en Becton Dickinson (Mountainview, CA). El anti-IgM marcado con FITC se adquirió en Tago (Burlingame, CA). Los anticuerpos Kolt-4 (anti-CD28) y anti-CD27 se adquirieron en Accurate Scientific (Westbury, NY).

ES 2 207 634 T5

Las proteínas recombinantes, rIL-4, se adquirieron en Genzyme (Cambridge, MA), rIL-2 fue cedida por Hoffmann-LaRoche (Nutley, N.J.).

Análisis por citometría de flujo. Se incubaron aproximadamente 10^5 células con concentraciones saturantes de los mAb indicados durante 45 min a 4°C en presencia de $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ de IgG humana agregada por calor (International Enzyme, Fallbrook, CA). Las células se lavaron para eliminar el mAb no unido antes de la incubación con el anticuerpo secundario de cabra anti-Ig de ratón conjugado con fluoresceína (Cappel, Cochranville, PA).

En el análisis de doble tinción, las células reaccionaron con el mAb indicado conjugado directamente con FITC o ficoeritrina (PE) durante 45 min a 4°C en presencia de la IgG humana agregada. Antes del análisis, las células se lavaron y resuspendieron en PBS. La intensidad de fluorescencia se midió en un citómetro de flujo FACSCAN con el software asociado 30 (Becton-Dickinson, Mountainview, CA). En experimentos que implican el cocultivo de células B con clones de Jurkat, las células Jurkat se excluyeron del análisis de fluorescencia de las células B seleccionando las distintas poblaciones celulares con un dispersor de luz frontal y lateral bajo. En experimentos con células activadas con PMA o PHA, las células muertas se excluyeron del análisis mediante el tratamiento con yoduro de propidio y la selección electrónica en el FACS.

Líneas celulares: Las siguientes líneas celulares están disponibles en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209, U.S.A.): HPB-ALL, Jurkat, CEM, PEER, MOLT-IV, K562, Ramos, Raji y U937. BA es una línea de células B transformada con el virus de Epstein Barr que se ha publicado previamente (Bank, *et al.*, 1986). H9 está disponible en el Depósito de VIH (10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209, U.S.A.). Las tipificaciones de HLA se realizaron por la Dra. Elaine Reed del Department of Pathology, Columbia University (One Lambda, Los Angeles, CA). Jurkat D1.1 y B2.7 eran negativas para micoplasma por el kit MycotectTM (GIBCO[®], Grand Island, NY) y por el método de hibridación de ADN (Genprobe, La Jolla, CA).

Aislamiento de poblaciones celulares. Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron de sangre recién extraída de voluntarios sanos por centrifugación en Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) o Leukoprep (Becton-Dickinson). Las células T se seleccionaron positivamente con eritrocitos de oveja tratados con neuraminidasa. Los subtipos de linfocitos T $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ y $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ se aislaron mediante el tratamiento con mAb anti-CD8 o anti-CD4, respectivamente, seguido de la lisis mediada por complemento como se describió previamente (Rogozinski, *et al.*, 1984). Las células B derivaban de poblaciones de células que no sedimentaban a través de Ficoll-HypaqueTM después de dos rondas de formación de rosetas con eritrocitos de oveja tratados con neuraminidasa.

Las células B se purificaron adicionalmente por centrifugación en gradiente de densidad o por selección positiva en una columna anti-Ig. En este primer método, las células E^- se cultivaron toda la noche en matraces de poliestireno (37°C , 5% de CO_2) para eliminar los macrófagos por adherencia. Estas células no T, no macrófagos, se separaron en fracciones de alta y baja densidad en un gradiente discontinuo de percoll del 30%/50%/100% por centrifugación a 2300 rpm durante 12 min. Las células de alta densidad se obtuvieron de la interfase del 50%/100% y las células de baja densidad de la interfase del 30%/50% (Crow, *et al.*, 1985). Las células de alta densidad (en reposo) eran típicamente CD20^+ del 60 al 80%, IgM^+ del 55 al 80%, y $\text{CD3}^+ < 5\%$ y $\text{CD23}^+ < 5\%$ (fondo). En otros experimentos (donde se indica) las células B Igs^+ se purificaron por cromatografía de afinidad de Ig anti-F(ab)₂ en SephadexTM G-200 como ya se ha descrito (Rogozinski, *et al.*, 1984; Friedman, *et al.*, 1976). Las poblaciones de Igs^+ eran típicamente $\text{CD3}^+ < 5\%$, $\text{CD2}^+ < 10\%$ y $\text{CD20}^+ > 90\%$ cuando se analizaron por FACS.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Los clones Jurkat se yodaron por el método de la lactoperoxidasa, se solubilizaron en 1% de NP40, Tris PBS tamponado 25 mM que contenía yodoacetamida y PMSF $10\text{ }\mu\text{M}$. Los lisados celulares se hicieron reaccionar con perlas de proteína A-4B SepharoseTM (Farmacia, Uppsala, Suecia) que estaban recubiertas con el mAb 187.1 (anti-F(ab) de Ig humana) y aproximadamente $10\text{ }\mu\text{g}$ del mAb indicado. Después de lavar las perlas para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente, las proteínas precipitadas se desnaturalizaron por calor en SDS en presencia o ausencia de 2-ME. Las proteínas desnaturalizadas y los marcadores de peso molecular pre-teñidos (Biorad, Rockville Center, NY) se sometieron a electroforesis a través de poliacrilamida al 12% en geles de 12 cm (Biorad ProteanTM Gel, Rockville Center, NY) y los geles secos se usaron para exponer una película de rayos-x (Kodak, Rochester, NY).

Tratamientos con mitomicina-C y paraformaldehído. Las células Jurkat ($10^7/\text{ml}$) se trataron con mitomicina-C $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Sigma, St. Louis, MO) durante 60 min a 37°C . Las células Jurkat tratadas con mitomicina se lavaron dos veces, se resuspendieron en medio sin mitomicina y luego se cultivaron durante 45 a 60 min a 37°C . Las células se lavaron otras dos veces más y luego se añadieron a los cultivos de células B. En los experimentos de fijación, las células T se trataron con paraformaldehído al 0,5% recién preparado durante 5 a 10 min, el tratamiento se interrumpió con L-lisina $0,2\text{ M}$ y se lavaron cinco veces antes de añadirse a los cultivos de células B.

Activación de células T. En los experimentos para estudiar la expresión del Ag 5c8, las células T en reposo se cultivaron en presencia o ausencia de miristato acetato de forbol (PMA) (Sigma, St. Louis, MO) y de $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de PHA (Sigma). En los experimentos para estudiar los requisitos metabólicos para la expresión del Ag 5c8, las células T se activaron en presencia de ciclohexamida $100\text{ }\mu\text{M}$ (Sigma) o $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D (Sigma).

En los experimentos para estudiar la inducción por las células T activadas de la expresión de CD23 en las células B de alta densidad, se inmovilizaron los mAb OKT3 u OKT4 en la superficie de placas de cultivo de 24 pocillos

mediante la incubación de 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb en PBS durante 1 h. Los pocillos de control se incubaron en PBS sin mAb. Tras lavar el mAb no unido, las placas se cubrieron con 2×10^6 células/pocillo en presencia de 10 ng/ml de dibutirato de forbol (PDB) (Sigma) durante 6 h. Las células se retiraron con un pipeteo enérgico, se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 0,5% como se describió anteriormente antes de cultivarlas durante 18 h a una relación 1:1 con 2×10^5 células B en reposo de alta densidad aisladas por percoll. La expresión de CD23 en células B se determinó de doble tinción por FACS como se describió anteriormente.

Ensayos de activación y diferenciación de células B. En los experimentos para medir la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de células B, se añadieron 2×10^5 células B de alta densidad al número indicado de células Jurkat o células T en 200 μl de medio de Dulbecco modificado por Isocove (IMDM) con 10% de FCS en pocillos de microtitulación de fondo redondo (Nunc) y se ensayaron para la expresión de CD23 después de 18 a 24 h. Los experimentos en doble cámara se realizaron con 1×10^6 células Jurkat en presencia o ausencia de 1×10^6 células B separadas de las 1×10^6 células por insertos en las placas de cultivo de 45 μm de Millipore (Bedford, MA).

La proliferación de células B se midió cultivando 10^5 células B con un número igual de células E⁺ tratadas con mitomicina C o clones de Jurkat en pocillos de microtitulación de fondo plano (Nunc) en presencia o ausencia de PHA (5 $\mu\text{g/ml}$). Los cultivos se sometieron a pulsos de 1 μCi de (³H)-timidina (New England Nuclear, Boston, MA) después de 60 h y se recogieron 16 h más tarde en papel de filtro de fibra de vidrio (Cambridge Technology, Watertown, MA). Las cpm de centelleo beta se midieron en un contador beta (contador LKB Rackbeta, modelo 1209).

La medida de las colonias formadoras de placas (PFC) fue una modificación del ensayo de la placa hemolítica de Jerne (Rogozinski, *et al.*, 1984). En resumen, se cultivaron $2,5 \times 10^5$ células B con cantidades variables de células Jurkat tratadas con mitomicina C o células T autólogas recién aisladas, sin tratar, durante 6 días en presencia o ausencia de una dilución 1:400 de PWM (Gibco, Grand Island, NY). Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en solución salina equilibrada de Hanks. A partir de una dilución apropiada, se mezclaron 50 μl de una suspensión de células cultivadas con: 10 μl de una solución al 11% de SRBC que se había recubierto con anti-Ig humana de conejo por el método de cloruro crómico, 10 μl de anti-Ig humana de conejo diluido y 10 μl de complemento de cobaya. Estas mezclas se introdujeron por duplicado en cámaras de vidrio y se cultivaron durante 2 h a 37°C. Se contaron las placas usando un microscopio de disección y se expresaron como colonias formadoras de placas (PFC) $\times 10^6$ células B.

El ELISA para la cuantificación del isotipo de Ig se realizó cubriendo placas de 96 pocillos de poliestireno (Immunion II, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) con diluciones de anti-IgA, IgG o IgM humana de cabra (Tago, Burlingame, CA) en tampón carbonato, pH 9,6, durante 18 h a 4°C. Las placas se lavaron con 0,05% de Tween en PBS y los sitios inespecíficos se bloquearon mediante una incubación de 2 h con BSA al 1%-PBS. Después de lavar, se añadieron a los pocillos 50 μl de sobrenadantes de los cultivos celulares o patrones de isotipos de Ig (Rockland, Gilbertsville, PA) y se permitió la unión durante 2 h. Posteriormente, se añadió un anti-Ig humana de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Tago) para detectar la Ig humana unida. Después de 2 h, los pocillos se lavaron y se añadió p-nitrofenil fosfato.

La absorbancia se midió a 405 nm en un dispositivo Molecular Devices VNAXTM (Palo Alto, CA). Las muestras se ensayaron por triplicado. Las barras de error representan la desviación típica calculada a partir del ajuste e interpolación en la curva (Delta-Soft, BioMetallics, Inc. Princeton, NJ).

Papel de CD4 en la función de células T

Para estudiar el papel de CD4 en las funciones de las células T, se aisló un clon de Jurkat CD4⁻ (D1.1) a partir de un cultivo que desarrolló espontáneamente una subpoblación CD4⁻ identificada por un pico negativo en el análisis FACS. La falta de expresión en la superficie de CD4 era relativamente específica, ya que el fenotipo de la superficie celular de Jurkat D1.1 con respecto a la unión de un gran panel de mAb era similar a un clon CD4⁺, Jurkat B2.7 (figura 1 y tabla 1). Aunque la expresión diferencial de CD4 era la única diferencia cualitativa entre estos subclones, algunas de las otras estructuras moleculares estudiadas se expresaban cuantitativamente a diferentes niveles. Por ejemplo, Jurkat D1.1 expresaba más CD2 y moléculas de MHC (HLA) que Jurkat B2.7. Sin embargo, Jurkat D1.1 expresaban menos moléculas CD28 y menos complejos TCR- α/β (v β 8)/CD3 que Jurkat B2.7 (fig. 1 y tabla 1). Además de su reactividad compartida con el mAb anti-TCR clonotípico, Jurkat D1.1 y B2.7 eran HLA idénticos (A3, 34, 2, 16) y diferentes de una línea leucémica de células T no relacionada, HPB-ALL (A9). En conjunto, estos datos demostraban que Jurkat D1.1 era un subclon CD4⁻ de Jurkat y que la ausencia de moléculas CD4 era una alteración relativamente específica en su fenotipo de superficie.

TABLA 1

FENOTIPOS DE LA SUPERFICIE CELULAR DE LOS CLONES DE JURKAT D1.1 Y B2.7

			Intensidad de Fluorescencia ^a	Media de
Nº de CD	Molécula	mAb	D1.1	B2.7
	TCR α/β	BMA-031	10	40
	TCR $\nu\beta 8$	16G8	30	70
	TCR- $\nu\beta 5$	W112	0	0
	MHC de clase I	W6/32	190	70
	MHC de clase II	2.06	0	0
CD1a		OKT6	10	10
CD1c	T6	M241	10	10
CD2		OKT11	100	10
CD3	T11	OKT3	30	80
CD4	Complejo TCR	OKT4	0	130
CD5	T4	OKT1	20	90
CD7	T1	3A1	200	190
CD8		OKT8	0	0
	T8			
CD11a	LFA-1 α	TS1/22.1.13	40	100
CD14		My2	0	0
CD16	Fc ϵ RII	3G8	20	20
CD18	LFA-1B	TS1/18.1.2.11.	30	80
CD21	CR2	4	0	0
CD23	Fc γ RII	HB-5	0	0
CD25	tac. IL-2R α	leu20	0	0
CD26	DPPIV	tac	0	0
CD28	9.3. gp44	taq-1	30	70
CD29		KOLT-4	140	110
CD38	T10	4B4	40	30
CDw32	Fc ϵ RII	OKT10	0	0
CD45RA	T200.LCA	32.2	30	40
CD45RO	T200.LCA	2H4	10	20
CDw49	VLA-1	UCHL1	0	0
CD58	LFA-III	1B.3	40	60
CD64	Fc γ RI	TS2/9.1.4.3	0	0
		IV 3		

^aLos números representan la intensidad media de fluorescencia (unidades arbitrarias) determinada por FACS. Se resta el efecto de fondo y los números se redondean a las unidades múltiplos de diez más próximas.

En los estudios funcionales, se comparó la capacidad de las células Jurkat CD4⁺ (B2.7) y CD4⁻ (D1.1) para inducir la expresión de CD23 en las células B en reposo, un marcador de activación de células B (Crow, *et al.*, 1986; Jover, *et al.*, 1989; Crow, *et al.*, 1989). Sorprendentemente, el cocultivo de las células B con células Jurkat CD4⁻ (D1.1), pero no con Jurkat CD4⁺ (B2.7), inducía la expresión de CD23 en más del 60% de las células B (fig. 2). La inducción en la superficie de células B de la expresión de CD23 por las células Jurkat D1.1 era máxima a las 20 a 24 h a una relación de 1:1 entre células D1.1 y células B (fig. 3). Por el contrario, el subclón de Jurkat B2.7 no activaba las células B a altas relaciones (fig. 3) o durante periodos largos de cocultivo (de hasta 48 h, no mostrado). Además, Jurkat D1.1 era la única que tenía esta capacidad en comparación con otras células T (H9, HPB-ALL, MOLT-IV, CEM) y líneas leucémicas de células no T (U937) (no mostrado). Jurkat D1.1 inducía en la célula B la expresión de CD23 selectivamente porque los niveles de otras moléculas de superficie de la célula B tales como IgM (fig. 2), CD20 (fig. 2) o MHC de clase I no estaban afectados. El efecto de Jurkat D1.1 sobre la activación de células B se observó regularmente en células B de más de 25 donantes no relacionados, sugiriendo que el efecto no estaba restringido ni al Ag ni al MHC.

La expresión de CD23 en células B se produce en una etapa temprana y posiblemente intermedia de la diferenciación terminal de las células B en células secretoras de Ig. Se requieren otros estímulos, junto a los aportados por la superficie de células T activadas, para mediar una proliferación y diferenciación substancial de células B. Como la medición de la proliferación o diferenciación de células B requiere varios días de cultivo, la proliferación de los clones de Jurkat se inhibía por el pretratamiento con mitomicina C, que no anulaba su capacidad para activar células B (tabla 2).

TABLA 2

EFFECTO DE LA MITOMICINA C Y ANTICUERPOS CONTRA IL-4 EN LA EXPRESIÓN DE CD23 EN CÉLULAS B INDUCIDA POR CÉLULAS JURKAT D1.1							
Clones de Jurkat							
Células B más	C	rIL-4	rIL-2	D1.1	B2.7	D1.1/M	B2.7/M
	14	64	17	81	16	57	14
Anti-IL-4	ND	28	ND	84	ND	64	ND
Anti-IL-2	ND	60	ND	86	ND	60	ND

Se muestran los porcentajes de células B CD20(Leu-16)⁺ que expresan CD23, como se determinó por el análisis FACS de doble tinción con anti-CD20(Leu-16)-FITC y anti-CD23-PE. Las células B de alta densidad fraccionadas en percoll (2 x 10⁵) se cultivaron como se indica, solas o con un número igual de células Jurkat B2.7 o D1.1 durante 20 h. Donde se indica, se añadió una Ig policlonal de conejo purificada anti-IL-4 o anti-IL-2 al inicio del experimento a una concentración final de 1,25 µg/ml. Donde se indica, se añadió rIL-2 o rIL-4 a los cultivos indicados a una concentración final de 25 U/ml. Las células a analizar se seleccionaron por difusión de luz frontal y lateral para excluir del análisis las células D1.1 o B2.7 más grandes (cuando estaban presentes). C: Control; D1.1/M: células D1.1 tratadas con mitomicina C; B2.7/M: células B2.7 tratadas con mitomicina C; ND: no determinado.

Después se estudió la capacidad de las Jurkat CD4⁻ D1.1 y las Jurkat CD4⁺ B2.7 tratadas con mitomicina C para inducir la proliferación de las células B o la diferenciación terminal de las células B en células secretoras de Ig. En presencia de mitógenos de células B dependientes de células T (Doech, *et al.*, 1980), se midió la proliferación de células B inducida por Jurkat D1.1, pero no por B2.7, por la síntesis de ADN (fig. 4) y la diferenciación en células secretoras de Ig se midió por el ensayo de placa hemolítica inversa (fig. 5A). Además se caracterizó por ELISA cuantitativo el isotipo del anticuerpo secretado. Jurkat D1.1, pero no B2.7, inducía la secreción de de IgG y, en menor medida, de IgM en el sobrenadante de cultivo (figs. 5B y C). Considerados en conjunto, estos datos demuestran que Jurkat D1.1, pero no Jurkat B2.7, compartía con las células T activadas la capacidad funcional para sostener la diferenciación de células B y la secreción de IgM e IgG.

Papel de factores difundibles en la activación de células B

Los sobrenadantes de D1.1 no inducían la expresión de CD23 en células B (fig. 3). Se realizaron experimentos en doble cámara en los que se cultivaron células B en reposo en una cámara que estaba separada por una membrana permeable de otra que contenía medio con linfoquinas o cultivos de células D1.1 en presencia o ausencia de células B. En un experimento en el que se cultivaron células B (66% IgM⁺) en una cámara con una membrana de 0,45 µm, la rIL-4 (25 U/ml) inducía la expresión de CD23 en el 28% de las células B IgM⁺ según el análisis FACS de doble tinción. Por el contrario, las células D1.1 no activaban la expresión de CD23 en las células B de la otra cámara (4,7% para D1.1 frente al 4,0% de fondo). Además, el cocultivo de células D1.1 con células B en una cámara no activaba la expresión de CD23 en las células B de la otra cámara (4,9%). Sin embargo, las células D1.1 inducían potencialmente la expresión de CD23 por las células B con la cuales podían establecer un contacto directo (76% frente al 8,4% para las células B2.7). Considerados en conjunto, estos datos no apoyaban un papel para los factores difundibles en la mediación del efecto de D1.1 sobre las células B.

Como se sabía que rIL-4 activaba las células B para que expresaran CD23 (Rabin, *et al.*, 1985), se estudió también el papel potencial de la IL-4 en la mediación de este efecto, además de inducir la expresión de CD23 en las células B. Se sabía que rIL regulaba positivamente la expresión de IgM^s de células B (Shields, *et al.*, 1989). Mientras que rIL-4 inducía la expresión de CD23 y la regulación positiva de IgMs de una forma dependiente de la dosis, las células D1.1 inducían la expresión de CD23, pero no regulaban positivamente la IgMs de las células B (fig. 6). El efecto de las células D1.1 sobre la proliferación de células B también se diferenciaba del de rIL-4 (fig. 4). Las células D1.1, pero no rIL-4, inducían la proliferación de células B en presencia de PHA. Curiosamente, rIL-4 y las células D1.1 colaboraban en la inducción de la proliferación de células B en ausencia de PHA e incrementaban la proliferación inducida por células D1.1 en presencia de PHA. Considerados en conjunto, estos datos sugieren que el efecto de las células D1.1 sobre las células B es distinto de los inducidos por IL-4. Sin embargo, para examinar directamente el papel de IL-4 en el efecto de D1.1 sobre las células B, se utilizaron anticuerpos neutralizadores contra IL-4. Las concentraciones de anticuerpos anti-IL-4 que inhibían tanto la inducción de CD23 como la regulación positiva de IgMs mediada por rIL-4 (fig. 6) no inhibían la expresión de CD23 en células B mediada por D1.1 (tabla II). Estos datos demostraban que la IL-4 sola no explicaba el efecto de D1.1 sobre las células B. Considerados en conjunto, estos resultados sugerían claramente que el contacto célula-célula y no los factores secretados explicaban los efectos de D1.1 sobre la activación de células B.

Para corroborar la idea de que el contacto célula-célula mediaba el efecto de D1.1 sobre las células B, se fijaron Jurkat D1.1 y el control, células E2.7, con un 1% de paraformaldehído. Aunque la fijación con paraformaldehído reducía la potencia de Jurkat D1.1 para activar las células B, las células D1.1 fijadas seguían siendo capaces de inducir la expresión de CD23 en células B, mientras que las células E2.7 fijadas no alteraban la expresión de CD23 del nivel del fondo. A una relación de 5:1 de células D1.1 fijadas:células B, el 63% de las células B fueron inducidas a expresar CD23, en comparación con el 80% observado con células no fijadas. Considerados en conjunto, estos datos sugieren que las estructuras de superficie en Jurkat D1.1 son suficientes para inducir la activación de células B.

Caracterización de proteínas de la superficie celular en células T CD4⁺ activadas que median la función efectora cooperadora

Con el fin de caracterizar las proteínas de la superficie celular en células T CD4⁺ activadas que median la función efectora cooperadora, se inmunizan ratones con el clon de Jurkat D1.1 que posee la función efectora cooperadora dependiente de contacto (Yellin, *et al.*, 1991). Se generan anticuerpos monoclonales (mAb) y los sobrenadantes de los hibridomas se seleccionan por su unión diferencial al clon D1.1 y a un clon de Jurkat no cooperador B2.7.

Se identificó un mAb IgG2a murino, denominado 5c8, que se unía específicamente a la superficie de las células D1.1 y no a la superficie de las células no cooperadoras B2.7 (figura 7). El mAb 5c8 no se unía a una diversidad de líneas celulares distintas, incluyendo: líneas de leucemia de células T, CEM, H9, Molt-4 y Peer; las líneas celulares derivadas de células B, BA, Raji o Ramos; la línea celular mielomonocítica, U937; o la línea celular de eritroleucemia, K562 (véase la tabla 3 más adelante).

TABLA 3

EXPRESIÓN DEL Ag 5c8 EN POBLACIONES CELULARES Y LÍNEAS CELULARES		
Líneas celulares	En reposo	Activadas
Jurkat D1.1	+	+
Jurkat B2.7	-	-
CEM	-	-
H9	-	ND
Molt-4	-	-
PEER	-	-
BA	-	ND
Raji	-	ND
Ramos	-	ND
U937	-	-
K562	-	ND
Poblaciones celulares	En reposo	Activadas
Células T	-	+
Células B	-	-
Monocitos	-	-

Estos datos derivan del análisis FACS de la unión del mAb 5c8 a las líneas celulares o a las poblaciones celulares indicadas. La presencia de unión del mAb 5c8 se determinó en relación a la tinción de FACS de los mAb apropiados del control positivo y negativo para cada línea o población celular. ND: no determinado.

Para evaluar si el mAb 5c8 reacciona con una molécula que es funcionalmente relevante para la capacidad cooperadora del clon de Jurkat D1.1, se estudia el efecto del mAb 5c8 en ensayos de expresión de CD23 inducida por D1.1 en células B. El mAb 5c8 inhibía potencialmente la activación de células inducida por Jurkat D1.1 (figura 8). Por el contrario, el mAb de control de isotipo, W6/32, no inhibía la activación de células B mediada por D1.1. Los datos presentados aquí sugieren que el Ag 5c8 juega un papel crítico en la función efectora cooperadora de las células D1.1.

Caracterización bioquímica del antígeno reconocido por el mAb 5c8

Con el fin de caracterizar bioquímicamente el antígeno reconocido por el mAb 5c8, se realizaron inmunoprecipitaciones con el mAb 5c8 o con mAb de control que reconocían los antígenos MHC de clase I (W6/32) o CD28 (Kolt-4) en lisados celulares de superficies yodadas de células Jurkat D1.1 y en el control, células Jurkat B2.7 no cooperadoras que carecían de la unión del mAb 5c8 en la superficie. El mAb 5c8 inmunoprecipitó a partir de lisados del clon cooperador D1.1, pero no de los lisados del control B2.7, una proteína que migraba a 30 kDa en SDS/PAGE (figura 9).

La especie proteica inmunoprecipitada por el mAb 5c8 no se veía afectada por la reducción con 2-mercaptoetanol (2-ME), lo que sugería que la banda de 30 kDa no era un homodímero unido por puentes disulfuro ni estaba unida por puentes disulfuro a otra proteína que no fuera accesible a la yodación. Por el contrario, el control KOLT-4, mAb anti-CD28, inmunoprecipitaba (figura 9) una banda de 88 kDa en ausencia de 2-ME y una banda de 44 kDa en presencia de 2-ME, lo que es coherente con los datos ya publicados (Martín, *et al.*, 1986) y con la interpretación de que esta

estructura es un homodímero unido por puentes disulfuro. El mAb de control W6/32 precipitaba un heterodímero no unido por puentes disulfuro de proteínas con pesos moleculares de 43 y 12 kDa (figura 9). Estos datos sugerían que el mAb 5c8 reconocía una proteína con un peso molecular de 30 kDa de una especie proteica no unida por puentes disulfuro de la superficie de células D1.1

Caracterización de la expresión del Ag 5c8 por células linfoides normales

Se estudió por FACS la unión del mAb 5c8 y varios mAb de control en linfocitos T y B, monocitos y células T estimuladas con PMA y PHA, recién aislados. Aunque los linfocitos T o B o monocitos en reposo no expresaban el Ag 5c8 (véase la tabla 3 anterior y la figura 10), se encontró un subtipo de células T activadas que expresaban el Ag 5c8, 5 h después de la activación con PMA o PHA (figura 10).

Para caracterizar las cinéticas y distribución celular de la expresión del Ag 5c8, se estudió por FACS la unión del mAb 5c8 a células T a diversos intervalos después de la activación de células T. La molécula CD69, que es un heterodímero de 32/28 kDa unido por puentes disulfuro, se seleccionó como control porque se sabe que se induce rápidamente en prácticamente todas las células T después de la activación de células T (Bjorn Dahl, *et al.*, 1988). Mientras que 5c8 no estaba en las células T en reposo y se expresaba sobre un subtipo de células T después de la activación, por el contrario, se detectaban bajos niveles de expresión de CD69 en células T en reposo y se inducían altos niveles de expresión de CD69 por la activación en la población de células T completa (figura 10). Las cinéticas de expresión diferenciaban además el Ag 5c8 del CD69 porque la unión del mAb 5c8 era significativa después de 3 h de activación (Bjorn Dahl, *et al.*, 1988) y persistía durante más de 24 h (figura 11). Los datos presentados aquí diferencian el Ag 5c8 de CD69 por la distribución celular de su expresión y por las cinéticas de su regulación positiva tras la activación.

Para determinar si la síntesis de ARNm o de proteína era necesaria para la expresión del Ag 5c8, se estimularon las células T con PMA y PHA en presencia o ausencia de actinomicina D o ciclohexamida y se comparó la expresión de 5c8 y de CD69. La expresión de 5c8 se inhibía tanto por el tratamiento con actinomicina D como por el tratamiento con ciclohexamida (figura 10). Por el contrario, CD69 se regulaba positivamente por activación, a pesar de la presencia de actinomicina D o ciclohexamida (figura 11), como se ha publicado previamente (Bjorn Dahl, *et al.*, 1988). Estos datos sugerían que la expresión del antígeno de 5c8 después de la activación de células T depende de la transcripción del ARNm y de la síntesis *de novo* de la proteína.

Caracterización de los subtipos de células T que expresan el Ag 5c8 tras la activación

Con el fin de caracterizar el subtipo de células T que expresaban el Ag 5c8 tras la activación, se aislaron poblaciones de células T CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺ mediante el tratamiento con anti-CD8 o anti-CD4, respectivamente, seguido de la depleción por complemento. Las poblaciones CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺ se activaron con PHA o PMA y se estudió la expresión del Ag 5c8 o CD69 por FACS. Tras la activación, se indujo la expresión de 5c8 exclusivamente en las células CD4⁺ y no en las células CD8⁺, a pesar del hecho de que las células CD8⁺ expresaban niveles similares de CD69 tras la activación (figura 11). Considerados en conjunto, estos datos demostraban que la expresión del Ag 5c8 está restringida a las células CD4⁺ activadas.

Evaluación del papel del Ag 5c8 en la función T cooperadora mediada por células T normales

Para evaluar el papel del Ag 5c8 en la función T cooperadora mediada por células T normales, se estudió el efecto del mAb 5c8 sobre la capacidad de las células T activadas para inducir la expresión de moléculas CD23 de superficie por las células B en reposo pequeñas. Se cultivaron células T sobre superficies recubiertas con los mAb anti-CD3 (OKT3) o de control, anti-CD4 (OKT4) en presencia de dibutirato de forbol (PBD) y luego se fijaron con paraformaldehído. Estas células T fijadas se estudiaron para determinar la capacidad de activar células B en presencia del mAb 5c8 soluble u OKT4. El mAb OKT4 se seleccionó como un control de isotipo compatible en estos experimentos porque OKT4 reacciona con las moléculas CD4 de superficie de las células T, pero no inhibe las interacciones T-B (Rogozinski, *et al.*, 1984). El mAb 5c8, pero no OKT4, inhibía la capacidad de las células T activadas para inducir la expresión de CD23 en células B (véase la tabla 4 presentada más adelante).

TABLA 4

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL mAb 5c8 SOBRE LA INDUCCIÓN DE CD23 DE SUPERFICIE EN CÉLULAS B MEDIADA POR CÉLULAS T ACTIVADAS FIJADAS CON PARAFORMALDEHÍDO			
	Media	mAb 5c8	OKT4
Células no T	6,8	ND	ND
Jurkat D1.1	93,8	9,8	96,1
Células T activadas con PDB	29,8	ND	ND
Células T activadas con PDB/OKT4	26,0	ND	ND
Células T activadas con PDB/OKT3	52,7	30,4	56,1

Se muestran los porcentajes de células B IgM⁺ que expresaban CD23 mediante el análisis FACS de doble tinción después de que las células B se cultivaran solas o en presencia de un número igual de células Jurkat D1.1 o células T fijadas en paraformaldehído que se habían estimulado con PDB solas o en presencia de los mAb inmovilizados anti-CD3(OKT3) o anti-CD4(OKT4), como se indica. Los mAb IgG2a, 5c8 y OKT4, estaban presentes a 500 ng/ml, lo que supone dos veces la concentración del mAb 5c8 que inhibía el 90% de la inducción de CD23 en un experimento dosis-respuesta paralelo. ND: No determinado.

El efecto del mAb 5c8 después se comparó con el de OKT4 en cuanto a su capacidad para inhibir la diferenciación terminal de células B dirigida por células T humanas normales. En estos experimentos, se cultivaron células T CD4⁺ con células B autólogas aisladas por columna en presencia de PWM y se midió el número de colonias formadoras de placas (PFCs) de células B secretoras de Ig mediante el ensayo de placa hemolítica inversa. El mAb 5c8, pero no OKT4, inhibía la respuesta PFC dirigida por las células CD4⁺ (véase la tabla 5 presentada más adelante). Estos datos juntos demostraban que el Ag 5c8 media un aspecto dependiente del contacto de la función efectora cooperadora de células T CD4⁺ activadas.

TABLA 5

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL mAb 5c8 SOBRE LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS						
Células T	Células B	PWM	mAb	Exp. 1	PFC Exp.2	Exp. 3
T CD4 ⁺	B	PWM		120	240	600
	B			240	600	4.800
	B			240	120	180
T CD4 ⁺	B			2.580	780	ND
T CD4 ⁺		PWM		3.840	240	60
T CD4 ⁺	B	PWM		149.760	85.200	25.800
T CD4 ⁺	B	PWM	5c8	58.000	4.680	9.000
T CD4 ⁺	B	PWM	OKT4	143.520	103.200	30.960

Se muestran los resultados de tres experimentos independientes en donantes no relacionados en los que se cultivaron las células T CD4⁺ a una relación 0,6:1 con células B autólogas aisladas en columna anti-Ig en presencia o ausencia de PWM. El número de colonias formadoras de placas (PFC) por 10⁶ células B se midió por el ensayo de placa hemolítica inversa. Los mAb 5c8 y OKT4 estaban presentes a 500 ng/ml, excepto en el experimento 1, en el que OKT4 estaba presente a 1 µg/ml. ND: No determinado.

Discusión

El clon Jurkat D1.1 es funcionalmente distinto de Jurkat CD4⁺ y de varias líneas celulares de células T leucémicas en que induce a células B de varios sujetos no relacionados a expresar las moléculas CD23 de superficie, un marcador de activación de células B, y a proliferar y a diferenciarse terminalmente en ISC en presencia de mitógenos de células B dependientes de células T. El efecto de D1.1 en la activación de células B requería un contacto celular íntimo y no podía justificarse por factores secretados o por IL-4 en particular. El hecho de que Jurkat D1.1 era capaz de inducir la activación y diferenciación de células B dependiente de contacto sugería que Jurkat D1.1 comparte estructura(s) de superficie con células T activadas que median la fase efectora cooperadora dependiente de contacto.

Las interacciones moleculares entre las células T activadas y las células B que median la fase efectora de la función T cooperadora son complejas y no se entienden bien. Varios estudios han medido los sucesos tempranos en la diferenciación de células B para diseccionar el mecanismo de la función efectora T cooperadora. Primero, la síntesis de ARN, ADN y enzimas asociadas con la progresión del ciclo celular de la célula B se induce por las células T activadas, pero no en reposo (O'Brien, *et al.*, 1988; Grusby, *et al.*, 1991; Noelle, *et al.*, 1991; Noelle, *et al.*, 1990; Zinkernagle, 1976; Sprent, 1978; Sprent, 1978; Jones, *et al.*, 1981; Julius, *et al.*, 1982; Chestnut, *et al.*, 1981). Segundo, la activación de células B, medida por la inducción de CD23 en la superficie de células B, se induce por las células T activadas, pero no en reposo (Zinkernagle, 1976). Tercero, la activación y proliferación de células B puede inducirse por células T activadas que se han fijado con paraformaldehído (Zinkernagle, 1976; Julius, *et al.*, 1982). Cuarto, la proliferación de células B se induce por preparaciones de membrana de células T activadas, pero no en reposo (Noelle, *et al.*, 1991; Katz, *et al.*, 1973; Brian, 1988). Finalmente, la capacidad de las células T activadas o de membranas de células T activadas para inducir la activación y proliferación de células B se anula por el tratamiento con proteasas (Katz, *et al.*, 1973; Jones, *et al.*, 1981). Consideradas todas juntas, estas observaciones corroboran la idea de que la activación de células T está asociada con la inducción de una estructura de superficie que interacciona con las células B y proporciona una señal dependiente de contacto para la activación y proliferación de células B. De forma similar a las células T activadas, pero a diferencia de otras líneas celulares leucémicas, Jurkat D1.1 tiene la capacidad de inducir la expresión de CD23 en células B de una manera que depende del contacto célula-célula, pero independiente de linfoquinas, especificidad de Ag o restricción al MHC. La inducción de la expresión de CD23 en la superficie de células B parece ser una etapa temprana o intermedia en la diferenciación de células B dirigida por células T a células secretoras de Ig que puede dirigirse por las superficies de células T activadas fijadas (Zinkernagle, 1976; Sprent, 1978). Además de inducir la expresión de CD23 en células B, Jurkat D1.1 era funcionalmente distinta de los clones de Jurkat CD4⁺ en que D1.1 induce la diferenciación terminal de células B en presencia de PWM. A este respecto, Jurkat D1.1 parece haber adquirido aspectos de superficie que comparte con células T activadas y que estimulan las células B.

La naturaleza de la estructura en Jurkat D1.1 responsable de la función cooperadora no se ha identificado en el presente trabajo. Como las moléculas CD28 en las células T se unen a un ligando en las células B (Hirohata, *et al.*, 1988), era de especial interés comparar la expresión de CD28 en los clones D1.1 cooperadores y B2-7 no cooperadores. Sin embargo, el hecho de que tanto Jurkat D1.1 como B2.7 expresaran moléculas CD28 demostraba que CD28 solo no podía ser responsable de las propiedades funcionales únicas de Jurkat D1.1. Además, en estudios de bloqueo de anticuerpos usando mAb específicos para CD2, CD3, CD5, CD38, LFA-1a, LFA-1b y LFA-3, no se pudo identificar ningún mAb capaz de inhibir la activación de células B mediada por D1.1 (no mostrado). Con el fin de identificar los distintos aspectos de la superficie celular de D1.1 que median la función efectora cooperadora, se hizo un intento para generar mAb que reaccionaran con D1.1 y que inhibieran la capacidad de D1.1 para cooperar con células B.

Aunque no se han identificado las estructuras de superficie que median la función cooperadora, el sistema D1.1 es ilustrativo con respecto al papel de las moléculas CD4 en la función efectora cooperadora. Es curioso que un subclón de Jurkat aislado por ser CD4⁻ posea función cooperadora, la cual normalmente está asociada con el subtipo de células T que expresan moléculas CD4 (Sprent, 1978; Jover, *et al.*, 1989). Varias líneas de investigación han sugerido que las moléculas CD4 no juegan un papel directo en la función efectora cooperadora (Mitchison, 1971; Grusby, *et al.*, 1991; Noelle, *et al.*, 1991; Vitetta, *et al.*, 1989; Noelle, *et al.*, 1990; Katz, *et al.*, 1973; Zinkernagle, 1976). Sin embargo, el hecho conocido de que TCR y CD4 interaccionen con las moléculas del MHC de clase II (Ia) (Whalen, *et al.*, 1988) ha sugerido que la unión de moléculas Ia debería ser un modelo para la función efectora cooperadora. Además, la observación de que la unión de moléculas Ia en las células B puede señalar las células B apoya más este modelo (Pollok, *et al.*, 1991; Bartlett, *et al.*, 1990; Martínez, *et al.*, 1981). El hecho de que Jurkat D1.1 tenga función efectora cooperadora pero sea CD4⁻ sugiere claramente que las moléculas CD4 no son necesarias para la fase efectora de la función cooperadora. Por el contrario, el hallazgo de que un clon de Jurkat CD4⁻ ha adquirido función cooperadora sugiere que las moléculas CD4 podrían inhibir la función efectora cooperadora de las células Jurkat CD4⁺. Con el fin de determinar directamente la relación entre la falta de moléculas CD4 en Jurkat D1.1 y su función cooperadora única, se generaron transfectantes CD4⁺ estables de D1.1 por electroporación de construcciones de ADNc CD4 dirigido por promotores heterólogos. La expresión de CD4 no inhibía la capacidad de los transfectantes D1.1 para activar las células B, lo que sugiere que la actividad cooperadora de D1.1 está mediada por aspectos de superficie distintos de la falta de moléculas CD4.

Recientemente se ha demostrado en el sistema murino que las preparaciones de membrana derivadas de linfocitos T activados, pero no en reposo, son suficientes para inducir la proliferación de células B, pero no la secreción de Ig (Noelle, *et al.*, 1991; Katz, *et al.*, 1973; Brian, 1988). La importancia de estos estudios en el sistema D1.1 actualmente no está clara, pero será interesante determinar si las membranas aisladas de células D1.1 inducen la expresión de CD23, la proliferación y la diferenciación terminal de células B. En cualquier caso, es probable que las células Jurkat D1.1 sean útiles para la identificación y caracterización de moléculas de superficie importantes en la mediación de la función cooperadora dependiente de contacto.

Se utilizó una línea leucémica Jurkat funcionalmente única (D1.1) con función cooperadora dependiente de contacto constitutiva para generar un mAb murino, denominado 5c8, que inhibía la activación de células B inducida por D1.1. El mAb 5c8 reconocía una especie de proteína única en las células D1.1 que no estaba unida por puentes disulfuro y migraba a un peso molecular de 30 kDa en SDS/PAGE. En células linfoides normales, la expresión del Ag 5c8 estaba restringida a un subtipo de linfocitos T después de la activación. La expresión inducida por activación del Ag 5c8 en células T requería la transcripción de ARNm y la síntesis proteica de novo. Se descubrió que el Ag 5c8 se expresaba transitoriamente en células T activadas, con un pico de expresión a las 6 h y la pérdida de expresión a las 24 h. La expresión del Ag 5c8 estaba restringida exclusivamente a células T CD4⁺ activadas. En estudios funcionales sobre células T normales, el mAb 5c8 inhibía la capacidad de las células T activadas fijadas para inducir la expresión de CD23 en células B. Además, el mAb 5c8 inhibía la capacidad de las células T normales para dirigir la diferenciación de células B. Estos datos juntos demuestran que el Ag 5c8 es una proteína de superficie nueva inducida por activación expresada exclusivamente en células T CD4⁺ activadas, que está implicada en la mediación de un elemento dependiente de contacto de la función T cooperadora.

La distribución tisular, cinéticas de expresión, requisitos metabólicos para la inducción y bioquímica del Ag 5c8 diferenciaba al Ag 5c8 de otras proteínas de superficie conocidas inducidas por la activación de células T. Primero, todos los demás marcadores de activación de células T conocidos (por ejemplo, CD69, CD25, Ia) se expresan tanto en células T CD4⁺ como CD8⁺, mientras que el Ag 5c8 se expresa exclusivamente en células T CD4⁺. Segundo, la cinética de expresión del Ag 5c8 tras la activación de células T era distinta de la de otras moléculas de activación de células T. Mientras que el Ag 5c8 tenía un máximo de expresión a las 6 h tras la activación y desaparecía a las 24 h de activación, CD25 (Doech, *et al.*, 1980), Ia (Rabin, *et al.*, 1985) y la forma de 32 kDa de CD27 se inducen a las 18 h o más desde la activación. Además, CD69 se expresa más rápidamente que el Ag 5c8 y (a diferencia del Ag 5c8) persiste durante más de 24 h. Tercero, el Ag 5c8 se diferenciaba de CD69 por los requisitos metabólicos de su inducción, porque la inducción de la expresión del Ag 5c8, pero no de CD69, dependía de la transcripción del ARNm y de la síntesis de proteínas. Cuarto, el Ag 5c8 era una especie de 30 kDa sin puentes disulfuro. Por el contrario, la molécula de activación temprana, CD69, es un heterodímero unido por puentes disulfuro de 28/32 kDa (Bjorn Dahl, *et al.*, 1988). Considerados conjuntamente, estos datos sugieren que el Ag 5c8 era distinto de otras moléculas de activación de células T conocidas.

El Ag 5c8 se diferenciaba también de otras moléculas de superficie de células T, que se sabe que juegan un papel en las interacciones T-B, en varios aspectos de su distribución tisular y bioquímica. Primero, el Ag 5c8 se inducía por la activación de células T, pero no se expresaba en células en reposo. Por el contrario, CD4, CD2, CD5, CD28, LFA-1, ICAM-1, CD45RO y 6C2, que interaccionan con ligandos de la superficie de células B (Doyle, *et al.*, 1987; Van de Velde, 1991; Tohma, *et al.*, 1991; Sanders, *et al.*, 1991; Linsley, *et al.*, 1990; Stamenkovic, *et al.*, 1991; Rothlein, *et al.*, 1986; Tanimoto, *et al.*, 1991) se expresan en células T en reposo (Rothlein, *et al.*, 1986; Tanimoto, *et al.*, 1991; Sanchez Madrid, *et al.*, 1982; Smith, *et al.*, 1986; Yamada, *et al.*, 1985). Segundo, la expresión específica del Ag 5c8 en linfocitos T activados y no en células B, monocitos o el panel de líneas celulares (tabla 1) diferenciaba el Ag 5c8 de las moléculas ICAM-1, CD4, CD5, LFA-1, CD2, y 6C2 que también se expresan en monocitos, células B o en ciertas líneas celulares (no mostrado). Tercero, la expresión del Ag 5c8 estaba restringida a las células T CD4⁺, mientras que CD2, CD5, CD28, FA-1, ICAM-1, CD45RO y 6C2 se expresan en células CD8⁺, así como en células CD4⁺ (Rothlein, *et al.*, 1986; Tanimoto, *et al.*, 1991; Sanchez Madrid, *et al.*, 1982; Smith, *et al.*, 1986; Yamada, *et al.*, 1985). Cuarto, la proteína de 30 kDa precipitada por el mAb 5c8 es diferente de cualquiera de estas otras proteínas (Rothlein, *et al.*, 1986; Tanimoto, *et al.*, 1991; Sánchez Madrid, *et al.*, 1982; Smith, *et al.*, 1986; Yamada, *et al.*, 1985). Finalmente, el Ag 5c8 era distinto de estas otras moléculas porque el mAb 5c8 se identificó por su capacidad para inhibir la función efectora cooperadora mediada por Jurkat D1.1.

Como el mAb 5c8 inhibe los efectos cooperadores dependientes de contacto de Jurkat D1.1 y linfocitos T activados fijados, es probable que el Ag 5c8 medie una función activadora de células B mediante la interacción con un ligando (o "contrarreceptor") en la superficie de células B. La interacción del Ag 5c8 con un contrarreceptor de la célula B puede mediar la función cooperadora proporcionando una fuerza de adhesión adicional a los pares T-B, transduciendo una señal estimuladora al citoplasma de la célula B o por una combinación de estos mecanismos. Independientemente del mecanismo preciso, la expresión transitoria del Ag 5c8 puede proporcionar una solución molecular para limitar la activación no específica de células B. La expresión transitoria del Ag 5c8 en el entorno localizado de los pares T-B afines específicos de antígeno puede dirigir la función activadora no restringida a antígeno/MHC del Ag 5c8 a la diana apropiada de las células B. La cinética de expresión y regulación negativa del Ag 5c8 son compartidas por el mediador de la superficie celular de la célula endotelial inducido por activación de la unión de leucocitos y linfocitos, ELAM-1 (Bevilacqua, *et al.*, 1987). Esta semejanza podría indicar que la estrategia de utilización de la expresión transitoria para lograr interacciones intercelulares localizadas puede estar compartida por el Ag 5c8, ELAM-1 y potencialmente otras moléculas de superficie, aún sin caracterizar, que transmiten señales potentes a otras células por contacto directo.

La molécula CD4 identifica la población de células T que contiene precursores de células T con función cooperadora (Reinherz, *et al.*, 1979). Sin embargo, el subtipo CD4⁺ es funcionalmente heterogéneo y contiene células citotóxicas y supresoras, además de las células cooperadoras (Krensky, *et al.*, 1982; Thomas, *et al.*, 1981). El hecho de que el Ag 5c8 esté implicado en la función cooperadora sugiere que el Ag 5c8 puede estar en correlación más estrecha con el fenotipo cooperador que la expresión de CD4. La distribución heterogénea de la expresión de 5c8 en células CD4⁺ activadas sugiere que el subtipo funcional de células T CD4⁺ podría distinguirse por sus niveles de expresión de 5c8. Por ejemplo, sería interesante determinar la función potencial de células T CD4⁺ 5c8⁻ y 5c8⁺ con respecto a la actividad cooperadora o citotóxica.

La función efectora de células T cooperadoras es un proceso complejo que tiene como resultado la sensibilización de células B (Krusemeier, *et al.*, 1988; Hodgkin, *et al.*, 1990; Noelle, *et al.*, 1991; Kubota, *et al.*, 1991), la regulación del cambio de isotipo (Tesch, *et al.*, 1984) y la hipermutación somática (Weigert, *et al.*, 1970). El hecho de que las células T interaccionen con las células B a través de numerosas interacciones célula-célula, así como por la secreción de varias linfoquinas sugiere que señales individuales o ciertas combinaciones de señales pueden regular aspectos específicos de la diferenciación de células B. El hecho de que el mAb 5c8 inhiba un aspecto dependiente de contacto de la función cooperadora de células T proporciona un medio para diseccionar más los procesos por los cuales las células T CD4⁺ regulan la respuesta inmune humoral.

20 Segunda Serie de Experimentos

Interacciones moleculares que median la colaboración de linfocitos T-B en folículos linfoides humanos

En un proceso denominado función T cooperadora, los linfocitos T CD4⁺ seleccionan e inducen la diferenciación de células B específicas de antígeno que median la respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpo) (Mitchell, *et al.*, 1968; Mitchison, 1971; White, *et al.*, 1978; Reinherz, *et al.*, 1979; Janeway, *et al.*, 1988; Rehemtulla, *et al.*, 1991; Grusby, *et al.*, 1991). Las interacciones T-B fisiológicas se producen en los folículos linfoides, pero varios sistemas *in vitro* han permitido una disección mecánica de las señales de T cooperadores. Aunque la fase inductiva de la cooperación está restringida al antígeno y al MHC, la fase efectora no es específica y está mediada por linfoquinas y por señales dependientes de contacto (Martinez, *et al.*, 1981; Anderson, *et al.*, 1980; Clement, *et al.*, 1984; Crow, *et al.*, 1986; Brian, 1988; Hirohata, *et al.*, 1988; Noelle, *et al.*, 1990; Whalen, *et al.*, 1988).

Se lograron progresos en el esclarecimiento de las señales dependientes de contacto por la reciente identificación de un subclón funcionalmente único de la línea de leucemia de células T Jurkat, D1.1, que activa constitutivamente células B periféricas en reposo (Yellin, 1991). Se ha demostrado previamente que el clon D1.1 induce en las células B en reposo la expresión de las moléculas CD23 de superficie, dirige la proliferación de células B e induce la diferenciación de células B en células formadoras de Ab (Yellin, 1991). La capacidad activadora de células B de D1.1 se localizó en la superficie celular, porque D1.1 fijadas en paraformaldehído retenían la capacidad de activar células B, pero los sobrenadantes de D1.1 eran inactivos (Yellin, 1991). Juntos, estos datos sugieren que D1.1 compartía estructuras de superficie con células T activadas que median la función cooperadora dependiente de contacto.

En la primer serie de experimentos, una de tales estructuras, denominada Ag 5c8, se identificó mediante la selección de hibridomas para mAb que reaccionan específicamente con D1.1 y que inhiben la activación funcional de células B por D1.1 (Lederman, *et al.*, 1992). El mAb 5c8 identificó una nueva estructura de 30 kDa que se expresaba en células T CD4⁺ activadas, pero no en células T CD8⁺, células B o monocitos (Lederman, *et al.*, 1992). Las cinéticas de la expresión en la superficie celular del Ag 5c8 tras la estimulación con PHA y PMA son relativamente únicas, ya que la expresión máxima se produce a las 6 h, pero va seguida de una regulación negativa que tiene como resultado la expresión basal (ausencia de expresión) a las 24 h (Lederman, *et al.*, 1992). En ensayos funcionales, el mAb 5c8 inhibe la capacidad de células CD4⁺ normales para dirigir la diferenciación de células B en células formadoras de anticuerpo (Lederman, *et al.*, 1992). Considerados conjuntamente, estos datos demuestran que el Ag 5c8 es un componente de las estructuras de superficie en las células T CD4⁺ que median la función cooperadora dependiente de contacto y, por tanto, el Ag 5c8 ahora se ha redenidoado "molécula de célula T activadora de célula B" (T-BAM).

Aunque el T-BAM es una de las moléculas de las células T que induce la función cooperadora dependiente de contacto *in vitro*, se sabe poco acerca de su ligando o "contrarreceptor" en células B, o qué papeles de otras moléculas de células T y B están mediando la función cooperadora dependiente de contacto en tejidos linfoides *in vivo*. Se han descrito varias moléculas de superficie de las células B interesantes que pueden desempeñar papeles en la recepción de señales dependientes de contacto en tejido linfoide. Entre éstas se encuentran la molécula CD40, la molécula CR2 y moléculas de adhesión. La molécula CD40 en la superficie de células B humanas tiene funciones señalizadoras interesantes relevantes para la diferenciación de células B en ganglios linfáticos (Clark, *et al.*, 1986; Clark, *et al.*, 1988; Ledbetter, *et al.*, 1987; Ledbetter, *et al.*, 1986) porque anti-CD40 (mAb G28-5 (Clark, *et al.*, 1986)) previene la muerte programada (apoptosis) de células B del centro germinal (Lim, *et al.*, 1989) y se ha demostrado que induce la proliferación, la diferenciación y el crecimiento a largo plazo de células B humanas (Banchereau, *et al.*, 1991a; Banchereau, *et al.*, 1991b). CR2 es un receptor de complemento en células B que puede enviar señales mitogénicas a las células B después de la activación desencadenada por anticuerpo o en su papel como receptor de la superficie celular del virus de Epstein Barr (Nemerow, *et al.*, 1985; Carter, 1988). Finalmente, se sabe que los receptores de adhesión LFA-1, LFA-3 e ICAM-1 tienen papeles en las interacciones de adhesión de muchas interacciones celulares y mAb que reaccionan con estas estructuras inhiben los procesos de células B dependientes de células T (Tohma,

et al., 1991a; Tohma, *et al.*, 1991b). Sin embargo, no se han definido los papeles precisos de estas moléculas en las interacciones cooperadoras.

En esta segunda serie de experimentos, estos hallazgos se extendieron en tres sentidos. Primero, se identificó un clon de linfoma de células B, RAMOS 266 (Siegel, *et al.*, 1990) que responde al contacto con células D1.1 de manera que se inhibe con anti-T-BAM (mAb 5c8). Segundo, se identificó una estructura de superficie en células B (CD40) que participa con T-BAM en la mediación de la activación T-B dependiente de contacto. Tercero, se demuestra que T-BAM se expresa por células T predominantemente en las zonas de manto y centrocítica de ganglios linfáticos *in vivo*, que son los sitios anatómicos de interacciones de células T con células B que expresan CD40.

Materiales y Métodos

Líneas Celulares. Los clones de Jurkat D1.1 y B2.7 se han descrito (Yellin, *et al.*, 1991; Lederman, *et al.*, 1992). El clon RAMOS 266, 4CN 3F10 (RAMOS 266) (Siegel, *et al.*, 1990) fue cedido amablemente por el Dr. Jay P. Siegel del Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration (Bethesda, MD). Las células L que expresan el FcRgII (CD32) humano (cedidas por el Dr. Jacques Banchereau, Schering-Plough, (Dardilly Cedex, France) (24) o las células L que expresan el Ia de ratón (cedidas por el Dr. Ned Braunstein, Columbia University).

Anticuerpos monoclonales. El mAb 5c8 (IgG2a) se ha descrito (Lederman, *et al.*, 1992). Los siguientes mAb se produjeron a partir de los hibridomas disponibles en la American Type Culture Collection (Manassas, VA); OKT4 (anti-CD4), OKT8 (anti-CD8), OKT3 (anti-CD3), W6/32 (anti-MHC de clase I), THB-5 (anti-CR2 (CD21)), TS1/22.1.13 (anti-LFA1a (CD11a), TS1/18.1.2.11.4 (anti-LFA-1b (CD18)) y TS2/9.1.4.3 (anti-LFA-3 (CD58)). Estos mAb se usaron a concentraciones saturantes de sobrenadantes de hibridoma o diluciones de líquido ascítico o se purificaron a partir de líquido ascítico en columnas de proteína A (Biorad, Rockville Center, NY) o de proteína G (Pharmacia®, Uppsala, Suecia). Anti-LFA-3 (7A6) fue cedido por la Dra. Vicki Sato; Biogen (Cambridge, MA). Anti-CD23-PE, leu16 (anti-CD20) y leuM5 (IgG2b anti-CD11c) se adquirieron en Becton Dickinson (Mountainview, CA). El mAb G28-5 (19) fue cedido por el Dr. Edward A. Clark, University of Washington (Seattle, WA). El mAb RR1/1.1.1 (anti-ICAM-1 (CD54)) fue cedido por el Dr. Peter Lipsky, University of Texas, Southwestern medical Center (Dallas, TX). El mAb anti-CD40 B-B20 (IgG1) se adquirió en Biosource International (Camarillo, CA). El mAb 32.2 (anti-FcRgII (CD32)) se adquirió en Medarex, West Lebanon, NH. El anti-IgM marcado con FITC se adquirió en Tago (Burlingame, CA). Los mAb de control de isotipo compatible no relacionados, UPC-10 (IgG2a) y MOPC141 (IgG2b) se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO). Anti-IL-4 y anti-GM-CSF se adquirieron en Genzyme (Cambridge, MA).

Análisis por Citometría de Flujo. Se incubaron aproximadamente 10^5 células con concentraciones saturantes de los mAb indicados durante 45 min a 4°C en presencia de 80 mg/ml de IgG humana agregada por calor (International Enzyme, Fallbrook, CA). Se lavaron las células para eliminar el mAb no unido antes de la incubación con el anticuerpo secundario F(ab)₂ de cabra anti-Ig de ratón conjugado con fluoresceína (Cappel, Cochranville, PA). Para el análisis de doble tinción, las células se hicieron reaccionar con el mAb indicado directamente conjugado con FITC o con ficoeritrina (PE) durante 45 min a 4°C en presencia de IgG humana agregada. Antes de su análisis, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS. La intensidad de fluorescencia se midió en un citómetro de flujo FASCAN (Becton-Dickinson, Mountainview, CA). En experimentos que implicaban el cocultivo de células B con clones de Jurkat, las células Jurkat se excluyeron del análisis de fluorescencia de células B seleccionando las distintas poblaciones de células con un dispersor de luz frontal y lateral.

Linfoquinas

rIL-4 fue cedida por el Dr. Robert Coffman, DNAX y rIL-2 por Hoffman-LaRoche.

Aislamiento de poblaciones celulares

Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron de sangre recién extraída de voluntarios sanos mediante centrifugación en ficoll-hypaque (Sigma, St. Louis, MO). Las células B de bazo se obtuvieron de forma similar a partir de muestras de biopsias recientes de donantes de órganos (proporcionadas por el Dr. Mark Barr, Department of Surgery, Columbia University). Las células B de amígdalas se obtuvieron a partir de muestras quirúrgicas recientes tras una tonsilectomía (proporcionadas por el Dr. Joseph Hadad, Department of ENT, Columbia University). Las células B de tejido linfoide se obtuvieron triturando las muestras de tejido y pasándolas a través de un tamiz metálico seguido de la centrifugación en ficoll-hypaque.

Se hizo una selección positiva de células T con eritrocitos de oveja tratados con neuraminidasa. Las células B procedían de la población de células que no sedimentaba a través de ficoll-hypaque tras dos vueltas de formación de rosetas con eritrocitos de oveja tratados con neuraminidasa.

Las células B se purificaron adicionalmente por centrifugación en gradiente de densidad. Las células E⁻ se cultivaron durante toda una noche en matraces de poliestireno (37°C, 5% de CO₂) para eliminar los macrófagos por adherencia. Estas células no T, no macrófagos se fraccionaron en fracciones de alta y baja densidad en un gradiente discontinuo de percoll 30%/50%/100% por centrifugación a 2300 rpm durante 12 min. Las células de alta densidad se obtuvieron de la interfase 50%/100% y las células de baja densidad de la interfase 30%/50% (Crow, *et al.*, 1985). Las células de alta densidad (en reposo) de sangre periférica eran típicamente de un 60 a un 90% de CD20⁺, de un 55 a

un 90% de IgM⁺ y <5% de CD3⁺ y <5% de CD23⁺ (fondo). Las células B de alta densidad de amígdalas y bazo eran >95% de CD20⁺.

Experimentos de cultivo de células L

Las células L que expresan el FcRgII (CD32) humano o el Ia de ratón se desarrollaron casi hasta la confluencia en DMEM con 10% de FCS en placas de 12 pocillos (Costar, Cambridge, MA). La monocapa se lavó una vez con medio y se añadieron 2 x 10⁶ células B en 1 ml de IMDM con 10% de FCS a la monocapa antes de añadir el medio de control o 2 mg de los mAb G28-5, B-B20 o mAb de control. Después de 18 h de cultivo, se recogieron las células B mediante pipeteo con agitación moderada, se lavaron una vez y se analizó la expresión de CD23 por FACS como se ha descrito anteriormente.

Ensayos de activación y diferenciación de células B. En los experimentos para medir la inducción de la expresión de CD23 en la superficie de células B, se añadieron de 1 a 2 x 10⁵ células B de alta densidad o células RAMOS 266 a un número igual de células Jurkat en 200 ml de IMDM con un 10% de FCS en pocillos de microtitulación de fondo redondo (Nunc) y se ensayó la expresión de CD23 después de 18 a 24 h.

Muestras de Tejido Humano. Se recogieron muestras de biopsias durante el transcurso del procedimiento de diagnóstico estándar o en autopsias y se enviaron inmediatamente al laboratorio. Se congelaron rápidamente porciones representativas de cada muestra de tejido a una temperatura óptima de corte (compuesto OCT, Miles, Elkhart, ID) en placas de corcho circular en una mezcla de isopentano y hielo seco y se almacenaron durante periodos variables a -70°C. Se fijaron rutinariamente porciones representativas de cada muestra en formalina tamponada, B5 o de Bouin, se incluyeron en parafina y se prepararon cortes teñidos con hematoxilina y eosina (H&E).

Se recogieron porciones representativas de múltiples muestras de tejido benigno de pacientes al azar durante el transcurso del diagnóstico de rutina y se examinaron mediante inmunohistoquímica para determinar la unión del mAb 5c8. Estas muestras incluían: 2 muestras de esófago, 2 de estómago, 3 de intestino delgado, 6 de colon, 2 de páncreas, 3 de hígado, 3 de riñón, 3 de útero, 2 de ovario, 2 de testículos, 1 de próstata, 4 de pulmón, 2 de corazón, 3 de piel, 2 de mama, 2 de cerebro, 14 de amígdala, 7 de timo, 4 de ganglios linfáticos, 10 de bazo y 5 de apéndice.

Tinción Inmunohistoquímica. Se hicieron cortes seriados en congelación de 4 micrómetros de los bloques de tejido crioconservados, se fijaron y se tiñeron como se ha descrito previamente en detalle (Inghirami, *et al.*, 1990). En resumen, los cortes se incubaron en serie con los mAb apropiadamente titulados, con un F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón (específico de Fc gamma; 1:200, Organon Teknika, Malvern, PA) y el complejo fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP, Dako, Santa Barbara, CA) y posteriormente se revelaron con New Fuschin y B-naftol-AS-bifosfato como sustrato. Como alternativa, los cortes se incubaron con mAb primario o un mAb no relacionado de isotipo compatible, se lavaron tres veces y se incubaron con anticuerpo de caballo anti-IgG de ratón biotinilado (Vector, San Diego, CA). Se aplicó el complejo avidina-biotina conjugado con peroxidasa y se reveló con diaminobencidina (DAB) y en algunos casos se amplificó con cloruro de níquel. También se realizó una doble tinción por inmunohistoquímica en cortes de tejido en congelación como se ha descrito previamente (Inghirami, *et al.*, 1991). En resumen, los cortes se tiñeron primero con un mAb solo (mAb 5c8, o un mAb no relacionado de isotipo compatible (UPC-10, IgG_{2a}) usando la técnica de ABC (Vector) y se revelaron con DAB. Los cortes después se incubaron con mAb (leu M5, CD11c) o un mAb no relacionado de isotipo compatible, se lavaron tres veces y se incubaron con el complejo APAAP y luego se revelaron como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Identificación de una Línea Celular de Linfoma B que Responde a la Activación Desencadenada por D1.1

Hemos demostrado previamente que el Ag 5c8 (T-BAM) es una proteína de superficie de células T CD4⁺ activadas implicado en la función cooperadora dependiente de contacto (Lederman, *et al.*, 1992). Con el fin diseccionar más este proceso, intentamos identificar un sistema de líneas celulares de linfoma clonadas homogéneas para potenciar un análisis molecular de los papeles de T-BAM y otras moléculas. Con este propósito, utilizamos la línea celular de linfoma D1.1 que expresaba T-BAM para identificar un linfoma de células B que respondieran al contacto de D1.1 mediante la regulación positiva de CD23. Una línea celular candidata era el clon RAMOS 266 que expresa bajos niveles de CD23, pero la IL-4 inducía la expresión de altos niveles de CD23 (Siegel, *et al.*, 1990).

Para investigar si RAMOS 266 respondía al contacto mediado por células D1.1 cultivamos células RAMOS 266 con células D1.1 y medimos la expresión en la superficie celular de CD23 en RAMOS 266 mediante análisis FACS de doble tinción (figura 12). En estos experimentos, se cultivaron células B periféricas con D1.1 como control positivo porque se sabe que las células B responden al contacto de D1.1 incrementando el CD23 de superficie (figura 12). Como control negativo, las células RAMOS 266 o las células B periféricas se cultivaron con el clon de Jurkat B2.7 que no expresa T-BAM y no activa células B (Lederman, *et al.*, 1992). Como era de esperar, Jurkat D1.1, pero no Jurkat B2.7, inducía en las células B periféricas la expresión de moléculas CD23 de superficie después de 18 h en cultivo (figura 12). Significativamente, de forma similar a su efecto en las células B periféricas, las células D1.1, pero no las células B2.7, inducían en RAMOS 266 la expresión de CD23 después de 18 h de cocultivo (figura 12). Una diferencia aparente en las respuestas entre RAMOS 266 y las células B periféricas era que la población completa de RAMOS 266 regulaba positivamente CD23 como un pico homogéneo, mientras que las células B periféricas tenían típicamente una

población diferenciada que respondía (por regla general, el 80% expresaban CD23) y una población diferenciada que no respondía (por regla general, el 20% eran CD23⁻). Debido a esta distinción, era necesario cuantificar la respuesta de RAMOS 266 como la intensidad media de fluorescencia (MFI) del único pico de expresión de CD23 y cuantificar la respuesta de células B periféricas como el porcentaje de células que respondían (figura 12). Los experimentos de dosis-respuesta, en los que se añadieron diferentes cantidades de células D1.1 a un número constante de RAMOS 266 o células B, validaron estas medidas porque la disminución del número de células D1.1 tenía como resultado una disminución en la MFI de RAMOS 266 (no mostrado) y una disminución en el porcentaje de células B CD23⁺ (Yellin, *et al.*, 1991), respectivamente. Estos datos demuestran que RAMOS 266 responde al cocultivo con D1.1 de una manera que parece ser análoga a la respuesta de células B periféricas.

Para determinar si el efecto de D1.1 sobre RAMOS es dependiente de T-BAM, después se estudió el efecto del mAb 5c8 anti-T-BAM sobre la activación mediada por D1.1. En estos experimentos, se añadió el mAb 5c8 o un mAb de control de isotipo a cultivos de RAMOS 266 o a células B periféricas con células D1.1 (fig. 12). De forma similar al efecto conocido del mAb 5c8 sobre la inhibición de la activación de células B periféricas por D1.1, el mAb 5c8 inhibía la activación de RAMOS 266 por D1.1 (fig. 12). Por el contrario, los mAb de control de isotipo no inhibían el efecto de D1.1. Considerados en conjunto, estos datos demuestran que una línea celular de linfoma B (RAMOS 266) posee la maquinaria celular necesaria para expresar CD23 tras la activación por D1.1 y que la interacción D1.1-RAMOS 266 puede inhibirse por el mAb 5c8. Además, estos datos sugieren que la interacción D1.1-RAMOS 266 puede ser un sistema modelo valioso para diseccionar más la señalización T-B dependiente de contacto en líneas celulares de linfoma homogéneas.

Como, en última instancia, nuestro interés en estos estudios era definir el papel de T-BAM en la diferenciación de células B linfoides, después estudiamos el efecto de D1.1 sobre células B aisladas a partir de órganos linfoides. Por lo tanto, en experimentos similares a los descritos anteriormente, cultivamos células B aisladas de órganos linfoides con células D1.1 en presencia y ausencia del mAb 5c8 y anticuerpos de control. De forma similar al efecto de D1.1 sobre células B periféricas y sobre el clon de linfoma (RAMOS 266), encontramos que las células D1.1 activan las células B de amígdalas (fig. 13) o bazo (no mostrado) para expresar moléculas CD23. Además, el efecto de las células D1.1 sobre células B linfoides se inhibía con el mAb 5c8 y no con los mAb control (fig. 13). Estos datos demuestran que las interacciones moleculares entre las células D1.1 y RAMOS 266 son paralelas a las interacciones moleculares entre células T y B en los órganos linfoides.

Se ha demostrado previamente que los efectos potenciadores de D1.1 sobre las células B son independientes de factores secretados. Para determinar cómo las células D1.1 activan RAMOS 266, la siguiente serie de experimentos estudió el efecto de D1.1 sobre RAMOS con respecto a la liberación de linfoquinas y, en particular, el papel de la IL-4. En estos experimentos, se cultivó RAMOS 266 con sobrenadantes de D1.1, células D1.1, rIL-2 o rIL-4 y se midió el nivel de expresión de CD23 en superficie mediante FACS después de 18 h. Como se muestra en la fig. 14a., las células D1.1 o IL-4 inducían CD23 en RAMOS 266 o células B periféricas. Por el contrario, el sobrenadante de D1.1 o rIL-2 no tenía ningún efecto (figura 14a). Además, el efecto de rIL-4, pero no el de D1.1, se inhibía por anti-IL4 (figura 14a). Finalmente, el mAb 5c8 no inhibía el efecto de rIL-4 (fig. 14a). Considerados en conjunto, estos datos sugieren que el efecto de D1.1 sobre RAMOS 266 es independiente de la liberación de linfoquinas y confirma las observaciones previas de que D1.1 no secreta IL-4 bioactiva (figura 14a).

Identificación de las Moléculas de Superficie de Células B Implicadas en la Activación Desencadenada por T-BAM

Después se aprovechó el sistema D1.1-RAMOS 266 para identificar las moléculas de superficie de la célula B que juegan un papel en las interacciones T-B dependientes de contacto. De las moléculas de superficie de células B caracterizadas, consideramos CD40, CR2 y receptores de adhesión como candidatos para tener un papel en la señalización dependiente de contacto debido a sus conocidos papeles en la activación de células B y, en particular, con respecto a las interacciones dependientes de contacto (Banchereau, *et al.*, 1991a; Nemerow, *et al.*, 1985; Carter, *et al.*, 1988; Tohma, *et al.*, 1991a; Tohma, *et al.*, 1991b; Emilie, *et al.*, 1988; Sen, *et al.*, 1992). Por lo tanto, estudiamos el efecto de los mAb contra estas moléculas de células B en la activación mediada por D1.1 de RAMOS 266 y células B periféricas.

En estos experimentos, se cultivaron las células D1.1 con RAMOS 266 o células B periféricas en presencia de un panel de mAb que reaccionan con las moléculas de superficie de células B y se midió la expresión de CD23 en RAMOS 266 o células B después de 18 h. El mAb 5c8 sirvió como un control positivo para la inhibición en estos experimentos (fig. 12). Significativamente, el mAb anti-CD40, G28-5 (Clark, *et al.*, 1986) inhibía la activación de RAMOS 266 o células B mediada por D1.1 (figura 12, 14b), mientras que los mAb contra CD2, LFA-1, LFA-3 e ICAM-1 tenían poco efecto (fig. 12, 14 b). Además de G28-5 (IgG1), el mAb anti-CD40 B-B20 (IgG1) también inhibía el efecto de D1.1 (fig. 15). En estos experimentos, el mAb anti-LFA1a, TS1/22 (IgG1), que reacciona con la superficie de células B y RAMOS 266, sirvió como un control negativo de isotipo compatible (fig. 14b, 15). En experimentos similares, encontramos que anti-CD40 inhibía el efecto de D1.1 sobre células B aisladas de órganos linfoides (fig. 13). Juntos, estos datos demuestran que los mAb anti-CD40 son únicos entre los anticuerpos anti-células B ensayados en que inhiben la regulación positiva del CD23 de células B mediada por D1.1.

Fue un tanto sorprendente que los mAb anti-CD40 inhiban la expresión de CD23 porque se sabe que los mAb anti-CD40 aumentan la expresión de CD23 en células B inducida por rIL4 (Clark, *et al.*, 1989). Por lo tanto, se volvió a tratar esta cuestión y se descubrió que, en contraste con el efecto inhibitorio de G28-5 sobre la expresión de

CD23 inducida por D1.1, G28-5 aumenta la regulación positiva de CD23 inducida por rIL-4 sobre células B y el clon indicador RAMOS 266 (fig. 14a). Estos datos juntos demuestran que, mientras que los mAb anti-CD40 inhiben el efecto de D1.1 sobre células B, el efecto de estos mAb sobre células B no es una inhibición general de la activación, porque anti-CD40 potencia el efecto de rIL-4.

Actualmente se desconoce cómo inhibe anti-CD40 las interacciones de cooperación por contacto pero potencia otras señales activadoras en células B. Una posibilidad es que D1.1 exprese una molécula de superficie que interacciona con CD40. Nosotros razonamos que si moléculas de superficie de las células D1.1 están interaccionando con CD40 para estimular a las células B, entonces los anticuerpos anti-CD40 en una configuración multimérica pueden mimetizar el efecto de D1.1 y regular positivamente el CD23 de células B. Por lo tanto, se estudió el efecto de G28-5 sobre el CD23 de RAMOS 266 y células B en presencia de células L que expresan FcRgII, que se ha demostrado que es una configuración para inducir la proliferación de células B periféricas (Banchereau, *et al.*, 1991a). Por tanto, cultivamos células B en presencia de G28-5, B-B20 o mAb de control en presencia de células L que expresan FcRgII y de control y estudiamos la expresión de CD23 en las células B después de 18 h. Se descubrió que el anti-CD40 polivalente, pero no monovalente, inducía la expresión de CD23 en células B periféricas y RAMOS (fig. 16a), así como en células B de amígdala y de bazo (fig. 16b). Considerados en conjunto, estos datos demuestran que los mAb anti-CD40 multiméricos activan la expresión de CD23 en células B y sugiere que el efecto inhibitorio de los mAb anti-CD40 en el sistema D1.1 puede ser el resultado del mAb anti-CD40 monomérico que inhibe la interacción de moléculas CD40 con un ligando de entrecruzamiento en la superficie de D1.1.

Expresión de T-BAM en Áreas de Tejido Linfoide Implicadas en las Interacciones T-B

Como las células T CD4⁺ median la función cooperadora en estructuras transitorias inducidas por antígeno en tejidos linfoides denominadas folículos o centros germinales, se investigó la distribución tisular de T-BAM por inmunohistoquímica para examinar si T-BAM se expresa sobre células T en folículos linfoides. Se fijaron con acetona cortes de tejido congelado preparado a partir de tejidos humanos normales y se tiñeron con el mAb 5c8 y varios mAb de control por inmunohistoquímica. La expresión de T-BAM estaba restringida a células mononucleares relativamente pequeñas en tejido linfoide (fig. 16) y no se observó en ningún otro tejido, incluyendo, músculo, cerebro, riñón, intestino, ovario, útero, testículos, piel, pulmón o hígado (véase la sección de Materiales y Métodos).

Con el fin de caracterizar la localización precisa de las células portadoras de T-BAM en el tejido linfoide, se analizaron amígdalas, ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado al tracto GI, bazo y timo. Las células que expresan T-BAM se localizan preferentemente en la zona del manto y en la zona clara del centro germinal de folículos secundarios de todos los tejidos linfoides periféricos con un patrón que se asemeja claramente a la distribución de linfocitos T CD4⁺ en estos sitios (fig. 17). En amígdalas, el análisis de doble tinción por inmunohistoquímica con el mAb 5c8 y anti-CD4 o anti-CD8 demostró que la expresión de T-BAM está restringida a linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y no se observa en células T CD8⁺ (no mostrado). Además, la doble tinción sugiere que una gran mayoría (>50%) de los linfocitos T CD4⁺ existentes dentro de los folículos secundarios expresan T-BAM.

Como los datos *in vitro* demuestran que T-BAM y CD40 participan en una interacción dependiente de contacto, estábamos interesados en estudiar la relación de las células que expresan T-BAM y CD40 *in vivo*. Usando mAb anti-CD40 en análisis de tinción simple o doble por inmunohistoquímica, se confirmó la conocida observación de que tanto las células B como las células dendríticas foliculares expresan altos niveles de CD40 (Clark, *et al.*, 1986; Hart, *et al.*, 1988) (datos no mostrados). Como las células T que expresan T-BAM están rodeadas por abundantes células B CD40⁺, fuimos incapaces de determinar la relación de las células T que expresan T-BAM con las células dendríticas foliculares por la alta concentración de células B. Con el fin de identificar con más precisión la relación de las células que expresan T-BAM con las células dendríticas dentro del centro germinal folicular, realizamos un análisis de doble tinción por inmunohistoquímica usando el mAb 5c8 y mAb anti-CD11c que, como se sabe, reconocen las células dendríticas foliculares. Utilizando esta estrategia demostramos que las células T-BAM están a menudo en las proximidades o en contacto directo con las células dendríticas foliculares y/o sus proyecciones citoplásmicas, indicando quizás, que además de interacciones con las células B CD40⁺, las células T que expresan T-BAM pueden interaccionar con células dendríticas foliculares que también expresan CD40 (datos no mostrados).

Además de la localización característica de las células que expresan T-BAM en los folículos, también se pueden identificar, aunque es relativamente raro (<1%), células que expresan T-BAM dentro de las áreas interfoliculares de tejidos linfoides periféricos, áreas de células T esplénicas y la corteza de timo normal. La escasez de células T que expresan T-BAM en el timo era interesante dado el alto número de células que expresan CD4 en este tejido. Considerados conjuntamente, los datos funcionales *in vitro* y la localización de células portadoras de T-BAM en áreas anatómicas de interacciones T-B fisiológicamente relevantes, apoyan claramente la idea de que T-BAM es importante en la cooperación de células T *in vivo*.

Discusión

Las interacciones entre células T y B que dan como resultado respuestas específicas de anticuerpos implican interacciones críticas dependientes de contacto durante la fase efectora de la función de T cooperadoras. Se ha demostrado recientemente que la proteína de activación de superficie restringida a células T CD4⁺, T-BAM, es un componente de la señal cooperadora dependiente de contacto para las células B (Lederman, *et al.*, 1992). Las interacciones molecu-

lares que median la señalización dependiente de contacto T-B se estudiaron adicionalmente usando una línea celular que expresa T-BAM (D1.1) y un mAb anti-T-BAM (5c8) que bloquea la activación de células B mediada por T-BAM (Lederman, *et al.*, 1992). En esta segunda serie de experimentos, se demostró: 1) que además de las células B de sangre periférica, las células B linfoides y un clon de linfoma B (RAMOS 266) responden al contacto de células D1.1 de forma que se inhibe por anti-T-BAM (mAb 5c8); 2) que CD40 es una estructura de superficie en células B (CD40) que participa con T-BAM en la mediación de la activación T-B dependiente de contacto; y 3) que T-BAM se expresa por las células T localizadas predominantemente en el manto y en las zonas centrocíticas de ganglios linfáticos *in vivo* que son los sitios anatómicos de interacciones de células T con células B que expresan CD40. Estos datos refuerzan la idea de que T-BAM es una señal potencialmente relevante enviada por las células T a las células B en el proceso de diferenciación de células B en ganglios linfáticos.

Además, la disponibilidad de RAMOS 266, que parece expresar el ligando de T-BAM, sería útil en la generación y selección de anticuerpos contra otras estructuras de superficie de células B que juegan papeles en la señalización cooperadora dependiente de contacto, así como para caracterizar bioquímicamente los mensajeros moleculares que median la diferenciación de células B dependiente de células T.

Utilizando el sistema D1.1-RAMOS 266, en el presente informe, analizamos el papel de ciertas moléculas de superficie de células B en la cooperación dependiente de contacto. Observamos que los mAb anti-CD40 G28-5 y B-B20 inhiben el efecto de las células D1.1 sobre RAMOS 266 y células B de sangre periférica y órganos linfoides. Por el contrario, los mAb contra CR2, LFA1, LFA3 e ICAM-1 no inhiben el efecto de D1.1 sobre células B. Estos datos sugieren un papel preciso para CD40 en la recepción de una señal de células T que es coincidente y está altamente asociada con el contacto celular T-B. Sin embargo, nuestro sistema no se dirige hacia los papeles precisos de LFA1 e ICAM-1 en las interacciones T-B. Aunque el mAb anti-ICAM-1 (RR1/1.1.1) no inhibe la activación de RAMOS 266 o de células B mediada por D1.1, se sabe que este mAb inhibe parcialmente la proliferación de células B dependiente de contacto por las células T activadas fijadas (Tohma, *et al.*, 1991a). Es tentador especular que la interacción dependiente de T-BAM y CD40 que se ha descrito puede inducir interacciones posteriores que dependen de las interacciones LFA1-ICAM, ya que se sabe que la activación desencadenada por anti-CD40 estimula la adhesión T-B que depende de interacciones LFA1-ICAM-1 (Barrett, *et al.*, 1991).

El efecto inhibitorio de los mAb anti-CD40 para la activación desencadenada por D1.1 contrastaba con su efecto potenciador sobre la expresión de CD23 inducida por rIL-4. Estos datos sugieren que la inhibición del efecto de D1.1 por mAb anti-CD40 no era el resultado de una inhibición generalizada de la sensibilidad de las células B. Además, los mAb anti-CD40 G28.5 y B-B20 inducían la expresión de CD23 en RAMOS 266 y en células B linfoides y periféricas cuando se presentaban en forma de entrecruzamiento sobre las superficies de las células L FcRgII⁺. Considerados conjuntamente, estos estudios sugieren que el anti-CD40 polivalente puede imitar el efecto de las células D1.1 y son coherentes con la idea de que el ligando para CD40 puede ser una estructura de superficie de D1.1.

Los efectos inhibitorios del mAb 5c8 y los mAb anti-CD40 en el sistema D1.1 sugieren que T-BAM y CD40 juegan papeles en la señalización dependiente de contacto de células B dirigida por células T, lo cual ocurre en ganglios linfáticos *in vivo*. Para dirigir el papel de T-BAM en las interacciones T-B fisiológicas, se estudió la expresión de T-BAM *in vivo* por inmunohistoquímica. Se encontró que la expresión de T-BAM estaba restringida a linfocitos T CD4⁺ en tejidos linfoides. Estos datos demuestran que *in vivo*, así como *in vitro*, la expresión de T-BAM está restringida a células T CD4⁺ y no se expresa en células T CD8⁺. Considerados en conjunto, estos datos sugieren que las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ representan linajes distintos de células T que difieren no sólo con respecto a su expresión de CD4 y CD8, sino con respecto a al menos otra molécula (T-BAM) y sugieren que la restricción de la expresión de T-BAM a células CD4⁺ es una base molecular para la restricción de la función cooperadora al subtipo CD4⁺.

Aparte de su restricción a células T CD4⁺, T-BAM parece ser única entre las moléculas conocidas de activación de la superficie de células T humanas en que su expresión está restringida a células T en órganos linfoides *in vivo*. En la rata, una proteína de 50 kDa de peso molecular denominada OX-40 se expresa exclusivamente en células T CD4⁺ tras la activación *in vivo*, pero el patrón de expresión de OX-40 en bazo publicado (Paterson, *et al.*, 1987) parece ser distinto de la expresión de T-BAM en el manto y zona centrocítica que nosotros observamos. Sin embargo, el entendimiento de la relación, si la hay, entre estas moléculas requerirá la identificación de homologías relevantes de estas estructuras en ambas especies. Considerados en conjunto, los datos funcionales *in vitro* y el análisis inmunohistoquímico sugieren que las células T CD4⁺ que expresan T-BAM están implicadas en la función cooperadora, lo que, como se sabe, ocurre en los centros germinales de ganglios linfáticos.

Los nuevos datos presentados en este estudio pueden ayudar a esclarecer el papel que juegan las células T en el proceso de diferenciación de células B en folículos linfoides (revisado en (Liu, *et al.*, 1992; Nossal, 1992)). En los folículos linfoides, los linfocitos B estimulados por antígeno sufren una considerable proliferación celular y mutación somática en la zona centroblastica (oscura) de centros germinales. Las células B centroblasticas entran entonces en la zona centrocítica (clara) donde las células B se seleccionan por las células T para sobrevivir o morir (apoptosis) basándose en la afinidad de sus receptores antigénicos. Las células B que se seleccionan positivamente se dirigen a su diferenciación por las células T en células B de memoria o en plasmoblastos formadores de anticuerpo que, en algunos casos, se dirigen además a sufrir reordenamientos génicos para formar los isotipos de Ig funcionalmente distintos. Por lo tanto, aunque las señales que dirigen la diferenciación de células B no se entienden completamente, parece ser que las células T participan en al menos tres decisiones distintas en la diferenciación de células B en ganglios linfáticos: supervivencia o muerte, linaje de memoria o plasmoblasto y la selección del isotipo de anticuerpo.

La observación de que las células T en la zona centrocítica expresan T-BAM sugiere que T-BAM puede jugar un papel en la determinación del destino de las células B con respecto a algunas de estas decisiones. Futuros estudios se dirigirán hacia los papeles específicos que juega T-BAM en estos procesos dependientes de células T en la diferenciación de células B en ganglios linfáticos.

La observación de que los mAb anti-CD40 inhiben una interacción discreta con células D1.1 mediada por el contacto T sugiere que una interacción similar dependiente de CD40 puede sustentar algunos de los efectos publicados de anti-CD40 en respuestas fisiológicas más complejas. Anti-CD40 (G28-5) inhibe potencialmente la muerte celular programada (apoptosis) de células B de centros germinales en cultivo (Liu, *et al.*, 1989). Además, G28.5 inhibe la generación de plasmoblastos y de células B de centro germinal cambiadas *in vitro* por rCD23 soluble e IL-1a (Liu, *et al.*, 1991). Aunque el papel del contacto de células T en estos fenómenos dependientes de CD40 se desconocen actualmente, los datos presentados aquí demuestran que CD40 juega un papel específico en las interacciones de contacto T-B y proporciona una vía para la identificación del ligando de CD40 y para definir con más precisión las funciones de señalización de CD40.

Como estos estudios han identificado papeles importantes para T-BAM en células T y CD40 en células B en la colaboración T-B, es relevante explorar las posibles relaciones entre estas moléculas. Proponemos dos modelos que pueden explicar los datos. La posibilidad de que T-BAM interaccione directamente con CD40 es el modelo más sencillo que explica todos estos datos (fig. 7, modelo N° 1). Sin embargo, en ausencia de datos de unión bioquímica definitivos que demuestren la interacción T-BAM-CD40, es importante apuntar que otra posibilidad es que T-BAM y CD40 interaccionen con ligandos distintos (fig. 7, modelo N° 2). Si T-BAM y CD40 interaccionan con diferentes ligandos, los datos funcionales sugieren que las interacciones CD40-x y T-BAM-y son necesarias pero no suficientes para la inducción de CD23 en las células B.

Aunque los “contrarreceptores” para T-BAM (“x”) y CD40 (“y”) parecen ser moléculas de superficie de células B y T, respectivamente (fig. 7, modelo N° 2.a.), nuestros datos no excluyen la posibilidad de que CD40 sea el receptor de un factor secretado por células B (autocrino) (fig. 7, modelo 2b). Aunque previamente se creía que CD40 era un receptor de citoquina, basándose en su homología estructural con el receptor NGF (Stamenkovic, *et al.*, 1989; Clark, 1990), la posibilidad de que sea un contrarreceptor para una proteína de superficie de células T implicada en la función cooperadora es coherente con el hecho de que el mAb anti-CD40 entrecruzado en las células L FcRgII⁺ mimetice los aspectos de superficie de la activación por células D1.1.

Además de las células B, las células dendríticas foliculares expresan CD40 y hemos descubierto células T que expresan T-BAM en estrecha proximidad y posiblemente asociadas con las células dendríticas foliculares. La interacción célula T-CD40 puede ser importante en la interacción funcional de células T con células dendríticas foliculares que se sabe que juegan un papel en el procesamiento antigénico en ganglios linfáticos (Gray, *et al.*, 1988; Askonas, *et al.*, 1972; Gray, *et al.*, 1991). Además, una interacción de células T CD4⁺ con células dendríticas foliculares CD40⁺ puede tener especial importancia patogénica en el SIDA, donde se sabe que las células dendríticas foliculares son un reservorio del VIH (Spiegel, *et al.*, 1992).

Si el modelo N° 2 es correcto y T-BAM interacciona con un ligando diferente de CD40, entonces T-BAM puede tener papeles de señalización en células que no expresan CD40. A este respecto, las células T CD4⁺ interaccionan con otras células T (CD4⁺ y CD8⁺) para mediar la inducción de citotoxicidad (Bennink, *et al.*, 1978; Ashman, *et al.*, 1979; Kast, *et al.*, 1986; Zinkernagle, *et al.*, 1978; Leist, *et al.*, 1989) y supresión (Thomas, *et al.*, 1980; Thomas, *et al.*, 1982). Además, las células T CD4⁺ interaccionan con macrófagos para mediar señales activadoras (Zimecki, *et al.*, 1988; Zimecki, *et al.*, 1989; Weaver, *et al.*, 1989; Wasik, *et al.*, 1988; Fau, *et al.*, 1990; Fau, *et al.*, 1988). Un objetivo importante para la investigación futura será determinar si T-BAM está implicado en la activación de otras células, o si otras moléculas, posiblemente relacionadas, juegan tales papeles.

Tercera Serie de Experimentos

Estudios preclínicos sobre el anticuerpo monoclonal 5c8; un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra T-BAM

El objetivo global de los estudios es evaluar la utilidad de un nuevo anticuerpo monoclonal (mAb) para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias y neoplásicas. Lo principal de estos estudios es la reciente generación y caracterización de un mAb murino, denominado 5c8, que reconoce una nueva proteína de superficie (T-BAM) de linfocitos T CD4⁺ cooperadores humanos activados.

Lo que es más importante, el mAb 5c8 bloquea las funciones efectoras de las células T CD4⁺ incluyendo el proceso por medio del cual dirigen la producción de anticuerpos monoclonales específicos por las células B. En tejidos humanos sanos, T-BAM se expresa exclusivamente en células T CD4⁺ en tránsito, en estructuras inducidas por antígeno en órganos linfoides denominadas centros germinales. Sin embargo, ciertos estudios preliminares en tejidos de varias enfermedades inflamatorias han revelado que T-BAM se expresa por los linfocitos T CD4⁺ infiltrados en los tejidos enfermos. Hasta la fecha, se ha observado infiltración de células T CD4⁺ que expresan T-BAM en tejidos de articulaciones afectadas por artritis reumatoide y osteoartritis y en la piel afectada por psoriasis, dermatitis de contacto y un síndrome de hiper IgE. Como T-BAM parece jugar un papel clave *in vitro* en las funciones efectoras de las células T CD4⁺, la presencia de células T CD4⁺ que expresan T-BAM en sitios de inflamación *in vivo* sugiere que T-BAM

puede participar en la patogénesis inmune de estas enfermedades. La disponibilidad del mAb 5c8 anti-T-BAM, nos proporciona la oportunidad de preguntarnos si las células T CD4⁺ que llevan T-BAM, o la propia molécula de T-BAM, tienen funciones críticas en estos procesos. Si se descubre que las células T CD4⁺ T-BAM⁺ tienen una función crítica en ciertas enfermedades, podría ser posible dirigirse de forma específica hacia las células T CD4⁺ ofensoras y patogénicas usando el mAb 5c8 para lisar o envenenar a las células T CD4⁺ T-BAM⁺ o para bloquear sus funciones. Además, se observó una expresión aberrante de la molécula de T-BAM en numerosas malignidades linfoides, lo que sugiere que el mAb 5c8 puede tener aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de tumores linfoides. Consideradas en conjunto, estas observaciones sugieren la utilidad del mAb 5c8 en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias y de neoplasias linfoides.

Serán investigadas o evaluadas las siguientes áreas:

1. La expresión de T-BAM en tejidos de pacientes afectados por enfermedades inflamatorias, autoinmunes, alérgicas y neoplásicas y se determinará si la expresión de T-BAM se correlaciona con la extensión de la enfermedad.

2. Los efectos del mAb 5c8 en sistemas *in vitro* de función de linfocitos usando células de individuos con enfermedades inflamatorias, autoinmunes o alérgicas.

3. El efecto del mAb 5c8 sobre la función de los linfocitos T de primates no humanos (monos rhesus) para llevar a cabo finalmente estudios de seguridad y farmacocinéticos en dichos animales.

4. El potencial de uso del mAb 5c8 como una modalidad diagnóstica en la evaluación clínica de enfermedades inflamatorias y leucemia/linfoma.

Fundamento

Los linfocitos T CD4⁺ juegan un papel central en la respuesta inflamatoria, ya que se requiere la activación de las células T CD4⁺ para la generación de respuestas inmunes tanto humorales (mediadas por anticuerpos) como de las respuestas citotóxicas (destructoras) de las células T CD8⁺. En correspondencia con este papel central, las células T CD4⁺ son las células que primero se infiltran en los tejidos durante la respuesta inflamatoria en respuestas inmunes normales y en varias enfermedades inflamatorias idiopáticas.

Además, para dirigir la respuesta inflamatoria en los tejidos, las células T CD4⁺ juegan un papel crítico (denominado "función cooperadora") dirigiendo la especificidad y las funciones efectoras (isotipos) de la respuesta inmune mediada humoral (anticuerpo). La función cooperadora está mediada por células T CD4⁺ que migran a los órganos linfoides y siembran estructuras transitorias denominadas centros germinales que están pobladas por células B específicas de antígeno (afines). En la artritis reumatoide y en ciertas enfermedades autoinmunes distintas (lupus sistémico) caracterizadas por la producción de autoanticuerpos, las células T CD4⁺ juegan papeles patogénicos en la generación de autoanticuerpos. En la alergia, las células T CD4⁺ tienen un papel crítico en la elaboración de anticuerpos IgE y, por lo tanto, en el mantenimiento del estado alérgico.

Las células T CD4⁺ tienen receptores para antígenos distribuidos de forma clonal que reconocen antígenos peptídicos degradados extraños presentados a ellos por células B y macrófagos en las propias moléculas de MHC de clase II. Un clon de célula T CD4⁺ que reconoce su antígeno específico/ligando de MHC de clase II responde a dicho reconocimiento llevando a cabo una transformación denominada "activación" que incluye la expresión de novo de varias moléculas de superficie y la secreción de linfoquinas.

Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal, denominado mAb 5c8, que identifica una estructura nueva de 30 kDa (denominada Ag 5c8 o T-BAM) que se expresa exclusivamente en células T CD4⁺ activadas pero no en reposo ni en células T CD8⁺ (Yellin, *et al.*, 1991; Lederman, *et al.*, 1991). De forma importante, por la naturaleza de su interacción con T-BAM, el mAb 5c8 bloquea la capacidad de las células T CD4⁺ para dirigir la producción de anticuerpos por las células B (Lederman, *et al.*, 1992). Por lo tanto, investigamos la expresión de T-BAM *in vivo* y descubrimos que en tejidos humanos normales, T-BAM se expresa exclusivamente en células T CD4⁺ predominantemente en el manto y en la zona centrocítica de los ganglios linfáticos *in vivo*, que son los sitios anatómicos de interacciones fisiológicas de las células T con las células B (Lederman, *et al.*, 1992b). El descubrimiento de que el Ag 5c8 es un componente de las estructuras de la superficie de las células T CD4⁺ que media la activación dependiente de contacto de los linfocitos B nos llevo a renombrar al Ag 5c8 como "molécula de célula T activadora de célula B" (T-BAM). El hecho de que T-BAM se exprese sólo en células T CD4⁺ que se han activado sugería que el mAb 5c8 podía ser específico de células T CD4⁺ implicadas en respuesta inflamatorias.

Por lo tanto, en estudios preliminares se examinó la expresión del Ag 5c8 en tejidos inflamados de pacientes con enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En la artritis reumatoide, se localizaron células T CD4⁺ que expresaban T-BAM en el pannus sinovial de la articulación reumatoide, tanto en los centros germinales que caracterizan esta afección como en el tejido inflamatorio circundante. En casos de osteoartritis inflamatoria, se descubrió que las células que expresaban T-BAM eran un componente significativo de las células inflamatorias infiltradas. En la psoriasis, dermatitis atópica y síndrome de hiper IgE, las células T que expresaban T-BAM destacaban entre los linfocitos infiltrados en la dermis. En contraste con estas muestras de individuos con enfermedades inflamatorias, las células que expresaban T-BAM no estaban presentes en tejidos normales fuera de los folículos linfoides primarios.

El hallazgo de que las células que expresan T-BAM se infiltran en tejidos enfermos y están presentes en estructuras anatómicas transitorias y en regeneración en tejidos normales sugiere que la terapia con mAb 5c8 puede ser terapéuticamente útil porque 1.) el mAb 5c8 puede dirigirse hacia linfocitos T patogénicos mientras que no afecta a las células T circulantes en reposo, y 2.) la depleción de las células T que portan 5c8 puede no dar como resultado la depleción prolongada y sistémica de las células T que expresan T-BAM, ya que el grupo de células T activadas puede rellenarse a partir del grupo en reposo circulante. La posibilidad de que la terapia con mAb 5c8 pueda eliminar o inmovilizar a las células T CD4⁺ patogénicas y dar como resultado un episodio transitorio de compromiso inmune (por la depleción de las células T del centro germinal) sugiere que dicha terapia puede tener efectos beneficiosos significativos sobre las terapias inmunosupresoras existentes cuyo uso está muy extendido o en desarrollo.

Los agentes inmunosupresores que se usan actualmente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias idiopáticas y trastornos alérgicos tienen su principal efecto terapéutico en la inhibición de la función de las células T CD4⁺. Sin embargo, estas terapias existentes, tales como la ciclosporina A (Sandimmune), azatioprina (Immunan) y ciclofosfamida (Citoxan), inhiben globalmente las funciones de las células T CD4⁺ y dan como resultado una inmunosupresión sistémica. Por lo tanto, debido a las limitaciones de dichos agentes, el objetivo de muchos laboratorios, incluyendo el nuestro, es desarrollar agentes que afecten específicamente a las células T CD4⁺. Por ejemplo, actualmente se están desarrollando ensayos clínicos en Europa y en los Estados Unidos usando anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra la molécula CD4, que median en la depleción sistémica de las células T CD4⁺. En la mayoría de los casos, la depleción de células T CD4⁺ es transitoria, sin embargo, un efecto colateral preocupante que se ha observado es que la depleción de células T CD4⁺ tras la terapia se prolonga durante varios meses. Aunque no se han observado efectos clínicos derivados de dicha depleción de células CD4⁺, es sabido que la ausencia de células T CD4⁺ es el principal evento patofisiológico en el SIDA. Tomadas en conjunto, estas consideraciones sugieren que el mAb 5c8 anti T-BAM puede tener ventajas terapéuticas significativas en enfermedades mediadas por la infiltración de células T CD4⁺ con respecto a los agentes que inhiben la activación de todos los linfocitos (por ejemplo, fármacos inmunosupresores) o mAb que se dirigen a todas las células T CD4⁺ (por ejemplo, mAb anti-CD4) o células T activadas (por ejemplo, activación de moléculas como IL-2R).

En contraste con dicha inmunosupresión sistémica, se está haciendo un gran esfuerzo dirigido al desarrollo de terapias inmunológicas específicas para enfermedades específicas en individuos con antecedentes étnicos específicos. Se sabe que ciertos haplotipos específicos de MHC de clase II confieren susceptibilidades genéticas para la artritis reumatoide y para la diabetes mellitus dependiente de insulina. Estos hallazgos han llevado a muchos investigadores a seguir estrategias de diagnóstico y terapia para estas enfermedades estudiando las moléculas de MHC de clase II y/o antígenos peptídicos implicados. Incluso en estas condiciones relativamente homogéneas, puede ser necesario en último extremo idear terapias únicas para pacientes individuales. Además, en contraste con enfermedades que pueden deberse a interacciones comunes célula T CD4⁺-MHC de clase II/antígeno, varias enfermedades inflamatorias idiopáticas importantes tales como la psoriasis, lupus sistémico y osteoartritis inflamatoria tienen asociaciones menos claras con los haplotipos de MHC de clase II, aunque comparten con la RA y la diabetes la característica patogénica clave de infiltración temprana de células T CD4⁺. La ventaja de seguir estrategias terapéuticas que se dirigen hacia las células T CD4⁺, tales como la terapia anti-T-BAM, se debe principalmente al hecho de que podría no ser necesario identificar las moléculas de MHC o los antígenos relevantes para modular la respuesta inflamatoria. De hecho, estrategias tales como la terapia del mAb 5c8, que se dirige exclusivamente contra las células T CD4⁺ activadas en tejidos enfermos, puede aprovechar las funciones cognitivas del sistema inmune de cada individuo para seleccionar las células para su eliminación o modulación funcional. Para examinar estas cuestiones, proponemos los siguientes estudios.

Métodos: Los objetivos de la investigación propuesta se basan en gran medida en la capacidad de los investigadores para obtener muestras clínicas a partir de pacientes con una amplia diversidad de enfermedades inmunológicas realizando cirugía o biopsias. Los P.I. están en una posición ideal para obtener dichas muestras, de hecho, nuestros estudios preliminares demostraron esta capacidad. Los P.I. son miembros de la división de Reumatología en el Departamento de Medicina y junto con los investigadores atienden activamente a pacientes con enfermedades autoinmunes en la Edward Daniels Arthritis Clinic del Hospital Presbiteriano. Además, tenemos en curso colaboraciones con varios miembros del Departamento de Cirugía Ortopédica que nos proporcionan muestras de articulaciones. Por lo tanto, los P.I. están en buena posición para obtener muestras clínicas relevantes para seguir la evaluación del mAb 5c8 en las funciones *in vitro* de los linfocitos de sangre periférica y en tejidos de las articulaciones de individuos con enfermedades autoinmunes y osteoartritis. Además, la Dra. Alessandra Pernis es un miembro de nuestro grupo de investigación y además es un miembro clínico en activo de la División de Alergia e Inmunología. La Dra. Pernis nos ayudará en la identificación y el acceso a las muestras clínicas de individuos que sufran trastornos alérgicos. Además, somos investigadores del Protocolo Aprobado por el Consejo de Revisión Institucional del Dr. Leonard Chess "estudios inmunológicos en seres humanos", lo cual nos permite obtener linfocitos a partir de dichos individuos. Además de nuestros estudios sobre enfermedades artríticas, en asociación con la Dra. Janet Prystowsky del Departamento de Dermatología, recientemente hemos obtenido la aprobación de un protocolo para el estudio de la psoriasis: "análisis de los linfocitos T cutáneos en psoriasis y otras enfermedades dermatológicas".

1. Caracterización de la expresión de T-BAM en tejidos enfermos

Para un análisis adicional del papel de T-BAM en afecciones inflamatorias, autoinmunes y alérgicas, se extenderán los análisis de inmunohistoquímica de los tejidos enfermos a estudios de la localización de T-BAM en muestras de tejido congelado rápidamente en casos adicionales de artritis reumatoide, osteoartritis y psoriasis en varias fases

de actividad y progresión de la enfermedad. Además, estos análisis se extenderán a casos de lupus sistémico, asma alérgica, páncreas diabético, enfermedad inflamatoria del intestino y trasplante de órganos. Estos análisis pretenderán correlacionar patrones de expresión de estructuras particulares de superficie, como T-BAM, CD4 y otras diversas moléculas de la superficie de los linfocitos con enfermedades y con la actividad de la enfermedad.

2. *Evaluación de los efectos del mAb 5c8 sobre sistemas in vitro de función de linfocitos usando células de individuos con trastornos inflamatorios, autoinmunes y alérgicos*

Actualmente no está claro si las células T CD4⁺ T-BAM⁺ infiltradas en los tejidos de pacientes con enfermedades inflamatorias juegan en papel en la mediación de los sucesos fisiopatológicos clave en estas enfermedades. Ciertas enfermedades tienen una actividad inmunológica patológica que puede estudiarse *in vitro*. Por lo tanto, se aislarán linfocitos de sangre periférica y de tejidos inflamados de individuos con artritis reumatoide, lupus sistémico y estados alérgicos, tales como asma alérgico. Los estudios *in vitro* estarán dirigidos a saber si el mAb 5c8 inhibe el factor reumatoide (IgM anti-IgG) en la artritis reumatoide, la producción de anticuerpos anti-ADN en el lupus sistémico o la producción de IgE en la alergia. En estos estudios se aislarán células T y B de sangre periférica o de tejidos afectados, se cocultivarán en presencia de factores de crecimiento y en presencia del mAb 5c8 o de mAb de control y se medirá por ELISA específicos la producción de autoanticuerpos o de IgE.

3. *Evaluación del efecto del mAb 5c8 sobre la función de linfocitos T de primates no humanos (monos rhesus) para finalmente llevar a cabo en dichos animales estudios de seguridad y farmacocinéticos*

Se estudió la interacción del mAb 5c8 con linfocitos del mono rhesus (con el protocolo del Dr. Michael Ferin del Departamento de Biología Reproductiva y OB/GYN) y se descubrió que el mAb 5c8 reacciona con el homólogo de T-BAM en el mono rhesus. Otros estudios futuros permitirán ver si el mAb 5c8 bloquea las funciones de las células T CD4⁺ de los macacos para determinar si rhesus es un modelo animal adecuado para estudios finales de administración *in vivo* del mAb 5c8 (lo que está fuera de la presente propuesta). Los estudios funcionales de los linfocitos de rhesus y el efecto de mAb 5c8 en estas funciones serán casi paralelos a los estudios funcionales que ya hemos llevado a cabo en subpoblaciones de linfocitos humanos.

4. *Evaluación del uso potencial del mAb 5c8 como una modalidad de diagnóstico en la evaluación clínica de leucemia/linfoma*

En colaboración con el Dr. Giorgio Inghiram y el Dr. Daniel Knowles, del Departamento de Patología, se estudió la expresión de T-BAM en más de 100 casos de leucemia/linfoma. Aproximadamente un 30% de los linfomas de células T expresan T-BAM en secciones congeladas de ganglios linfáticos. Actualmente se desconoce si las células T leucémicas en sangre periférica expresan T-BAM en dichos casos. Por lo tanto, estudiaremos la sangre periférica de casos de leucemia para determinar si se presenta expresión de T-BAM y qué relación tiene la expresión periférica de T-BAM con la expresión de T-BAM en ganglios linfáticos. Estos estudios pueden revelar si el mAb 5c8 es un anticuerpo útil para diagnosticar la evaluación de individuos con leucemia. Además, estos estudios pueden justificar ensayos terapéuticos con el mAb 5c8 para el tratamiento de dichas neoplasias.

Futuras extensiones

Los estudios futuros dependerán de los resultados de la investigación preclínica preliminar propuesta. Los resultados de los estudios de inmunohistoquímica enfocarán nuestra atención hacia un cierto grupo de enfermedades. Los estudios *in vitro* podrán justificar estudios clínicos en ciertos subgrupos de dichas enfermedades. En el caso de que los estudios preliminares justifiquen los ensayos clínicos, llevaremos a cabo estudios animales en primates no humanos, ya que es sabido que el mAb 5c8 reacciona con el homólogo de T-BAM en células T activadas del mono rhesus (véase anteriormente). Los estudios animales se diseñarán para determinar los perfiles de toxicidad y farmacocinéticos del mAb 5c8, así como para ensayar la hipótesis de que la depleción de las células que expresan T-BAM será transitoria y que dichas células que expresan T-BAM serán reemplazadas por células T en reposo del grupo circulante. Esta cuestión se ensayará específicamente estudiando biopsias de ganglios linfáticos de animales normales por inmunohistoquímica antes y después del tratamiento con el mAb 5c8. Finalmente, se ensayará el papel de 5c8 en la inhibición de las respuestas inmunes *in vivo* inmunizando a animales en presencia y ausencia de tratamiento con 5c8 y evaluando las respuestas de anticuerpo y del ensayo cutáneo de los animales de estudio. Para realizar dichos experimentos, necesitaremos la aprobación del IRB para estos estudios, ya que no se abordan en nuestros protocolos actuales. Sin embargo, para obtener dicha aprobación será importante obtener el 5c8 en una forma conveniente para dichos estudios y los gastos para obtener dicho reactivo es parte del presupuesto actual propuesto.

Estos estudios pueden indicar que la forma actual del mAb 5c8 (IgG2a murino que fija el complemento humano) no es la óptima para obtener la modulación específica deseada de la función de las células T CD4⁺. En este caso, puede ser necesario modificar genéticamente el mAb 5c8 para alterar la región Fc del anticuerpo que determina su función de unión complementaria y/o el tejido al que se dirige. Esto puede hacerse cambiando la región Fc del anticuerpo por una región Fc humana o alterando el sitio de unión del anticuerpo para que se asemeje más a los anticuerpos humanos; un proceso denominado "humanización" que es una tecnología de la cual el investigador principal tiene una experiencia significativa, habiendo alterado radicalmente anticuerpos humanos para que contuvieran la secuencia de aminoácidos de la molécula de CD4 (no publicado). Además de alterar las propiedades funcionales del anticuerpo para que contenga funciones efectoras diferentes de anticuerpos normales, puede ser deseable fijar genéticamente una

toxina a la región Fc del mAb 5c8, lo cual es una estrategia relativamente común utilizada por varias compañías con las que estamos negociando actualmente.

5 Cuarta Serie de Experimentos

Aislamiento de un ADNc que Codifica T-BAM, una Glicoproteína de la Superficie de las Células T CD4⁺ que Media la Función Cooperadora dependiente de Contacto con las Células B: un Nuevo Miembro de la Superfamilia de Genes del TNF α

T-BAM es una proteína de superficie inducida por la activación de las células T CD4⁺ que media una señal dependiente de contacto para la diferenciación de células B y la secreción de IgG. T-BAM se identificó por el mAb 5c8, que se une a T-BAM en un subclón de Jurkat D1.1 funcionalmente único que expresa constitutivamente T-BAM de superficie. En esta serie de experimentos, se define la estructura de T-BAM. La proteína T-BAM se purificó a partir del lisado celular de D1.1. por cromatografía de afinidad usando el mAb 5c8. La secuencia de aminoácidos NH₂-terminal de la proteína T-BAM aislada se determinó por microsecuenciación automática y esta secuencia se usó para diseñar una sonda oligonucleotídica degenerada (T-BAM.2). En la orientación antisentido, la sonda oligonucleotídica reconocía una especie de ARNm de 2 kB aislada a partir de células D1.1 que expresaban T-BAM, pero no el ARNm aislado de células Jurkat no cooperadores B2.7 de control que no expresaban T-BAM. Se descubrió que la secuencia NH₂-terminal estaba relacionada con la de CD40-L, una molécula de superficie de células T murinas de tipo II de función relacionada. La PCR-ARN del ARNm de D1.1. amplificó un fragmento de ADN homólogo en tamaño y secuencia a la región correspondiente de CD40-L murino, una región que codifica las porciones citoplásmica y proximal de membrana de la molécula. Este fragmento, que es de aproximadamente 330 pb, se subclonó y se usó como sonda para una biblioteca de ADNc de D1.1. en λ gt-11. Se obtuvieron nueve clones que contenían insertos de 1,8 a 2,2 kB.

El análisis de la secuencia del clon puso de manifiesto una glicoproteína de superficie de membrana de tipo II con homología con el CD40-L murino, una molécula de las células T murinas activadas que dirige la secreción de IgE. Ambas proteínas son miembros de la superfamilia del TNF α , que incluye citoquinas y moléculas efectoras de la superficie celular con una amplia diversidad de funciones inmunológicas y de otro tipo. Además de T-BAM y CD40-L, el análisis de Southern del ADN humano usando una sonda T-BAM sugirió la existencia de al menos otra molécula relacionada. Aunque son funcionalmente distintas, cabe la posibilidad de que CD40-L y T-BAM puedan ser homólogas, en cuyo caso existen dos nuevas moléculas relacionadas con T-BAM.

Introducción

Se han realizado progresos en el esclarecimiento de las señales dependientes de contacto por la reciente identificación de un subclón único funcional de la línea de leucemia de células T Jurkat, D1.1, que activa de forma constitutiva las células B periféricas en reposo (Yellin, *et al.*, 1991). Previamente se ha demostrado que el clon D1.1 induce la expresión en la superficie de células B en reposo de moléculas CD23, lo que conduce a la proliferación de células B, e induce la diferenciación de células B en células formadoras de Ab (Yellin, *et al.*, 1991). La capacidad de activación de células B de D1.1 se localizó en la superficie celular, porque las células D1.1 fijadas con paraformaldehído retenían la capacidad de activar las células B, pero los sobrenadantes de D1.1 eran inactivos (Yellin, *et al.*, 1991). En conjunto, estos datos sugerían que D1.1 compartía estructuras superficiales con células T activadas que mediaban la función cooperadora dependiente de contacto.

En una serie de experimentos previos, se identificó una estructura denominada T-BAM (Ag 5c8) por selección de hibridomas para mAb, que reacciona específicamente con D1.1 y que inhibe la activación funcional de las células B por D1.1 (Lederman, *et al.*, 1992). El mAb 5c8 identificó una estructura nueva de 30 kDa que se expresaba en células T CD4⁺ activadas pero no en células T CD8⁺, células B o monocitos (Lederman, *et al.* 1992). La cinética de expresión de T-BAM en la superficie celular tras estimulación con PHA y PMA es relativamente única, ya que la expresión máxima se produce después de 6 h, pero va seguida de una regulación negativa que tiene como resultado una expresión basal (no expresión) a las 24 h (Lederman *et al.*, 1992). En ensayos funcionales, el mAb 5c8 anti T-BAM inhibe la capacidad de células T CD4⁺ normales para dirigir la diferenciación de las células B en células formadoras de anticuerpos (Lederman, *et al.*, 1992). Además, la célula T de linfoma que expresa T-BAM, Jurkat D1.1, activa a las células B de órganos linfoides, así como al clon de linfoma de célula B RAMOS 266 (Siegel, *et al.*, 1990) de manera que se inhibe por el anti-T-BAM (mAb 5c8) y es similar al efecto que nosotros hemos descrito previamente para células B periféricas. *In vivo*, T-BAM se expresa predominantemente en células T de las zonas de manto y centrocítica de los ganglios linfáticos, que son los sitios anatómicos para las interacciones de las células T con células B (Lederman, *et al.*, 1992). Considerados en conjunto, estos datos demuestran que T-BAM es un componente de las estructuras de superficie de las células T CD4⁺ que median la función cooperadora dependiente de contacto.

Se descubrió que el efecto específico de T-BAM en las células B se bloqueaba por mAb contra CD40 y no se pensó que otras moléculas de la célula B jugaran papeles en la recepción de señales dependientes de contacto en los tejidos linfoides. La molécula de CD40 en la superficie de las células B humanas tiene funciones de señalización interesantes y relevantes para la diferenciación de las células B de los ganglios linfáticos (Clark, *et al.*, 1986; Clark, *et al.*, 1988; Ledbetter, *et al.*, 1986), ya que un anticuerpo anti-CD40 (mAb G28-5 (Clark, *et al.*, 1986)) previene la muerte programada (apoptosis) de las células B del centro germinal (Liu, *et al.*, 1989) y se ha demostrado que induce la proliferación, diferenciación y crecimiento a largo plazo de células B humanas (Banchereau, *et al.*, 1991a;

Banchereau, *et al.*, 1991b). El efecto de mAb anti-CD40 sobre la colaboración específica de T-BAM no dio como resultado una inhibición general de la capacidad de respuesta de la célula B, ya que se descubrió que el efecto de anti-CD40 en la expresión de CD23 es aditivo con dosis submáximas de rIL-4. Además, parecía que los mAb contra CD40 mimetizaban el efecto de D1.1 cuando se presentaban sobre receptores Fc en una capa de fibroblastos murinos transfectados. Considerados en conjunto, estos hallazgos eran coherentes con la idea de que T-BAM y CD40 pueden interactuar entre sí, posiblemente en una relación receptor-contrareceptor.

Posteriormente se ha identificado un ligando murino para la molécula CD40 por clonación y expresión de una biblioteca de ADNc murino usando una molécula quimérica de CD40 humana- cadena de Ig. El ADNc del CD40-L codifica una proteína de la superficie de la membrana de tipo II de 33 kDa (Armitage, *et al.*, 1992). Aunque inicialmente se presentó como un nuevo gen, los análisis posteriores de nuestro laboratorio (sin publicar) y de los autores revelaron que CD40-L está relacionado con TNF α (Farrah, *et al.*, 1992). La idea de que CD40-L es homólogo a TNF α es interesante, dado que sus receptores, TNF α RI y II, están relacionados con CD40. La interacción de unión de CD40-L con CD40, junto con la evidencia funcional que relaciona T-BAM con señalización específica de CD40, sugiere que T-BAM y CD40-L pueden ser moléculas relacionadas. Adicionalmente, se sugiere la relación de CD40 y T-BAM por sus funciones relacionadas en la activación de las células B y por sus pesos moleculares aparentes similares. Sin embargo, sigue sin conocerse la relación precisa entre CD40-L y T-BAM.

Por lo tanto, en esta serie de experimentos se examinó la estructura de T-BAM y se aislaron un fragmento de PCR y un ADNc parcial y se descubrió que codificaba una proteína de la superficie de la membrana de tipo II con homología significativa con CD40-L (Armitage *et al.*, 1992). Aun así, la evidencia funcional sugiere que T-BAM y CD40-L son distintas. Sigue existiendo la posibilidad de que T-BAM sea el homólogo humano de CD40-L. Además de T-BAM y CD40-L, el análisis de transferencia de Southern del ADN genómico humano usando una sonda para T-BAM sugiere la existencia de otro miembro relacionado de esta familia. En el caso de que se descubra que T-BAM y CD40-L son homólogos, los datos de Southern sugieren que pueden existir otros dos miembros de dicha familia. La información estructural aclara varios aspectos moleculares de la función de las células T cooperadoras y sugiere que al menos dos moléculas de las células T dirigen diferentes respuestas de las células B en interacciones que implican la vía de señalización de la molécula de CD40.

30 *Materiales y Métodos*

Líneas celulares: Los clones de Jurkat D 1.1 y B 2.7 se han descrito (Yellin, *et al.*; Lederman, *et al.* 1992).

35 *Aislamiento del péptido T-BAM*

Para obtener la proteína T-BAM purificada, se cultivaron células Jurkat D1.1 en Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (Gibco) en suero bovino fetal (Hyclone) al 10% en una "factoría celular" (NUNC) y en 10 matraces (matraces de 600 ml). Se recogieron 14×10^6 células de estos cultivos mezclados. Los sedimentos celulares se lisaron en 125 ml de tampón de lisis enfriado con hielo (1% de NP40, Tris 15 mM, NaCl 15 mM, fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) a 10 μ g/ml, EDTA 5 mM, yodoacetamida (IAA) a 10 μ g/ml). Los lisados se agitaron vorticialmente y se mezclaron durante 1 hora en un agitador rotatorio antes de la centrifugación a 7000 rpm durante 20 minutos para sedimentar el material insoluble. Después se filtró el sobrenadante del lisado secuencialmente a través de filtros de 0,45 y 0,2 μ m (Nalgene). El lisado filtrado (80 ml) se diluyó 1:1 con tampón bicarbonato 0,1 M (NaCl 0,5 M, pH 8,3) antes de la cromatografía de afinidad.

45 *Purificación de T-BAM por cromatografía de afinidad*

Los mAbs 5c8 y OKT4 se purificaron en columnas de proteína G (Pharmacia). Los mAbs purificados se unieron covalentemente a perlas de sepharose 4B activadas con CNBr (Pharmacia, Uppsala, Suecia) incubando el mAb (3,88 mg/2 ml de 5c8 y 3,0 mg/1,5 ml de OKT4) en tampón de unión (tampón bicarbonato 0,25 M, NaCl 0,5 M, pH 8,75) con 0,142 gramos de perlas para cada mAb. Las soluciones de mAb se hicieron reaccionar con las perlas durante 3 horas a temperatura ambiente y se inactivaron en Tris 0,2 M, pH 8,0 durante 3 h. Las perlas cubiertas de mAb se usaron para obtener un gel de 0,5 ml en columnas cortas (Schleicher y Schuell) y se lavaron alternativamente con tampón de unión bicarbonato y con tampón de elución (tampón acetato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0)

Para purificar T-BAM, los lisados de D1.1 se preaclaron pasándolos a través de la columna de OKT4 antes de su paso a través de la columna de 5c8. Después de que el lisado hubo pasado a través de las dos columnas, la columna de mAb 5c8 se lavó con 200 ml de tampón bicarbonato antes de la elución con acetato 0,1 M, pH 4,0 en fracciones de 0,5 ml en tubos de polipropileno cónicos de 15 ml (Sarstadt, Princeton, NJ). La proteína de cada fracción se precipitó con aproximadamente 5 ml de acetona a -20°C durante toda la noche. El precipitado después se recogió por centrifugación a 3000 g y se secó al aire.

Secuenciación del NH₂-terminal del péptido T-BAM

Los precipitados de acetona de cada fracción de la columna se resuspendieron en 60 ml de tampón de carga en el gel (instrucciones de Bio-Rad), se cargaron en un gel de 20 cm de PAGE-SDS al 12,5% en un aparato de electroforesis vertical de BioRad y se sometieron a 100 V durante aproximadamente 6 h y, después, se transfirieron a un papel de PVDF Problott™ (Advanced Biosystems, Seattle WA) en tampón CAPS durante 90 minutos a 70 voltios en un aparato

de Biorad Trans Blot. La transferencia se optimizó usando los patrones de proteínas premarcados (patrón de bajo peso molecular y de alto peso molecular (Biorad, Rockville Center, NY)).

Después de la transferencia, las bandas de proteínas se tiñeron con azul de comassie R-450 y la membrana se secó al aire. Se cortó con una cuchilla de afeitar una banda de 31 kD (p31K), correspondiente con la migración relativa de T-BAM, y se sometió a 20 ciclos de secuenciación en un secuenciador de fase gaseosa Applied Biosystems 470A/analizador PTH 120A de la Dra. Mary-Ann Gavinovitch, del Protein Core Facility, Howard Hughes Medical Institute, Columbia University (Secuencia n°. S01220, 28/4/92). La secuencia NH₂-terminal determinada fue (M)IE (T)YNQ(Q)SP(PXAAS) (SEC ID N°. 11).

Construcción y selección de una biblioteca de ADNc

Se aisló el ARN poli A⁺ de D1.1 por FAST-TRACK (Invitrogen) y se generó una biblioteca de λ -gt11 usando un oligo-dT como cebador, que contenía aproximadamente 4 x 10⁶ clones independientes, usando los brazos de λ de Stratagene (San Diego, CA) por el protocolo de Pharmacia.

A partir de una biblioteca amplificada se seleccionaron aproximadamente 1 x 10⁶ placas, se identificaron 8 clones independientes y cada placa se purificó por 4 subclonaciones en YT1090 (Invitrogen, San Diego, CA).

Síntesis de oligos

Los oligodexosinucleótidos siguientes se sintetizaron en un sintetizador de ADN de Applied Biosystems, modelo 380B por la Protein Chemistry Core Facility, Howard Hughes Medical Institute/Columbia University.

TBAM.1 (17mero) 5'-AT(A/C/T) GA(A/G) AC(A/G/C/T) TA(C/T) AA(C/T) CA-3' (SEC ID N°. 1)

TBAM.2 (20mero) 5'-ATG AT(A/C/T) GA(A/G) AC(A/G/C/T) TA(C/T) AA(C/T) CA-3' (SEC ID N°. 2)

TBAM.2 antisentido (20mero) 5'-TG(G/A) TT(G/A) TAI GT(C/T) TC(T/G/A) ATC AT-3' (SEC ID N°. 3)

CD40L(11-31) 5'-GCA TGA TAG AAA CAT ACA GCC AAC-3' (SEC ID N°. 4)

CD40L(54-75) 5'-AAC TGG ACT TCC AGC GAG CAT G-3' (SEC ID N°. 5)

CD40L(369-348) 5'-GGA TCC TCA TCA CCT CTT TGC-3' (SEC ID N°. 6)

CD40L(389-368) 5'-ACA ACG TGT GCT GCA ATT TGA GG-3' (SEC ID N°. 7)

λ gt11-rev (24mero) 5'-TGA CAC CAG ACC AAC TGG TAA TGG-3' (SEC ID N°. 8)

Mu12/T-BAM.2 5'-CTT TCA GTC AGC .T-BAM-3' (SEC ID N°. 12)

Reacción en Cadena de la ARN Polimerasa

Se aisló ARN poli A⁺ a partir de 5 x 10⁸ células D1.1 y el ADNc se preparó por transcripción inversa de aproximadamente 1,0 µg de ARN total usando 200 unidades de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de moloney (MMLV) (Bethesda Research Labs (BRL®), Bethesda, MD) durante 30 min a 42°C en una reacción que contenía 5 pM del cebador de CD40L (369-348) en 20 ml de un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM y 20 unidades de ARNsin (Pharmacia®). La reacción se calentó a 95°C durante 5 min para inactivar la enzima. La primera cadena se amplificó por PCR en las siguientes condiciones: la fase inicial de desnaturalización del molde (8 min a 94°C) seguida de 30 ciclos repetidos de 2 min a 55°C (hibridación), 2 min a 72°C (desnaturalización) usando 2,5 unidades de ADN polimerasa de Taq (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT), dATP, dCTP, TTP y dGTP, a 200 mM cada uno (Perkin-Elmer Cetus) y 5,0 pM de los cebadores de CD40L (11-31) y CD40L (369-348) en un volumen final de 100 µl de tampón de PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina al 0,001%). Después de la amplificación, las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,0% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Subclonación

Se generó BluescriptTM/p3.1 por unión de extremos romos de productos de PCR en BluescriptTM (Promega) digerido con *Eco*R5. BluescriptTM/p5-1 se generó por unión durante una noche de los productos de digestión de *Eco*R1 de maxipreps del ADN del fago λ gt-11 en BluescriptTM 11 SK⁺ (Promega) digerido con *Eco*R1, que previamente se había tratado con fosfatasa de intestino de ternero. Las uniones en BluescriptTM se llevaron a cabo con la ADN ligasa de T4 en *E. coli* competente y se cultivaron en placas con ampicilina (25 µg/ml).

Selección de las bibliotecas de λ gt-11

Las sondas generadas por PCR se marcaron radiactivamente por el método de hexámero aleatorio y se usaron para la selección de las placas de λ gt-11.

Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en un secuenciador automático de ADN de Applied Biosystems, en el Comprehensive Cancer Center Core Facility, Columbia University.

Transfección de células 293

2 x 10⁶ células 293 se dispondrán en placas Petri de 100 mm durante 48 horas antes de la transfección. Las células se alimentarán con medio fresco 1 h antes de la transfección. Se prepararán precipitados de fosfato cálcico usando 20 mg de ADN plasmídico por placa. Después de 15 h a 37°C en CO₂ al 5%, las células se alimentarán con medio fresco. Treinta y seis horas después de la transfección, las células se recogerán por tratamiento con tripsina-EDTA (Gibco, Grand Island, NY) durante 30 seg y se examinarán por FACS.

Anticuerpos monoclonales. El mAb 5c8 (IgG2a) se ha descrito (Lederman, *et al.* 1992). El mAb 5c8 se ha descrito. El mAb OKT4 (anti-CD4) está disponible en la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Todos los mAb se purificaron a partir de líquido ascítico por columnas de proteína A (Biorad, Rockville Center, NY) o de proteína G (Pharmacia, Upsala, Suecia).

Resultados

T-BAM es una proteína de superficie inducida por activación en las células T CD4⁺ que media una señal dependiente de contacto para la diferenciación de células B y la secreción de IgG. T-BAM se identificó por el mAb 5c8 que se une a T-BAM en un subclón de Jurkat funcionalmente único, D1.1, que expresa constitutivamente T-BAM.

En el presente informe, la estructura de T-BAM se estudió por química de proteínas y por aislamiento de ADNc que codifica para T-BAM.

La proteína T-BAM se purificó por cromatografía de afinidad usando el mAb 5c8 para purificar por afinidad la proteína T-BAM de los lisados de las células D1.1. La secuencia de aminoácidos NH₂-terminal de la proteína T-BAM aislada se determinó por microsecuenciación automática y esta secuencia se usó para diseñar una sonda oligonucleotídica degenerada (T-BAM.2). En la orientación antisentido, la sonda oligonucleotídica degenerada marcada en el extremo se usó como sonda en transferencias de Northern de las células D1.1 T-BAM⁺ así como para la línea celular Jurkat B2.7 T-BAM⁻ de control. La sonda antisentido hibridaba en las células D1.1 que expresaban T-BAM con una especie de ARNm de aproximadamente 2 kB, pero no con el ARNm aislado a partir de las células Jurkat no cooperadoras T-BAM⁻ de control.

En este momento, Armitage *et al.* (1992) han publicado la secuencia de un ligando para las moléculas murinas CD40. Hay que destacar que esta molécula tenía una función relacionada y, de manera interesante, tenía una alta homología de la secuencia NH₂-terminal. La comparación de las dos secuencias se muestra a continuación:

T-BAM (M) IE(T) YNQ(Q) SP(PXAAS) (SEC ID N° 9)

* * * * *
* * * * *

CD40-L M IE T YSQ P SP RSVAT (SEC ID N° 10)

5

Aunque la estrategia inicial de clonación de T-BAM implicaba el uso de un oligonucleótido degenerado (T-BAM.2) para seleccionar una biblioteca de ADNc de D1.1 en λ gt-11, la relación de secuencia de T-BAM y CD40-L sugería la posibilidad de que su relación de secuencia pudiera utilizarse para generar una sonda de ADN más larga y de doble cadena. Apoyando esta idea de que el extremo NH₂-terminal de CD40-L codifica la cola citoplasmática de una proteína de membrana integral de tipo II y, por analogía, el extremo NH₂-terminal de T-BAM altamente homólogo podría ser una cola citoplásmica que está altamente conservada entre isoformas de proteínas relacionadas.

10

Por lo tanto, la nueva serie de experimentos se dirigió hacia si un par de sondas oligonucleotídicas derivadas de la secuencia murina del ADNc de CD40L (de las regiones citoplásmica y proximal de membrana) podrían amplificar una secuencia homóloga del ADNc de T-BAM. Por lo tanto, la PCR-ARN del ARNm de D1.1 se llevó a cabo sintetizando primero un ADNc cebado con CD40L (369-348) y amplificado después con los cebadores CD40L (11-31) y CD40L (369-348). Esta reacción amplificaba un fragmento de aproximadamente 330 pb a partir del ARN de D1.1. El producto de PCR se subclonó por unión de extremos romos en Bluescript y de cuatro insertos secuenciados en una dirección, se identificó un clon, p3-1/BluescriptII SK⁺ que era un inserto de 330 kB, homólogo en aproximadamente un 85% con el CD40-L murino.

15

20

El plásmido p3-1/Bluescript II SK⁺ se depositó el 16 de noviembre de 1992 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209, U.S.A., según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes. Al plásmido p3-1/Bluescript II SK⁺ se le concedió el número de acceso de la ATCC (75355).

25

A continuación se muestra la comparación de la secuencia de CD40-L y la amplificación del producto de PCR, p3-1:

30

CD40-L 57 TGGACTTCC . AGCGAGCAT . GAAGATTTT . TGTATTACTTAC . . TGT 101

||||| | | | | | | | | | | | | | | | | |

p3-1 436 TGGACTTCCAAACOGANCTTGGAAAATTTTATTGTATTACNTTCTTGT 387

35

102 TTTCTTAT . . . CACCCAAATGATTGATC . TGTGCTTTTGCTGTGTAT 147

||| |||| | | | | | | | | | | | | | | | |

386 TTTCTTATCCACCCCAAGATGATTGGGTCAAGCACTTTTNCCTGTGTAT 337

40

148 CTTCATA . . GAAGATTGGATAAGGTCCAAGAGGAAGTAAACCTTCA . TGA 194

||||| | | | | | | | | | | | | | | |

336 CTTCATAAGAACGGTTGGACAAGTAGAAGATGAAAGGAATCTTCATTGA 287

45

195 AGATTTTGTATTTCATAAAAAAGCTAAAGAGATGCAACAAAGGAGAAGGAT 244

||||| | | | | | | | | | | | | | | |

286 AGATTTTGTATTTCATGAAAACGATACAGAGATGCAACACAGGAGAAAGAT 237

50

245 .CTTTATCCTTGCTGAACTGTGAGGAGATGAGAAGGCAATTGAGACCT 293

| | | | | | | | | | | | | | | | | |

236 CCCTTATCCTTACTGAACTGTGAGGAGATTAAGGCCAGTTTGAAGGCTT 187

55

294 TGTCAAGGATATAACGTTAAACAAAGAAGA . . . GAAAAAGAAAACAGCT 340

||| ||||| | | | | | | | | | | | | | | | |

186 TGTGAAGGATATAATGTTAAACAAAGAGGAGACGAAGAAAGAAAACAGCT 137

60

341 TTGAAATGCAAGAGGTGATGAGGATCC . TCAAATTGCAGCA 381 (SEC ID N° 13)

||||| | | | | | | | | | | | | | | |

136 TTGAAATNCAAGAGGTGATGAGGATCCATCGAATTCTGCA 95 (SEC ID N° 14)

65

Además, en el análisis de Northern que comparaba ARN de D1.1, el clon de Jurkat T-BAM⁻ B2.7 y ARN de control de la línea celular B RAMOS, la sonda p3.1 hibridaba con una especie de ARNm de 2 kb exclusivamente en la línea celular D1.1. Considerados en conjunto con el análisis de Northern de la sonda antisentido T-BAM.2 y con los datos de proteína de que T-BAM se expresaba exclusivamente en D1.1 pero no en células Jurkat B2.7, estos datos

Por lo tanto, este inserto de aproximadamente 330 pb se usó como sonda para la selección de los clones de λ gt-11 de la biblioteca de ADNc de D1.1. Dicha selección con el inserto de 330 pb como una sonda hexamérica marcada aleatoria, identificó 9 clones independientes λ gt-11 que contenían insertos que variaban en tamaño entre 1,8 y 2,4 kb.

La PCR del ADN del fago se llevó a cabo usando sondas que hibridaban con las regiones del ADN del fago que flanqueaban el inserto y puso de manifiesto que los clones contenían insertos en el intervalo de tamaños de 1,8-2,1 kb. Dada la observación de que el tamaño del ARNm de T-BAM, usando el oligo antisentido derivado de la secuencia NH₂-terminal por análisis de Northern, era de aproximadamente 2 kb, es probable que los clones más grandes representen un ADNc de longitud completa o un ADNc de longitud casi completa del ARNm que codifica para T-BAM.

En cada uno de los nueve clones, la liberación del inserto de *EcoRI* (por digestión con *EcoRI*) puso de manifiesto que los ocho insertos contenían un sitio interno para *EcoRI*, ya que en todos los casos se obtuvieron dos fragmentos. En el caso del clon 1-1b de λ gt-11 (que tenía el inserto más largo de 2,1 kb por PCR), los dos fragmentos generados por *EcoRI* eran de 1,3 kb y 0,8 kb. Estos dos fragmentos se clonaron en el producto de digestión de *EcoRI*. Bluescript II SK⁺ tratado con fosfatasa de intestino de ternero generaba p1-1b(1,3 kb)/Bluescript II SK⁺ y p1-1b(0,8 kb)/Bluescript II SK⁺.

Los plásmidos p1-1b (1,3 kb)/Bluescript II SK⁺ y p1-1b (0,8kb)/Bluescript II SK⁺ se depositaron el 13 de noviembre de 1992 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209. U.S.A., según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes. Al plásmido p1-1b (1,3 kb)/Bluescript II SK⁺ se le concedió el número de acceso de la ATCC (75355) y al plásmido p1-1b (1,3 kb)/Bluescript II SK⁺ se le concedió el número de acceso de la ATCC (75356).

La secuencia de ADN parcial del inserto de 0,8 kb puso de manifiesto que tenía un solapamiento significativo de aproximadamente 150 pb con el producto de PCR clonado p3-1. La comparación se muestra continuación:

```

p1-1b(0,8kb)2  tgcaacacaggagaaagat.ccttataccttactgcaactgtgaggagatt 50
                |||
p3-1          546 TGCAACACAGGAGAAAGATCCCTTATCCTTACTG.AACTGTGAGGAGATT 594
                |||
p1-1b(0,8kb)   51 aaaa 54 (SEC ID N°. 16)
                |||
p3-1          595 AAAA 598 (SEC ID N°. 16)

```

Además, el extremo 5' terminal del p1-1b (0,8 kb) está aproximadamente a 200 pb 3' del primer codón de la proteína madura. Esto nos da las orientaciones de los clones con respecto al ADNc de longitud completa como se ve a continuación:

```
***** ADNc de T-BAM (pb) *****  
-- 200 --400 --600 -- 800 --1000 --1200 ----- / / --2300  
/*p3-1***/  
    /***** 1-1b(0.8 kB)*****/  
  
                                /**p1-1b(1,3 kB)*/ /*****/  
        /                               /  
        BstYI                           EcoRI  
    /***/  
  
aproximadamente,  
150 pb solapantes  
/ *****/  
secuencia codificante probable para  
la proteína de 30 kDa(T-BAM)  
  
>>>>>>>>>>>>>>>>
```

Este mapa se basa en la suposición de que el p1-1b (1,3 kb) deriva de secuencias de la UT-3' (región no traducida) de T-BAM, ya que es relativamente poco común que los mensajeros tengan una región UT-5' tan larga. Como apoyo 35 adicional de esta suposición, está la observación de que el ADNc relacionado de CD40-L tiene una UT-3' de tamaño similar (aproximadamente 1 kb).

40 Por lo tanto, puede obtenerse el ADNc de longitud completa por la combinación del producto de PCR clonado (p3-1) y del ADNc clonado (p1-1b (0,8 kb)) que juntos probablemente contienen la región codificante entera del ADNc de T-BAM, dado el tamaño de la proteína madura (30 kDa) y ya que el producto de PCR se obtuvo a partir de la secuencia NH₂-terminal. Además, es probable que el ADN clonado que hemos suministrado codifique todos los aminoácidos que se usarían en una forma recombinante soluble de la molécula.

45 Probablemente, para la expresión de T-BAM no es necesario p1-1b (1,3 kB), ya que codifica la región UT-3' del ADNc. Sin embargo, es probable que la región UT 3' del ADNc esté implicada en la regulación de la expresión de T-BAM, por analogía con otras regiones UT-3' y, por tanto, p1-1b (1,3 kB) será importante en estudios futuros para establecer el papel de la región UT-3' en funciones reguladoras.

Para generar un clon que dirija la expresión de T-BAM, se generará un fragmento de PCR clonado similar a p3-1, pero que además tenga la secuencia líder murina de muCD40-L hibridada por PCR con los cebadores mu12/T-BAM.2 y con la secuencia 3' de T-BAM. Es de esperar que la secuencia líder del CD40-L murino sea suficiente para permitir la expresión del clon T-BAM. Dicho fragmento codificaría aproximadamente 60 aa del NH₂-terminal que incluyen el fragmento (5'-200 pb) perdido en p1-1b (0,8 kB) y flanquearía un sitio *Bst*YI (a aproximadamente 220) en la región de solapamiento de p1-1b (0,8 kB) y el producto de PCR. Si después del mapeo de restricción (y secuenciación), este sitio *Bst*YI no parece ser el único de ambos fragmentos, entonces es que existen otros sitios cercanos.

```

60 ***** ADNc de T-BAM (pb) *****
-15 -- 0 --+15 -- 30 --/ /-----220-----260
*****
12 pb - T-BAM.2 / cebador N° 2 de PCR
65 líder de mu12/T-BAM.2 BstYI

```

Después, este fragmento se unirá a p1-1b (0,8 kB) por digestión de p1-1b (0,8 kB) con *Bst*YI y por digestión del fragmento de PCR con *Bst*YI y *Eco*R5 para la clonación direccional (extremos romos). El fragmento del inserto resultante (que contiene el líder murino de 15 pb -fragmento de PCR de 200 pb- y los 600 pb de *Bst*YI/p1-1b (0,8 kB) se clonará de forma direccional desde un vector intermedio en un vector de expresión para dirigir la síntesis de la proteína T-BAM.

Una vez que el clon de longitud completa se ha unido a dicho vector de expresión, puede transfectarse de forma transitoria en una línea celular de fibroblastos (tal como las células 293) y después comprobarse la expresión de T-BAM por FACS. Además, los fibroblastos que expresan T-BAM pueden cultivarse con linfocitos B humanos en reposo, o el clon RAMOS 266 y después puede estudiarse la inducción de la expresión de CD23 de superficie en las células B.

Para determinar la secuencia del ADNc de longitud completa de T-BAM, en última instancia se construirá una nueva biblioteca de λ gt11 usando el ARNm de D1.1. La biblioteca de ADNc de T-BAM se ceba con un oligonucleótido específico para la secuencia de T-BAM derivado del fragmento p1-1b (0,8 kB). Esta biblioteca se seleccionará con el inserto de p3-1 para obtener clones λ gt11 que codifiquen para la región 5' del ADNc de T-BAM. Se determinarán las secuencias de ADN de este nuevo inserto más las del p1-1b (0,8 kB) y del p1-1b (1,3 kB). El análisis de la nueva secuencia ADNc 5' debería poner de manifiesto la secuencia peptídica del NH₂-terminal.

La estructura del inserto de longitud completa incluyendo p1-1b (1,3 kB) también puede determinarse llevando a cabo una PCR del ADN λ gt-11 del clon 1-1b, seguido de la clonación de extremos romos de este fragmento en Bluescript. Se determinará la secuencia del ADN de longitud completa de este fragmento de PCR clonado. La comparación de esta secuencia con la de los insertos 1,3 y 0,8 kB de p1-1b (1,3 kB) y p1-1b (0,8 kB) facilitará la determinación de la orientación correcta 5'-3' de p1-1b (1,3 kB). Para generar un clon de ADNc de longitud completa a partir de estos fragmentos, se liberará el inserto de 1,3 kB por digestión con *Eco*RI del clon p1-1b (1,3 kB)/Bluescript II SK⁺ y se purificará por gel. Después, se llevará a cabo la digestión parcial con *Eco*RI del plásmido p1-1b (0,8 kB)/Bluescript II SK⁺ y las formas linealizadas se purificarán en gel. Después, el inserto *Eco*RI de 1,3 kB se unirá al plásmido p1-1b (0,8 kB)/Bluescript SK⁺ parcialmente digerido (linealizado) y se utilizará para transformar bacterias competentes. Los mapas de restricción detallados de los clones de esta transformación permitirán la identificación de un inserto de ADNc de longitud completa que tiene unidos juntos los insertos 1,3 y 0,8 kB en las orientaciones correctas. Entonces se secuenciará este inserto de longitud completa (pT-BAM/Bluescript II SK⁺) para confirmar que contiene los dos insertos en la orientación correcta. Después, el polienlazador en Bluescript nos permitirá clonar de forma direccional estos fragmentos en un vector de expresión eucariótico tal como pCDNA-1. Este pCDNA-1/pT-BAM después se utilizará para transfectar fibroblastos, tal como las células 293, en los que se podrá estudiar la expresión de la proteína T-BAM de superficie.

Podría haber problemas imprevistos en la expresión de este clon. Habrá casos en los que algunas de las secuencias no traducidas 5' o 3' se habrán eliminado para permitir la expresión. Esto puede lograrse fácilmente usando la información obtenida de la secuencia. Además, hay casos raros en los que un clon de ADNc tal como pT-BAM/pCDNA-1 puede tener errores de secuencia como resultado de la generación original de la biblioteca (típicamente la reacción de la transcriptasa inversa). En este caso, los otros ocho clones λ gt-11 se estudiarán de un modo análogo al que se ha descrito anteriormente en la presente invención y se reconstruirán estos clones para generar plásmidos de expresión para T-BAM.

El análisis de secuencia del clon ha puesto de manifiesto hasta ahora una glicoproteína de superficie de la membrana de tipo II con homología con el CD40-L murino, una molécula de células T murinas activadas que dirige la secreción de IgE. Estas dos proteínas son miembros de la superfamilia del TNF α que incluye citoquinas y moléculas efectoras de la superficie de la célula con una amplia diversidad de funciones inmunológicas y de otro tipo.

Para determinar si existen otros genes relacionados, se usó como sonda el inserto de 330 pb del clon p3-1/Bluescripts II SK⁺ en una transferencia de Southern de ADN humano (para células HeLa). Curiosamente se observaron tres bandas. Considerados junto con la idea de que T-BAM y CD40-L probablemente justifican dos de estas bandas, estos datos sugieren que al menos existe otro miembro de esta familia de moléculas de "T cooperadoras efectoras". O, como alternativa, aunque las propiedades funcionales de T-BAM y CD40-L son distintas, sigue existiendo la posibilidad de que T-BAM sea el homólogo humano de CD40-L. Si se demuestra que T-BAM y CD40-L son homólogos, los datos de Southern sugieren que pueden existir otros dos miembros de dicha forma de molécula cooperadora.

Discusión

En el presente trabajo, se han obtenido un producto de PCR y clones de ADNc que juntos codifican T-BAM, una proteína de la superficie celular de los linfocitos T CD4⁺ que dirige la diferenciación de las células B.

Se descubrió que T-BAM es un miembro de la superfamilia de genes de TNF α . De forma muy significativa, T-BAM está relacionada con el recientemente identificado CD40-L de ratón (Armitage, *et al.* 1992), especialmente en las regiones citoplásmica, transmembrana y de tallo, siendo la identidad de secuencia entre T-BAM humana y CD40-L murino de aproximadamente el 85%. Estos nuevos datos sugieren que T-BAM y CD40-L son isoformas estructuralmente distintas de moléculas de superficie de las células T que inducen a las células B, aunque una confirmación directa de dicha idea requerirá la identificación de homólogos murino y humano de ambas isoformas y, en particular, la secuenciación de la región codificante en el resto del clon p1-1 (0,8 kB).

Los datos previos han sugerido que T-BAM y CD40-L están relacionadas, pero son funcionalmente distintas. Mientras que T-BAM dirige la síntesis de IgG, CD40-L dirige la síntesis de IgE (Armitage, *et al.* 1992). Recientemente, la restricción de la función cooperadora de T-BAM para IgG ha tomado fuerza tras la observación de que D1.1 en presencia de rIL4 induce un clon IgM⁺ de la línea celular de linfoma B RAMOS a experimentar exclusivamente un cambio de clase a IgG1, y no a IgE o a otros isotipos (no publicado). En estos experimentos, se cultivaron células RAMOS (30 células por pocillo) durante dos a tres semanas sobre una capa alimentadora de 100 células D1.1 tratadas con mitomicina C, y se estudió por ELISA en los sobrenadantes de cultivo el isotipo y subclase de Ig específica secretada. Las células RAMOS se diferenciaban en líneas celulares secretoras de IgG1 sólo en presencia de células D1.1 y de rIL-4 (4/15 en el experimento 1 y 19/59 clones en el experimento 2). Por el contrario, las células B2.7 no inducían diferenciación ni cambio de isotipo. Además, la IL-4 recombinante era necesaria para el cambio de isotipo. Además, no se indujo el cambio a IgE en las células RAMOS. Estos datos sugieren que T-BAM y CD40 son isoformas de moléculas de superficie de la célula T que inducen a las células B, que dirigen la expresión de distintos isotipos de Ig.

A este respecto, es interesante que el mAb anti-CD49 haya demostrado que induce la proliferación, diferenciación y producción de Ig policlonal que incluye todos los isotipos de Ig (Banchereau, *et al.* 1991a; Banchereau, *et al.* 1991b). También es interesante el hecho de que las dos moléculas parecen tener importantes interacciones en las células B que implican a la molécula CD40. En el caso de CD40-L, CD40-L y CD40 parecen tener relaciones de receptor y correceptor (Armitage, *et al.* 1992). En el caso de T-BAM, dicha relación se sugiere por el bloqueo recíproco de sus funciones por mAb contra las dos estructuras diferentes, sin embargo, no hay indicios directos de que exista una relación entre receptor y ligando. Considerados junto con sus diferencias funcionales, estos datos sugieren que CD40-L y T-BAM tienen consecuencias funcionales distintas, a pesar del hecho de que ambas parezcan interactuar con la molécula de CD40 en las células B.

Además de sus distintos efectos sobre los isotipos de los anticuerpos, T-BAM y CD40-L tienen patrones de expresión y requisitos para la proliferación de células B diferentes. Las cinéticas de expresión en la superficie de las células del Ag 5c8 tras la estimulación con PHA y PMA son relativamente únicas, ya que la expresión máxima se produce después de 6 h, pero va seguida de una regulación negativa que tiene como resultado una línea basal de expresión (no expresión) a las 24 h (Lederman, *et al.* 1992). Por el contrario, CD40-L parece prolongarse durante más de 72 horas ante estímulos similares. Además, las células T-BAM⁺ D1.1 inducen la expresión en células B sólo en el contexto de rIL4 o PHA, mientras que los transfectomas CD40-L⁺ inducen la proliferación de células B en ausencia de citoquinas o lectinas añadidas (Armitage, *et al.* 1992). Considerados en conjunto, estos datos sugieren que las señales proporcionadas por CD40-L y T-BAM a las células B son distintas y, por lo tanto, son coherentes con la sugerencia estructural de que estas moléculas son isoformas distintas con funciones relacionadas pero distintas.

La molécula de CD40 en las superficies de células B humanas tiene funciones de señalización interesantes relevantes para la diferenciación de las células B de los ganglios linfáticos (Clark, *et al.*, 1986; Clark, *et al.*, 1988; Ledbetter, *et al.*, 1987; Ledbetter, *et al.*, 1986), ya que un anti-CD40 (mAb G28-5 (Clark, *et al.*, 1986)) impide la muerte programada (apoptosis) de las células B del centro germinal (Liu, *et al.*, 1989). A este respecto, es interesante que CD40 sea homólogo a FAS (Itoh, *et al.*, 1991), el receptor de la superficie de las células T y B para señales de apoptosis. Hasta el punto de que las interacciones T-B en los órganos linfoides implican apoptosis, estos datos sugieren que además de interactuar con moléculas de CD40, T-BAM puede interactuar con FAS (Itoh, *et al.*, 1991). De hecho, recientemente hemos observado que el mAb anti-FAS (Apo-1) (Oehm, *et al.*, 1992; Itoh, *et al.*, 1991) inhibe parcialmente el efecto de D1.1 de inducción de CD23 en RAMOS 266 y en células B (observaciones no publicadas). La idea de que T-BAM puede interactuar tanto con CD40 como con FAS sugiere la idea de que CD40 y FAS pueden ser estructuras receptoras distintas, o pueden formar un receptor heterodimérico. Se sabe que algunas de las moléculas similares a TNF α R existen como multímeros - posiblemente homodímeros en el caso de CD27 (Camerini, *et al.*, 1991). La interacción de moléculas similares a TNF α con receptores multiméricos también se sugiere por las estructuras triméricas compartidas de TNF (Hakoshima, *et al.*, 1988; Smith, *et al.*, 1987) y por NGF (McDonald, *et al.*, 1991), los únicos miembros de esta familia cristalizados. Es evidente que FAS y TNF α R pueden formar heterodímeros, ya que estas moléculas se comodulan en la superficie de los linfocitos por anticuerpos anti-FAS (Yonehara, *et al.*, 1989). El hecho de que un solo ligando similar a TNF α (CD40) pueda interactuar con múltiples ligandos, incluyendo heterodímeros mixtos de moléculas similares al TNF α -R, también se sugiere por otros ejemplos de moléculas similares a TNF α . Por ejemplo, TNF α y TNF β (linfotoxinas) reaccionan con dos cadenas distintas del TNF α R (I y II) (Goodwin, *et al.*, 1991; Rothe, *et al.*, 1991; Nophar, *et al.*, 1990; Engelmann, *et al.*, 1990; Lewis, *et al.*, 1991; Himmler, *et al.*, 1990; Umiel, *et al.*, 1987; Heller, *et al.*, 1990; Gray, *et al.*, 1990; Smith, *et al.*, 1990; Loetscher, *et al.*, 1990; Dembic, *et al.*, 1990) y, además, análisis bioquímicos han sugerido una combinación heterodimérica de estas cadenas (Nophar, *et al.*, 1990; Engelmann, *et al.*, 1990). En conjunto, estas observaciones sugieren que los miembros de las familias del TNF α y TNF α R, generalmente pueden interactuar con combinaciones de receptores relacionados para señalar vías características de las células B. Otra propiedad que parece ser una característica compartida por los miembros de la familia de TNF α es que TNF α R, CD40 y FAS son todos receptores para señales de apoptosis (Watanabe, *et al.*, 1992).

Los muchos ejemplos de interacciones similares a TNF α y similares a TNF α R que operan entre las células T y B se muestran a continuación en la tabla 6. Con respecto a las propiedades y funciones de las moléculas similares a TNF α , no se conoce la función precisa de CD38 (Jackson, *et al.*, 1990) y aunque se ha publicado que NGF tiene efectos sobre la diferenciación de células B (Kimata, *et al.*, 1991; Otten *et al.* 1989), actualmente no se entiende el papel de las interacciones NGF-NGFR (Sehgal, *et al.*, 1989; Chao, *et al.*, 1986; Jonson, *et al.*, 1986) en la fisiología de la célula B. Entre las moléculas similares a TNF α R, actualmente se desconocen las funciones de CD27 y Ox40, pero resulta interesante que CD27 (Camerini, *et al.*, 1991) se exprese como dos formas y la expresión de Ox40 (Mallett, *et*

ES 2 207 634 T5

al., 1990) esté restringida a células T CD4⁺ y no a CD8⁺. Ambas moléculas se inducen por la activación de células T. Actualmente se desconocen las funciones fisiológicas del "antígeno de Hodgkin" CD30 (Durkop, *et al.*, 1992).

TABLA 6

5 <i>Miembros de las familias TNFα y TNFαR en células T y B implicados en las interacciones de la superficie celular</i>		
10	<u>células T</u> <u>"receptores cooperadores"</u>	<u>células B</u>
15	T-BAM (ayuda para IgG) CD40-L (ayuda para IgE)	CD40/"x" CD40/"y"
	<u>"receptores/mediadores de apoptosis"</u>	
20	TNF α (superficie celular) TNF α (soluble) TNF α RII/TNF α RII	TNF α RI/TNF α RI
25		TNF α RI/TNF α RII sTNF α RI sTNF α RII
30	TNF β (linfotoxina)	TNF α R ¿otros?

35	TNF α R (2 isoformas)	TNF α
40	?FAS/FAS ?FAS/TNF α R	? ?
45	? ?	FAS/FAS FAS/TNF α R
	<u>moléculas de superficie de función desconocida</u>	
50	CD27/CD27 CD27/CD27a sCD27	? ? ?
55	? Ox-40 (rata, ratón) (específica de células T CD4 ⁺)	CD27/CD27 ??

60	CD38 (OKT10) (inducida por activación) NFG	? ? NGFR
65	?	CD30 (Ag asociado a Hodgkin)

Una característica interesante de varios miembros de la familia TNF α es que la escisión proteolítica de la forma procitoquina de superficie de TNF α genera la forma soluble de la citoquina del TNF α . Estudios futuros determinarán si T-BAM se escinde por proteasas y qué papel, si se identifica, puede jugar T-BAM soluble en las interacciones T-B. También es interesante que las moléculas de TNF α R (Umiel, *et al.*; 1987; Heller, *et al.*, 1990; Gray, *et al.*, 1990) y de CD27 (Loenne, *et al.*, 1992; DeJong, *et al.*, 1991) tengan formas solubles, lo que sugiere que pueden existir formas solubles de la molécula CD40 y también podrían tener un papel en las interacciones T-B.

El reciente artículo sobre otro CD40-L murino que tiene un peso molecular considerablemente mayor que CD40-L (39 kDa frente a 33 kDa) ha sugerido una complejidad adicional en las interacciones de las moléculas de la superficie de las células T con CD40 de la célula B (Armitage, *et al.*, 1992; Noelle, *et al.*, 1992). Sin embargo, su estructura precisa o su relación con T-BAM o CD40-L actualmente se desconocen.

Aunque se han descrito otras diversas moléculas de la superficie de las células B que pueden jugar papeles en la recepción de las señales dependientes de contacto en tejido linfóide, sin embargo, el efecto de mAb 5c8 en la inhibición de las interacciones de células B-D1.1 parece ser relativamente único entre los anticuerpos ensayados, ya que anti-CR2, anti-LFA1, anti-LFA3 o anti-ICAM no tienen efectos sobre las interacciones de D1.1 con las células B. Por lo tanto, la etapa dependiente de T-BAM de las interacciones T-B parece ser una etapa discreta en la función efectora cooperadora.

La naturaleza transitoria de la expresión de T-BAM, sugiere que puede jugar un papel en la estabilización del “par afín” T-B. Esta asociación física de las células T CD4⁺ específicas de péptido activadas con una célula B específica de proteína nativa “afín” parece ser la base molecular de lo que fisiológicamente se define “puente de antígeno”.

Además, para clarificar la relación entre T-BAM y CD40-L, la disponibilidad de un ADNc que codifica T-BAM nos ha permitido identificar genes homólogos en otras especies, especialmente en ratón, en el que los aspectos fisiológicos de las funciones de T-BAM pueden ser abordados por sobreexpresión (en transgénicos) o por disrupción génica dirigida. Además, la disponibilidad de sondas de ADNc específicas de T-BAM facilitará el análisis de la regulación de la expresión de T-BAM a nivel transcripcional, además de proporcionar un medio de estudio por manipulaciones genéticas de los determinantes estructurales de las propiedades funcionales de T-BAM.

Además de sus funciones en la fisiología inmune, ciertos miembros de la familia TNF α R parecen ser utilizados por patógenos virales. El virus del mixoma expresa una proteína secretada homóloga a TNF α R que está implicada en la virulencia viral (Upton, *et al.*, 1991). Además, una proteína codificada por una fase de lectura abierta del virus del fibroma de Shope es homóloga a TNF α R (Smith, *et al.*, 1990). Por lo tanto, un aspecto adicional para entender estas moléculas puede ser la identificación o caracterización de nuevos virus que utilizan dominios funcionales de moléculas tales como T-BAM para inducir una patología inmune, por ejemplo en enfermedades autoinmunes.

Bibliografía

Andersson, J., M.H. Schreier, y F. Melchers. 1980. T-Cell-dependent B-cell stimulation is H-2 restricted and antigen dependent only at the resting B-cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1612.

Armitage, R.J., W.C. Fanslow, L. Strockbine, T.A. Sato, K.N. Clifford, B.M. Macduff, D.M. Anderson, S.D. Gimpel, T. Davis-Smith, C.R. Maliszewski, E.A. Clark, C.A. Smith, K.H. Grabstein, D. Cosman, y M.K. Spriggs. 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357: 80-82.

Ashman, R.B. y A. Mullbacher. 1979. A T helper cell for anti-viral cytotoxic T-cell responses. *J. Exp. Med.* 150:1277.

Askonas, B.A. y A.R. Williamson. 1972. Factors affecting the propagation of a B cell clone forming antibody to the 2,4-dinitrophenyl group. *Eur. J. Immunol.* 2:487.

Banchereau, J., P. De Paoli, A. Valle, E. Garcia, y F. Rousset. 1991a. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* 251:70.

Banchereau, J. y F. Rousset. 1991b. Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature* 353:678.

Bank, I., R.A. DePinho, M.B. Brenner, J. Cassimeris, F.W. Alt, y L. Chess. 1986. A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322:179.

Barret, T.B., G. Shu, y E.A. Clark. 1991. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J. Immunol.* 146:1722.

Barlett, W.C., J. McCann, D.M. Shepherd, M. Roy, and R. J. Noelle. 1990. Cognate interactions between helper T cells and B cells. IV. Requirements for the expression of effector phase activity by helper T cells. *J. Immunol.* 145:3956.

- Barlett, W.C., A. Michael, J. McCann, D. Yuan, E. Claassen, y R. Noelle. 1989. Cognate interactions between helper T cells and B cells. II. Dissection of cognate help by using a class II-restricted, antigen-specific, IL-2-dependent helper T cell clone. *J. Immunol.* 143:1745.
- 5 Bennink, J.R. y P.C. Doherty. 1978. Different rules govern help for cytotoxic T cells and B cells. *Nature* 276:829.
- Bevilacqua, M.P., J.S. Pober, D.L. Mendrick, R.S. Cotran, y M.A. Gimbrone, 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:9238.
- 10 Bjorndahl, J.M., S. Nakamura, T. Hara, L.K. Jung, y S.M. Fu. 1988. The 28-kDa/32-kDa activation antigen EA1. Further characterization and signal requirements for its expression. *J. Immunol.* 141:4094.
- Borst, J., C. Sluyser, E. De Vries, H. Klein, C.J. Melief, y R.A. van Lier. 1989. Alternative molecular form of human T cell-specific antigen CD27 expressed upon T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 19:357.
- 15 Brian, A.A. 1988. Stimulation of B-cell proliferation by membrane-associated molecules from activated T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:564.
- Brian, A.A. 1988. Stimulation of B-cell proliferation by membrane-associated molecules from activated T cells. 20 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:564.
- Cambier, J.C. y M.H. Julius. 1988. Early changes in quiescent B cell physiology subsequent to cognate and bystander interaction with helper T cells. *Scand. J. Immunol.* 2759.
- 25 Carter, R.H., M.O. Spycher, Y.C. Ng, R. Hoffman, y D.T. Fearon. 1988. Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J. Immunol.* 141:457.
- Chao, M.V., M.A. Bothwell, A.H. Ross, H. Koprowski, A.A. Lanahan, C.R. Buck, y A. Sehgal. 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232:518.
- 30 Clark, E.A. y J.A. Ledbetter. 1986. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:4494.
- 35 Clark, E.A., T.C. Yip, J.A. Ledbetter, H. Yukawa, H. Kikutani, T. Kishimoto, y M.H. Ng. 1988. CDw40 and BLCA-specific monoclonal antibodies detect two distinct molecules which transmit progression signals to human B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 18:451.
- Clark, E.A., G.L. Shu, B. Luscher, K.E. Draves, J. Banchereau, J.A. Ledbetter, y M.A. Valentine. 1989. Activation of human B cells. Comparison of the signal transduced by IL-4 to four different competence signals. *J. Immunol.* 143:3873.
- 40 Clark, E.A. 1990. CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens.* 36:33.
- Clement, L.T., M.K. Dagg, y G.L. Gartland. 1984. Small, resting B cells can be induced to proliferate by direct 45 signals from activated helper T cells. *J. Immunol.* 132:740.
- Camerini, D., G. Walz, W.A. Loenen, J. Borst, y B. Seed. 1991. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J. Immunol.* 147:3165.
- 50 Crow, M.K. y H.G. Kunkel. 1985. Activated B lymphocytes: stimulators of an augmented autologous mixed leukocyte reaction. *Cell Immunol.* 90:555.
- Crow, M.K., B. Kushner, J.A. Jovers, S.M. Friedman, S.E. Mechanic, y W. Stohl. 1989. Human peripheral blood T helper cell-induced B cell activation results in B cell surface expression of the CD23 (BLAST-2) antigen. *Cell Immunol.* 121:99.
- 55 Crow, M.K., J.A. Jover, y S.M. Friedman. 1986. Direct T helper-B cell interactions induce an early B cell activation antigen. *J. Exp. Med.* 164:1760.
- 60 Chestnut, R.W. and H.M. Grey. 1981. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 126:1075.
- Damle, N.K., P.S. Linsley, y J.A. Ledbetter. 1991. Direct helper T cell-induced B cell differentiation involves interaction between T cell antigen CD28 and B cell activation antigen B7. *Eur. J. Immunol.* 21:1277.
- 65 Doech, H.M., R.K. Schuurman, y E.W. Gelfant. 1980. Polyclonal activation of human lymphocytes *in vitro*-II. Reappraisal of T and B cell-specific mitogens. *J. Immunol.* 125:827.

- DeFranco, A.L., J.D. Ashwell, R.H. Sxhwartz, y W.E. Paul. 1984. Polyclonal stimulation of resting B lymphocytes by antigen-specific T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 159:861.
- De Jong, R., W.A. Loenen, M. Brouwer, L. van Emmerik, E.F. de Vries, J. Borst, y R.A. van Lier. 1991. Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *J. Immunol.* 146:2488.
- Dembic, Z., H. Loetscher, U. Gubler, Y.C. Pan, H.W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, y W. Lesslauer. 1990. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine.* 2:231.
- Depper, J.M., W.J. Leonard, M. Kronke, P.D. Noguchi, R.E., Cunningham, T.A. Waldmann, y W.C. Greene. 1984. Regulation of interleukin 2 receptor expression: effects of phorbol diester, phospholipase C, and reexposure to lectin or antigen. *J. Immunol.* 133:3054.
- Doyle, C. y J.L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330:256.
- Darkop, H., U. Latza, M. Hummel, F. Eitelbach, B. Seed, y H. Stein. 1992. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 68:421.
- Emilie, D., C. Wallon, P. Galanaud, A. Fischer, D. Olive, y J.F. Delfraissy. 1988. Role of the LFA3-CD2 interaction in human specific B cell differentiation. *J. Immunol.* 141:1912.
- Engelmann, H., H. Holtmann, C. Brakebusch, Y.S. Avni, I. Sarov, Y. Nophar, E. Hadas, O. Leitner, y D. Wallach. 1990. Antibodies to a soluble form a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J. Biol. Chem.* 265:14497.
- Fan, S.T., A.L. Glasebrook, y T.S. Edgington. 1990. Clonal analysis of CD4+ T helper cell subsets that induce the monocyte procoagulant response. *Cell Immunol.* 128:52.
- Fan, S.T. y T.S. Edgington. 1988. Clonal analysis of mechanisms of murine T helper cell collaboration with effector cells of macrophage lineage. *J. Immunol.* 141:1819.
- Farrah, T. y C.A. Smith. 1992. Emerging cytokine family. *Nature* 358:26.
- Friedman, S.M., J.M. Breard, y L. Chess. 1976. Triggering of human peripheral blood B cells: polyclonal induction and modulation of an *in vitro* PFC response. *J. Immunol.* 117:2021.
- Friedman, S.M., M.K. Crow, O.H. Irigoyen, C. Russo, D.N. Posnett, y L. Rogozinski. 1986. Human helper-T-cell function does not require T4 antigen expression. *Cell Immunol.* 103:105.
- Goodwin, R.G., D. Anderson, R. Jerzy, T. Davis, C.I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, y C.A. Smith. 1991. Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol. Cell Biol.* 11:3020.
- Goldberg, D., A. Green, A.B. Gottlieb, M.K. Crow, A. Lewison, y S.M. Friedman. 1985. Cloned allospecific human helper T cell lines induce an MHC-restricted proliferative response by resting B cells. *J. Immunol.* 135:1012.
- Gray, D. y H. Skarvall. 1988. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336:70.
- Gray, D., M. Kosco, and B. Stockinger. 1991. Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory. *Int. Immunol.* 3:141.
- Gray, P.W., K. Barrett, D. Chantry, M. Turner, y M. Feldmann. 1990. Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:7380.
- Grusby, M.J., R.S. Johnson, V.E. Papaioannou, y L.H. Glimcher. 1991. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 253:1417.
- Hakoshima, T. y K. Tomita. 1988. Crystallization and preliminary X-ray investigation reveals that tumor necrosis factor is a compact trimer furnished with 3-fold symmetry. *J. Mol. Biol.* 201:455.
- Hara, T., L.K. Jung, J.M. Bjorndahl, y S.M. Fu. 1986. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 cD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J. Exp. Med.* 164:1988.

Hart, D. N. y J.L. McKenzie. 1988. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J. Exp. Med.* 168:157.

Heller, R.A., K. Song, M.A. Onasch, W.H. Fischer, D. Chang, y G.M. Ringold. 1990. Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:6151.

Himmler, A., I. Maurer Fogy, M. Kronke, P. Scheurich, K. Pfizenmaier, M. Lantz, I. Olsson, R. Hauptmann, C. Stratowa, y G.R. Adolf. 1990. Molecular cloning and expression of human and rat tumor necrosis factor receptor chain (p60) and its soluble derivative, tumor necrosis factor-binding protein. *DNA Cell Biol.* 9:705.

Hirohata, S., D.F. Jelinek, y P.E. Lipsky. 1988. T cell-dependent activation of B cell proliferation and differentiation by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J. Immunol.* 140:3736.

Hodgkin, P.D., L.C. Yamashita, R.L. Coffman, y M.R. Kehry. 1990. Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines. *J. Immunol.* 145:2025.

Inghirami, G., B. Y. Zhu, L. Chess, y D.M. Knowles. 1990. Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the gamma/delta T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. *Am. J. Pathol.* 136:357.

Inghirami, G., D.R. Foitl, A. Sabichi, B.Y. Zhu, y D.M. Knowles. 1991. Autoantibody-associated crossreactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD5 antigen expression. *Blood* 78:1503.

Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, y S. Nagata. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233.

Jackson, D.G. y J.I. Bell. 1990. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J. Immunol.* 144:2811.

Janeway, C.A., S. Carding, B. Jones, J. Murray, P. Portoles, R. Rasmussen, J. Rojo, K. Saizawa, J. West, y K. Bottomly 1988. CD4⁺ T cells: specificity and function. *Immunol. Rev.* 101:39.

Johnson, D., A. Lanahan, C.R. Buck, A. Sehgal, C. Morgan, E. Mercer, M. Bothwell, y M. Chao. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545.

Jones, B. y C.A. Janeway. 1981. Cooperative interaction of B lymphocytes with antigen-specific helper T lymphocytes is MHC restricted. *Nature* 292:547.

Jover, J.A., E.K. Chartash, B. Kushner, S.M. Friedman, y M.K. Crow. 1989. T helper cell-induced CD23 (BLAST-2) expression: an activation marker for the high density fraction of human B cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53:99.

Julius, M.H., J.M. Chiller, y C.L. Sidman. 1982. Major histocompatibility complex-restricted cellular interactions determining B cell activation. *Eur. J. Immunol.* 12:627.

Julius, M.H. y H.G. Rammensee. 1988. T helper cell-dependent induction of resting B cell differentiation need not require cognate cell interaction. *Eur. J. Immunol.* 18:375.

Julius, M.H., H.G. Rammensee, M.J. Ratcliffe, M. C. Lamers, J. Langhorne, y G. Kohler. 1988. The molecular interactions with helper T cells which limit antigen-specific B cell differentiation. *Eur. J. Immunol.* 18:381.

Kast, W.M., A.M. Bronkhorst, L.P. de Waal, y C.J. Melief. 1986. Cooperation between cytotoxic and helper T lymphocytes in protection against lethal Sendai virus infection. Protection by T cells is MHC-restricted and MHC-regulated; a model for MHC-disease associations. *J. Exp. Med.* 164:723.

Katz, D.H., T. Hamaoka, M.E. Dorf, y B. Benacerraf. 1973. Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. The H-2 gene complex determines successful physiologic lymphocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2624.

Kimata, H., A. Yoshida, C. Ishioka, T. Kusunoki, S. Hosoi, y H. Mikawa. 1991. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur. J. Immunol.* 21:137.

Kirchevsky, A., E.G. Armstrong, J. Schlatterer, S. Birken, J. O'Connor, K. Bikel, S. Silverberg, J.W. Lustbader, y R.E. Canfield. 1988. Preparation and characterization of antibodies to the urinary fragment of the human chorionic gonadotropin beta-subunit. *Endocrinology* 123:584.

- Ko, H.S., S.M. Fu, R.J. Winchester, D.T. Yu, and H.G. Kunkel. 1979. la determinatns on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells. *J. Exp. Med.* 150:246.
- Krensky, A.M., C. Clayberger, C.S. Reiss, J.L. Strominger, y S.J. Burakoff. 1982. Specificity of OKT4+ cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 129:2001.
- Krusemeier, M. y E.C. Snow. 1988. Induction of lymphokine responsiveness of hapten-specific B lymphocytes promoted through an antigen-mediated T helper lymphocyte interaction. *J. Immunol.* 140:367.
- Kubota, E., D.T. McKenzie, R.W. Dutton, y S.L. Swain. 1991. Role of T cells in the B-cell response: glutaraldehyde-fixed T-helper hybridoma cells synergize with the lymphokines IL-4 to induce B-cell activation and proliferation. *Immunology.* 72:40.
- Kupfer, A. and S.J. Singer. 1989. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu. Rev. Immunol.* 7:309.
- Kupfer, A., S.L. Swain, and S.J. Singer. 1987. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J. Exp. Med.* 165:1565.
- Ledbetter, J.A., G. Shu, M. Gallagher, y E.A. Clark. 1987. Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40). *J. Immunol.* 138:788.
- Ledbetter, J.A. y E.A. Clark. 1986. Surface phenotype and function of tonsillar germinal center and mantle zone B cell subsets. *Hum. Immunol.* 15:30.
- Lederman, S., M.J. Yellin, A. Krichevsky, J. Belko, J.J. Lee, y L. Chess. 1992. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact dependent B cell differentiation (help). *J. Exp. Med.* 175:1091.
- Leist, T.P., M. Kohler, y R. M. Zinkernagel. 1989. Impaired generation of anti-viral cytotoxicity against lymphocytic choriomeningitis and vaccinia virus in mice treated with CD4-specific monoclonal antibody. *Scand. J. Immunol.* 30:679.
- Lewis, M., L.A. Tartaglia, A. Lee, G.L. Bennett, G.C. Rice, G.H. Wong, E.Y. Chen, y D.V. Goeddel. 1991. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:2830.
- Linsley, P.S., E.A. Clark, y J.A. Ledbetter. 1990. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:5031.
- Liu, Y.J., D.E. Joshua, G.T. Williams, C.A. Smith, J. Gordon, e I.C. MacLennan. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929.
- Liu, Y-J., G.D. Johnson, J. Gordon, e I.C.M. MacLennan. 1992. Germinal centers in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol. Today* 13:17.
- Liu, Y.J., J.A. Cairns, M.J. Holder, S.D. Abbot, K.U. Jansen, J.Y. Bonnefoy, J. Gordon, and I.C. MacLennan, 1991. Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 21:1107.
- Loenen, W.A., E. De Vries, L.A. Gravestein, R.Q. Hintzen, R.A. van Lier, y J. Borst. 1992. The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis. *Eur. J. Immunol.* 22:447.
- Loetscher, H., Y.C. Pan, H.W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, H. Tabuchi, y W. Lesslauer. 1990. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61:351.
- Lohoff, M., M. Dirks, P. Rohwer, y M. Rollighoff. 1989. Studies on the mechanism of polyclonal B cell stimulation by Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 19:77.
- Mallett, S., S. Fossum, y A.N. Barclay. 1990. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes—a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J.* 9:1063.
- Martin, P.J., J.A. Ledbetter, Y. Morishita, C.H. June, P.G. Beatty, y J.A. Hansen. 1986. A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 136:3282.
- Martinez, A.C. y A. Coutinho. 1981. B-cell activation is a two step process. *Nature* 290:60.

McDonald, N.Q., R. Lapatto, J. Murray Rust, J. Gunning, A. Wlodawer, and T.L. Blundell. 1991. New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354:411.

Mitchell, G.F. y J.F. Miller. 1968. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128:821.

Mitchison, N.A. 1971. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. V. Use of anti-lymphocyte serum to deplete animals of helper cells. *Eur. J. Immunol.* 1:68.

Nemerow, G.R., M.E. McNaughton, y N.R. Cooper. 1985. Binding of monoclonal antibody to the Epstein Barr virus (EBV)/CR2 receptor induces activation and differentiation of human B lymphocytes. *J. Immunol.* 135:3068.

Noelle, R.J., J. Daum, W.C. Bartlett, J. McCann, y D.M. Shepherd. 1991. Cognate interactions between helper T cells and B cells. V. Reconstitution of T helper cell function using purified plasma membranes from activated Th1 and Th2 helper cells and lymphokines. *J. Immunol.* 146:1118.

Noelle, R.J., M. Roy, D.M. Shepherd, I. Stamenkovic, J.A. Ledbetter, y A. Aruffo. 1992. A 38-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6550.

Noelle, R.J. y E.C. Snow. 1990. Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol. Today* 11:361.

Noelle, R.J. y E.C. Snow. 1991. T helper cell-dependent B cell activation. *FASEB J.* 5:2770.

Noelle, R.J., J. McCann, L. Marshall, y W.C. Bartlett. 1989. Cognate interactions between helper T cells and B cells. III. Contact-dependent, lymphokine-independent induction of B cell cycle entry by activated helper T cells. *J. Immunol.* 143:1807.

Noelle, R.J., E.C. Snow, J.W. Uhr, and E.S. Vitetta. 1983. Activation of antigen-specific B cells: role of T cells, cytokines, and antigen in induction of growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:6628.

Nophar, Y., O. Kemper, C. Brakebusch, H. Englemann, R. Zwang, D. Aderka, H. Holtmann, y D. Wallach. 1990. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J.* 9:3269.

Nossal, G.J. 1992. The molecular and cellular basis of affinity maturation in the antibody response. *Cell* 68:1.

O'Brien, R.L., P. Marrack, U. Storb, y J.W. Kappler. 1988. B cells expressing Ig transgenes respond to a T-dependent antigen only in the presence of Ia-compatible T cells. *J. Immunol.* 141:3335.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Paulita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., et al. 1992 Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the Tumor Necrosis Factor/Neurotrophin Receptor Superfamily. Sequence Identity with the Fas Antigen. *J. Biol. Chem.* 267(15):10709.

Otten, U., P. Ehrhard, y R. Peck. 1989. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10059.

Owens, T. 1988. A noncognate interaction with anti-receptor antibody-activated helper T cells induces small resting murine B cells to proliferate and to secrete antibody. *Eur. J. Immunol.* 18:395.

Paterson, D.J., W.A. Jefferies, J.R. Green, M.R. Brandon, P. Corthesy, M. Puklavec, y A. F. Williams. 1987. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol. Immunol.* 24:1281.

Poo, W.J., L. Conrad, y C.A. Janeway. 1988. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 332:378.

Pollok, K.E., V. O'Brien, L. Marshall, J.W. Olson, R.J. Noelle, y E.C. Snow. 1991. The development of competence in resting B cells. The induction of cyclic AMP and ornithine decarboxylase activity after direct contact between B and T helper cells. *J. Immunol.* 146:1633.

Principato, M.A., G.S. Thompson, y S.M. Friedman. 1983. A cloned major histocompatibility complex-restricted trinitrophenyl-reactive human helper T cell line that activates B cell subsets via two distinct pathways. *J. Exp. Med.* 158:1444.

- Rabin, E.M., J. Ohara, y W.E. Paul. 1985. B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:2935.
- 5 Rahemtulla, A., W.P. Fung-Leung, M.W. Schilham, T.M. Kinding, S.R. Sambhara, A. Narendran, A. Arabian, k. Wakeham, C.J. Paige, R.M. Zinkernagel, R.G. Miller, y T.W. Mak. 1991. Normal development and function of CD8⁺ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353:180.
- 10 Reinherz, E.L., P.C. Kung, G. Goldstein, y S.F. Schlossman. 1979. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4061.
- 10 Reinherz, E.L., P.C. Kung, J.M. Breard, G. Goldstein, y S.F. Schlossman. 1980. T cell requirements for generation of helper factor(s) in man: analysis of the subsets involved. *J. Immunol.* 124:1883.
- 15 Reinherz, E.L., P.C. Kung, J.M. Pesando, J. Ritz, G. Goldstein, y S.F. Schlossman. 1979. la determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. Activation stimuli required for expression. *J. Exp. Med.* 150:1472.
- 20 Riedel, C., T. Owens, y G.J. Nossal. 1988. A significant proportion of normal resting B cells are induced to secrete immunoglobulin through contact with anti-receptor antibody-activated helper T cells in clonal cultures. *Eur. J. Immunol.* 18:403.
- 20 Risso, A., D. Smilovich, M.C. Capra, I. Baldissarro, G., Yan, A. Bargellesi, y M.E. Cosulich, 1991. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J. Immunol.* 146:4105.
- 25 Rogozinski, L., A. Bass, E. Glickman, M.A. Talle, G. Goldstein, J. Wang, L. Chess, e Y. Thomas. 1984. The T4 surface antigen is involved in the induction of helper function. *J. Immunol.* 126:735.
- 30 Rothe, J.G., M. Brockhaus, R. Gentz, y W. Lesslauer. 1991. Molecular cloning and expression of the mouse Tnf receptor type b. *Immunogenetics* 34:338.
- 30 Rothlein, R., M.L. Dustin, S.D. Marlin, y T.A. Springer. 1986. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 137:1270.
- 35 Sanchez Madrid, F., A. M. Krensky, C.F. Ware, E. Robbins, J.L. Strominger, S.J. Burakoff, y T.A. Springer. 1982. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:7489.
- 40 Sanders, V.M., J.M. Snyder, J.W. Uhr, y E.S. Vitetta. 1986. Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells. *J. Immunol.* 137:2395.
- 40 Sanders, V.M. y E.S. Vitetta. 1991. B cell-associated LFA-1 and T cell-associated ICAM-1 transiently cluster in the area of contact between interacting cells. *Cell Immunol.* 132:45.
- 45 Sehgal, A., M. Bothwell, y M. Chao. 1989. Gene transfer of truncated NGF receptor clones leads to cell surface expression in mouse fibroblasts. *Nucleic. Acids.Res.* 17:5623.
- 50 Sekita, K., C. Straub, D. Hoessli, y R.H. Zubler. 1988. B cell-stimulating activity of lymphoid cell membrane fractions. *Eur. J. Immunol.* 18:1405.
- 50 Sen, J., P. Bossu, S.J. Burakoff, y A.K. Abbas. 1992. T cell surface molecules regulating noncognate B lymphocyte activation. Role of CD2 and LFA-1. *J. Immunol.* 148:1037.
- 55 Shields, J.G., R.J. Armitage, B.N. Jamieson, P.C. Beverley, y R.E. Callard. 1989. Increased expression of surface IgM but not IgD or IgG on human B cells in response to IL-4. *Immunology* 66:224.
- 55 Siegel, J.P. y H.S. Mostowski. 1990. A bioassay for the measurement of human interleukin-4. *J. Immunol. Methods* 132:287.
- 60 Smith, S.H.M.H. Brown, D. Rowe, R E. Callard, y P.C. Beverley. 1986. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology* 58:63.
- 60 Smith, R.A. y C. Baglioni. 1987. The active form of tumor necrosis is a trimer. *J. Biol. Chem.* 262:6951.
- 65 Smith, C.A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M.P. Beckmann, R. Jerzy, S.K. Dower, D. Cosman, y R.G. Goodwin. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019.

Snow, E.C., R.J. Noelle, J.W. Uhr, y E.S. Vitetta. 1983. Activation of antigen-enriched B cells. II. Role of linked recognition in B cell proliferation to thymus-dependent antigens. *J. Immunol.* 130:614.

Spiegel, H., H. Herbst, G. Niedobitek, H.D. Foss, y H. Stein. 1992. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am. J. Pathol.* 140:15.

Sprent, J. 1978a. Restricted helper function of F1 hybrid T cells positively selected to heterologous erythrocytes in irradiated parental strain mice. II. Evidence for restrictions affecting helper cell induction and T-B collaboration, both mapping to the K-end of the H-2 complex. *J. Exp. Med.* 147:1159.

Sprent, J. 1978b. Role of H-2 gene products in the function of T helper cells from normal and chimeric mice *in vivo*. *Immunol. Rev.* 42:108.

Stamenkovic, I., D. Sgroi, A. Aruffo, M.S. Sy, y T. Anderson. 1991. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell* 66:1133.

Stamenkovic, I., E.A. Clark, y B. Seed. 1989. A b-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* 8:1403.

Tesch, H., F. I. Smith, W.J. Muller Hermes, y K. Rajewsky. 1984. Heterogeneous and monoclonal helper T cells induce similar anti-(4-hidroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibody populations in the primary adoptive response. I. Isotype distribution. *Eur. J. Immunol.* 14:188.

Thomas, Y., J. Sosman, L. Rogozinski, O. Irigoyen, P.C. Kung, G. Goldstein, y L. Chess, 1981. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. III. Regulation of helper factor production by T cell subsets. *J. Immunol.* 126:1948.

Thomas, T., L. Rogozinski, O.H. Irigoyen, S.M. Friedman, P.C. Kung, G. Goldstein, y L. Chess. 1981. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. IV. Induction of suppressor cells within the OKT4+ population. *J. Exp. Med.* 154:459.

Thomas, Y., J. Sosman, O. Irigoyen, S.M. Friedman, P.C. Kung, G. Goldstein, y L. Chess. 1980. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B cell differentiation. *J. Immunol.* 125:2402.

Thomas, Y., L. Rogozinski, O.H. Irigoyen, H.H. Shen, M.A. Talle, G. Goldstein, y L. Chess. 1982. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. V. Suppressor cells within the activated OKT4+ population belong to a distinct subset. *J. Immunol.* 128:1386.

Thompson, C.B., M. E. Schaefer, F.D. Finkelman, I. Scher, J. Farrar, y J.J. Mond. 1985. T cell-derived B cell growth factor(s) can induce stimulation of both resting and activated B cells. *J. Immunol.* 134:369.

Tohma, S., S. Hirohata, y P.E. Lipsky. 1991. The role of CD11a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation. *J. Immunol.* 146:492.

Tohma, S. y P.E. Lipsky. 1991. Analysis of the mechanism of T cell-dependent polyclonal activation of human B cells. Induction of human B cell responses by fixed activated T cells. *J. Immunol.* 146:2544.

Torimoto, Y., K. Sugita, D.S. Weinberg, N.H. Dang, C. Donahue, N.L. Letvin, S.F. Schlossman, y C. Morimoto. 1991. Development of a monoclonal antibody, anti-6C2, which is involved in the interaction of CD4 T helper cells and activated B cells. *J. Immunol.* 146:2176.

Umiel, T., L.M. Nadler, I.J. Cohen, H. Levine, B. Stark, Z. Mammon, M. Dzaldetti, G. Rechavi, F. Simoni, y N. Katzir. 1987. Undifferentiated leukemia of infancy with t(11:17) chromosomal rearrangement. Coexpressing myeloid and B cell restricted antigens. *Cancer* 59:1143.

Upton, C., J.L. Macen, M. Schreiber, y G. McFadden. 1991. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 184:370.

Van de Velde, H., I. Von Hoegen, W. Luo, J.R. Parnes, y K. Theilemans. 1991. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 351:662.

Vitetta, E.S., R. Fernandez Botran, C.D. Myers, y V.M. Sanders. 1989. Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv. Immunol.* 45:1.

Wasik, M.A., R.P. Donnelly, y D.I. Beller. 1988. Lymphokine-independent induction of macrophage membrane IL-1 by autoreactive T cells recognizing either class I or class II MHC determinants. *J. Immunol.* 141:3456.

Watanabe F., R., C.I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, y S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314.

Weaver, C.T., L.M. Duncan, y E.R. Unanue. 1989. T cell induction of macrophage IL-1 during antigen presentation. Characterization of a lymphokine mediator and comparison of TH1 and TH2 subsets. *J. Immunol.* 142:3469.

Weigert, M.G., I.M. Cesari, S.J. Yonkovich, y M. Cohn. 1970. Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 228:1045.

Whalen, B.J., H.P. Tony, y D.C. Parker. 1988. Characterization of the effector mechanism of help for antigen-presenting and bystander resting B cell growth mediated by Ia-restricted Th2 helper T cell lines. *J. Immunol.* 141:2230.

White, R.A., Mason, D.W. Mason, A.F. Williams, G. Galfre, y C. Milstein. 1978. T-lymphocyte heterogeneity in the rat: separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 148:664.

Yellin, M.J., J.J. Lee, L. Chess, y S. Lederman. 1991. A human CD4⁺ leukemic subclone with contact dependent helper function. *J. Immunol.* 147:3389.

Yamada, H., P.J. Martin, M.A. Bean, M.P. Braun, P.G. Beatty, K. Sadamoto, y J.A. Hansen. 1985. Monoclonal antibody 9.3 and anti-CD11 antibodies define reciprocal subsets of lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 15:1164.

Yonehara, S., A. Ishii, y M. Yonehara. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169:1747.

Zimecki, M., Z. Wiczorek, J.A. Kapp, y C.W. Pierce. 1988. Secretion of interleukin 1 (IL-1) by peritoneal macrophages upon contact with syngeneic T cells is Ia-restricted and antigen-independent process. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 36:661.

Zimecki, M., Z. Wiczorek, J.A. Kapp, y C.W. Pierce. 1989. Structures on T cells and macrophages involved in interleukin 1 (IL-1) secretion by macrophages upon contact syngeneic thymocytes. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 37:587.

Zinkernagel, R.M. 1976. T helpers may be sensitized by antigen-specifically altered structures, which are coded by the I region of the H-2 gene complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 66:527.

Zinkernagel, R.M., G.N. Callahan, A. Althage, S. Cooper, J. W. Streilein, y J. Klein. 1978. The lymphoreticular system in triggering virus plus self-specific cytotoxic T cells: evidence for T help. *J. Exp. Med.* 147:897.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente y forma un complejo con la proteína 5c8 localizada en la superficie de células T activadas, inhibiendo de ese modo la activación por células T de células B, siendo la proteína 5c8 una proteína a la que se une específicamente el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC HB 10916.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en el que dicha célula T activada es una célula T CD4⁺ que tiene función de célula T cooperadora.
3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde dichas células B son células B en reposo.
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, donde dichas células B son células B sensibilizadas.
- 15 5. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho anticuerpo monoclonal se une específicamente al epítipo al cual se une específicamente el anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC ATCC HB 10916.
- 20 6. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino.
7. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humano.
- 25 8. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal quimérico.
9. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 30 10. El anticuerpo monoclonal 5c8 producido por el hibridoma con el N° de Registro de la ATCC N° HB 10916.
11. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho anticuerpo monoclonal se conjuga con un agente terapéutico.
- 35 12. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 11, donde dicho agente terapéutico es un radioisótopo, toxina, toxoide o agente quimioterapéutico.
13. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho anticuerpo monoclonal se marca con un marcador detectable.
- 40 14. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 13, donde dicho marcador detectable es un isótopo radiactivo, enzima, colorante o biotina.
- 45 15. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho anticuerpo monoclonal se conjuga con un agente de formación de imágenes.
16. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 15, donde dicho agente de formación de imágenes es un radioisótopo.
- 50 17. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1.
18. El hibridoma de la reivindicación 17, donde dicha célula de hibridoma produce el anticuerpo monoclonal 5c8 y tiene el N° de Registro de la ATCC ATCC HB 10916.
- 55 19. Una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20. Uso de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y de un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir la activación de las células B de un animal.
- 60 21. El uso de la reivindicación 20, donde dichas células B son células B en reposo.
- 65 22. El uso de la reivindicación 20, donde dichas células B son células B sensibilizadas.

ES 2 207 634 T5

23. Uso de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y de un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir una respuesta autoinmune en un animal que sufre una enfermedad autoinmune.

5 24. El uso de la reivindicación 23, donde dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, miastenia grave, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, diabetes mellitus o una enfermedad autoinmune inducida por fármacos.

10 25. El uso de la reivindicación 24, donde dicha enfermedad autoinmune inducida por fármacos es lupus inducido por fármacos.

15 26. Uso de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y de un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir una respuesta inmune humoral en un animal.

20 27. Uso de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y de un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir una respuesta inmune en un animal.

25 28. Uso de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y de un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir el rechazo de órganos en un animal receptor de un órgano trasplantado.

29. El uso de la reivindicación 28, donde dicho órgano trasplantado es un riñón, corazón o hígado.

30 30. Uso de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 de un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir una respuesta alérgica en un animal.

31. El uso de la reivindicación 30, donde dicha respuesta alérgica es fiebre del heno o una alergia a penicilina.

32. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, donde el animal es un mamífero.

35 33. El uso de la reivindicación 32, donde el mamífero es un ser humano.

34. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de la cadena ligera o la proteína de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

40 35. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 34, que es una molécula de ADN.

45

50

55

60

65

FIGURA 1

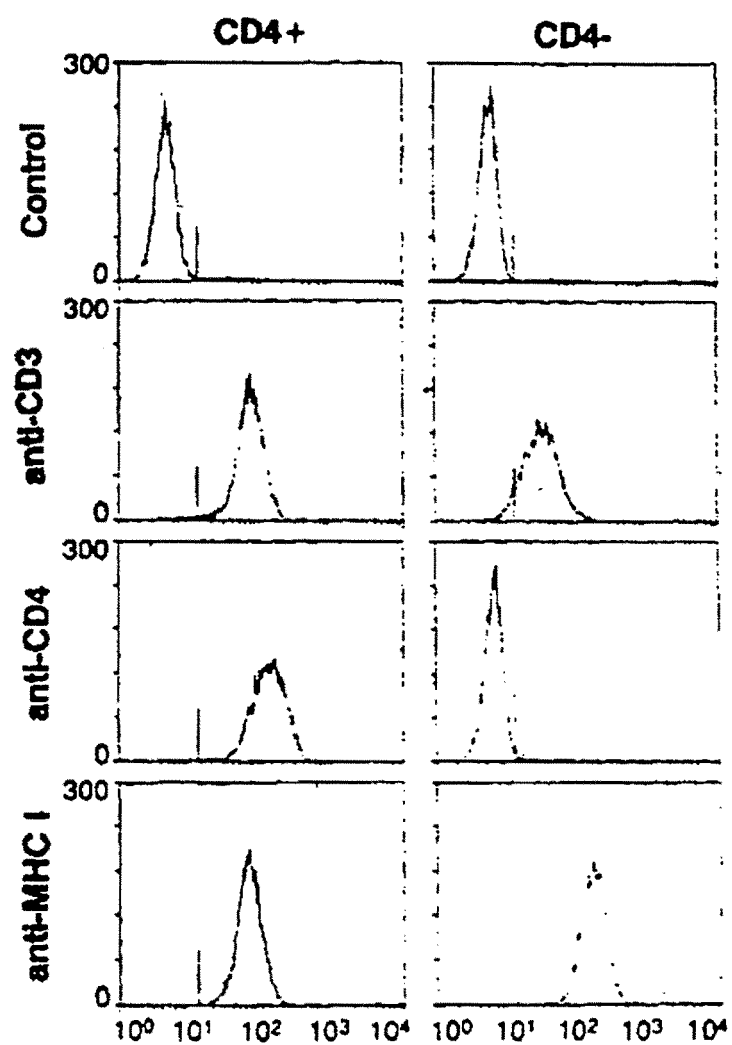
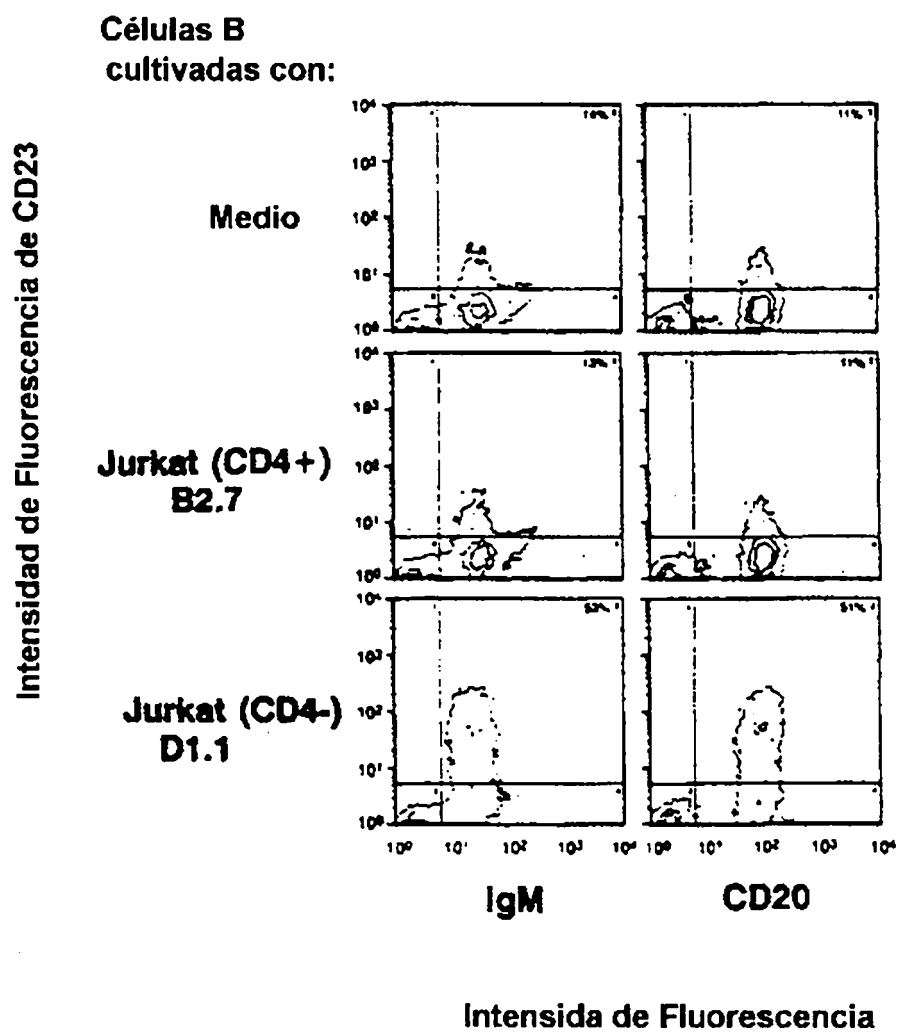


FIGURA 2



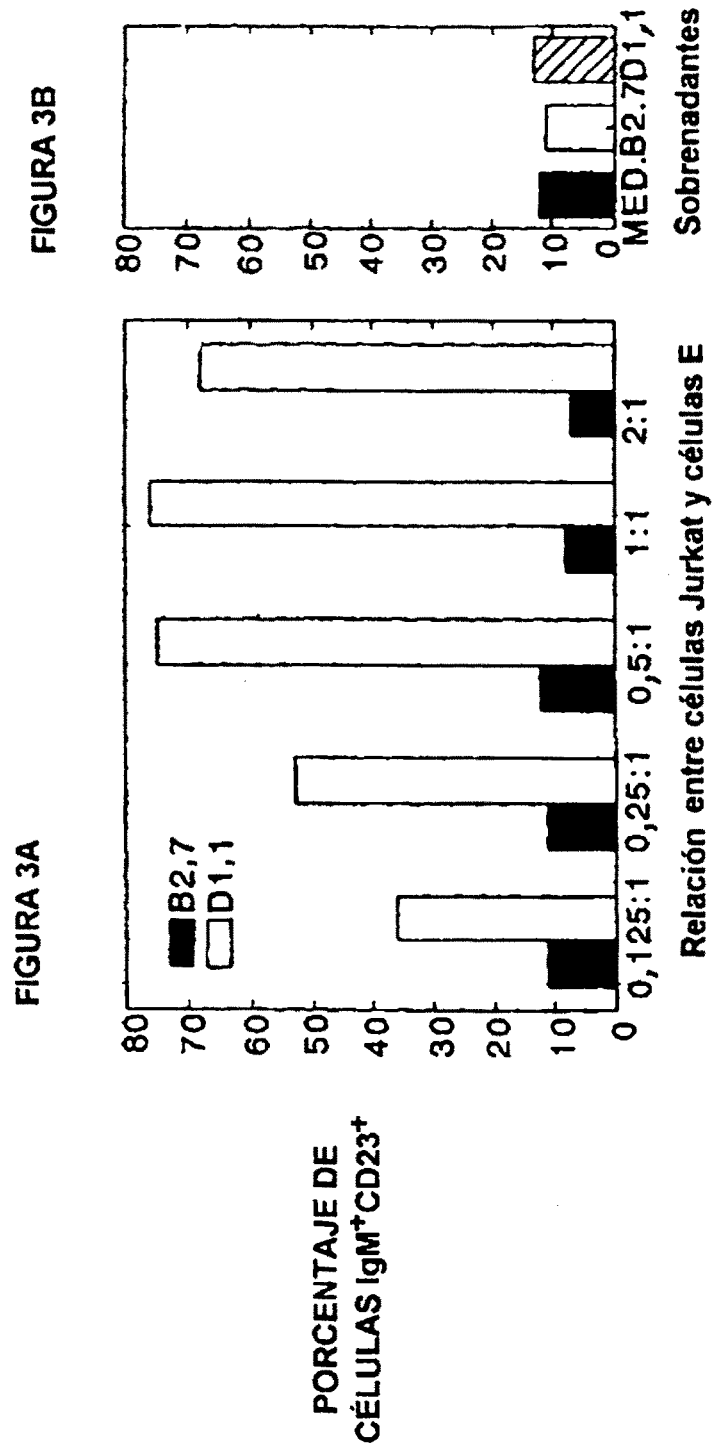


FIGURA 4B

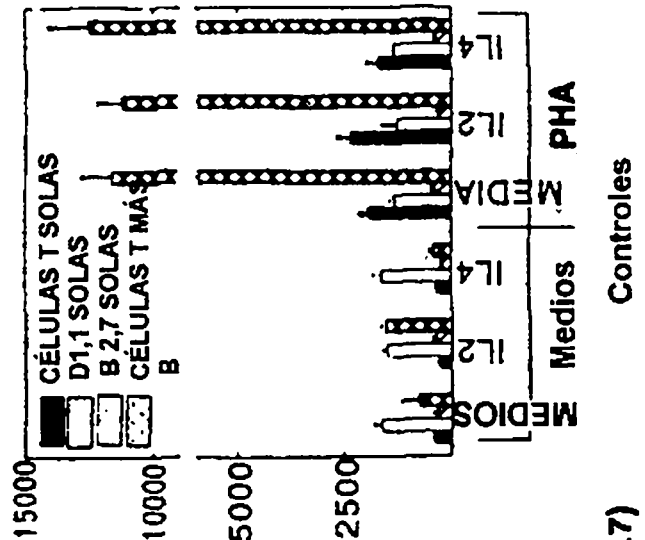
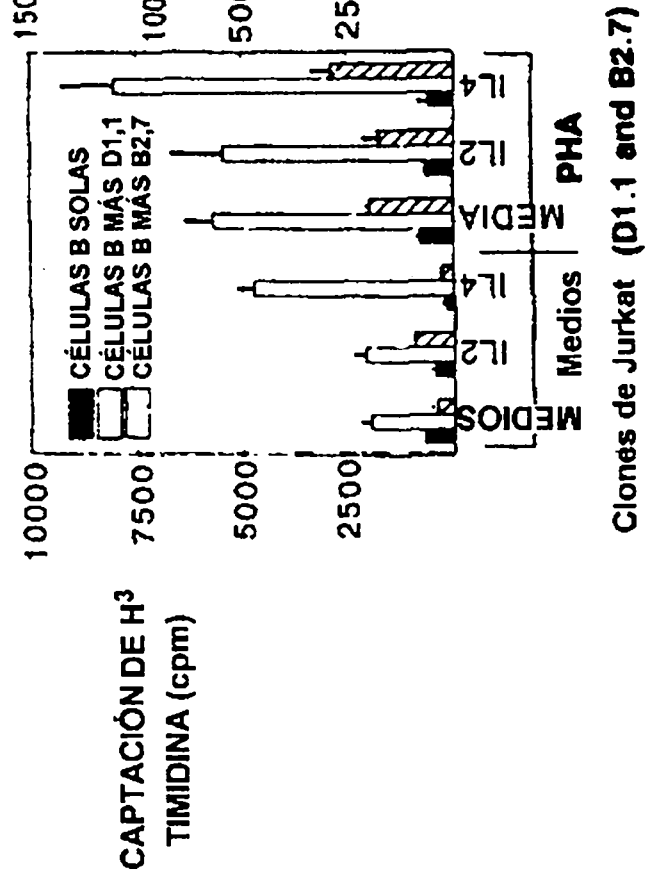


FIGURA 4A



CONCENTRACIÓN DE
IgM (ng/ml)

FIGURA 5A-1

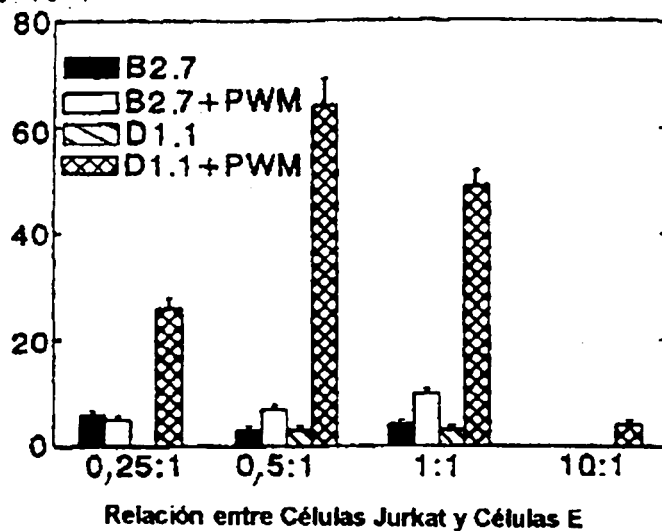
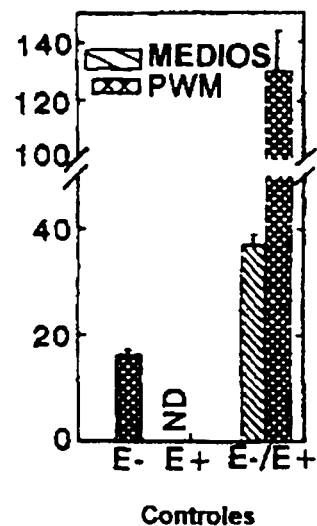


FIGURA 5A-2



PLACAS POR 10^6
CÉLULAS B ($\times 10^{-3}$)

FIGURA 5B-1

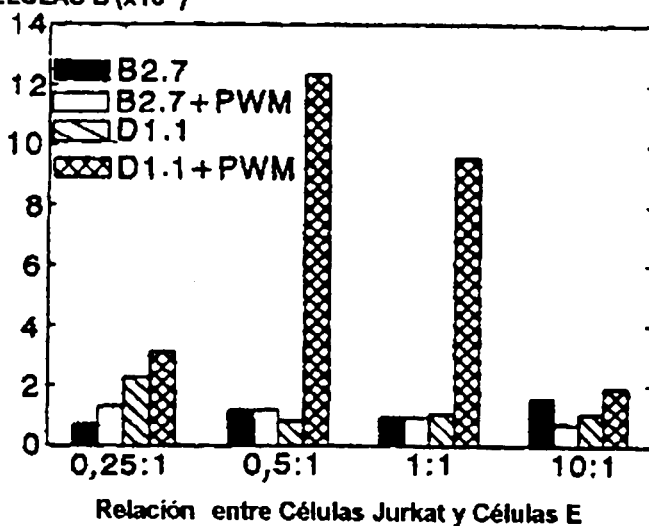


FIGURA 5B-2

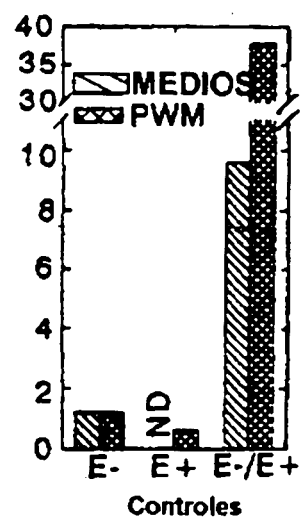


FIGURA 5C-2

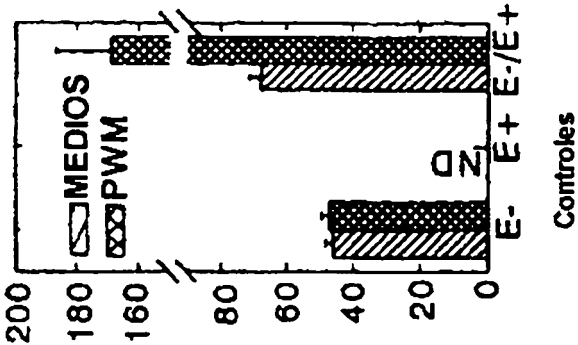
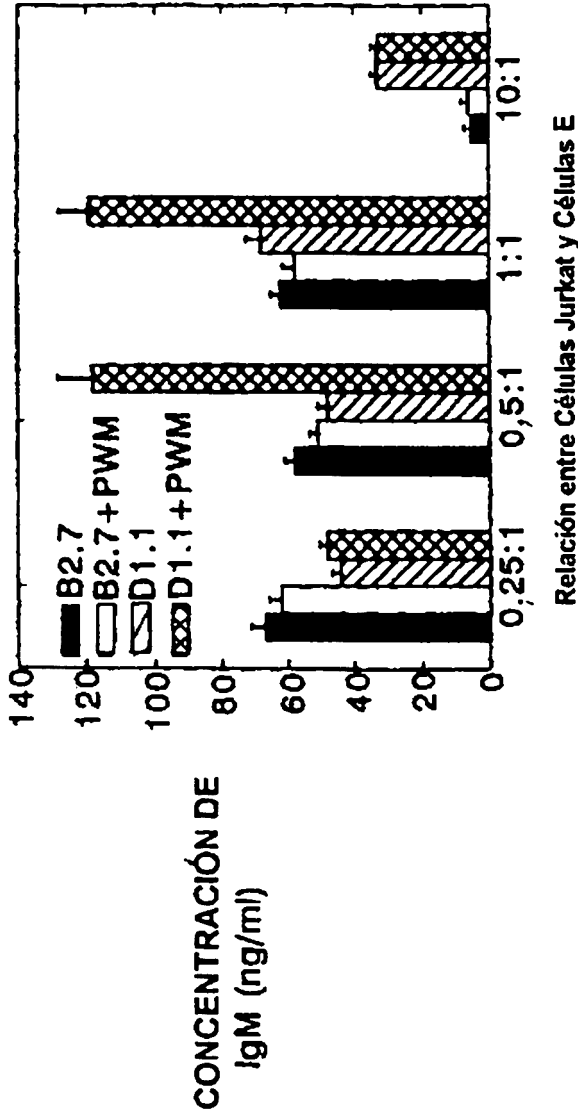


FIGURA 5C-1



CONCENTRACIÓN DE
IgM (ng/ml)

FIGURA 6

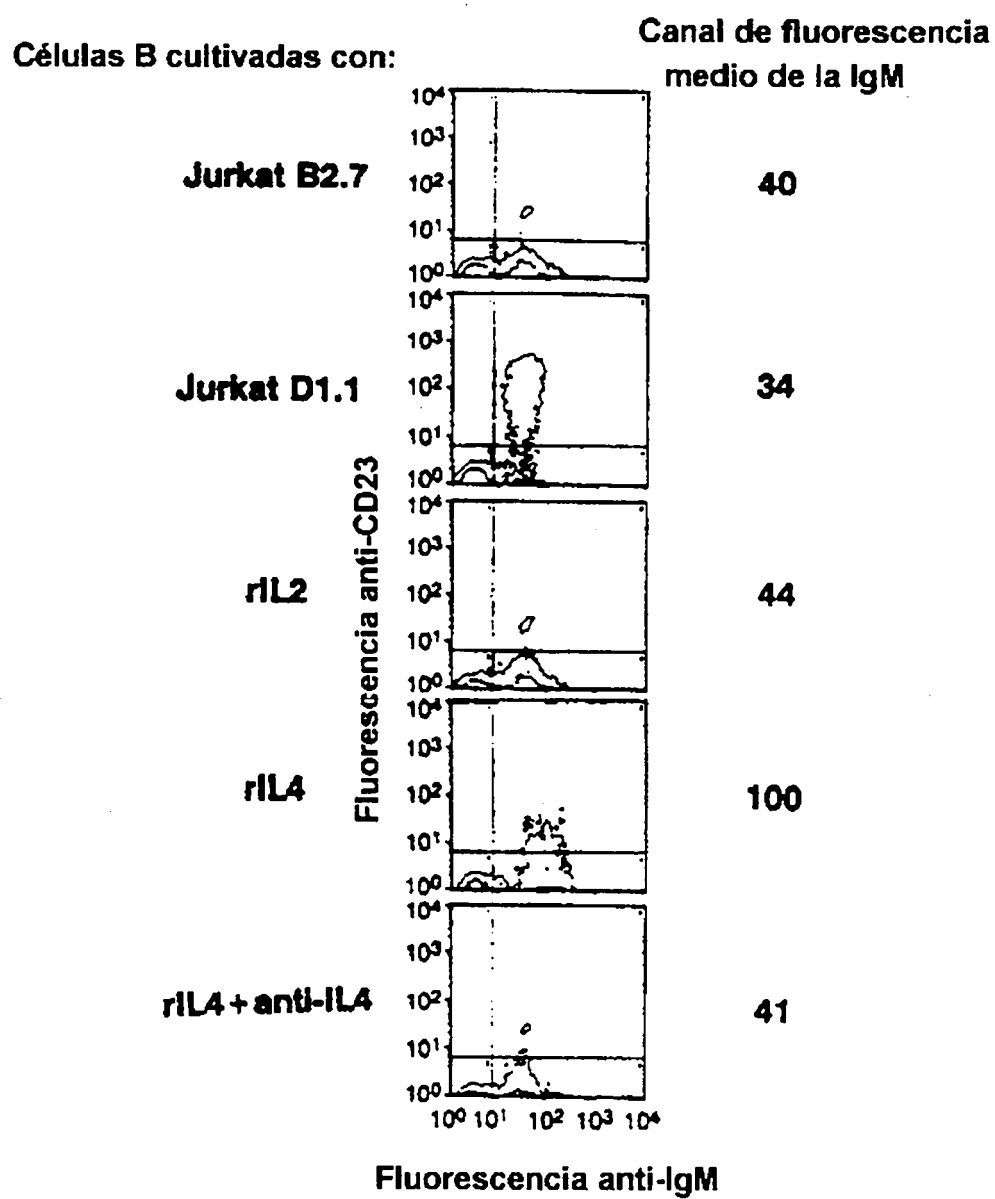


FIGURA 7

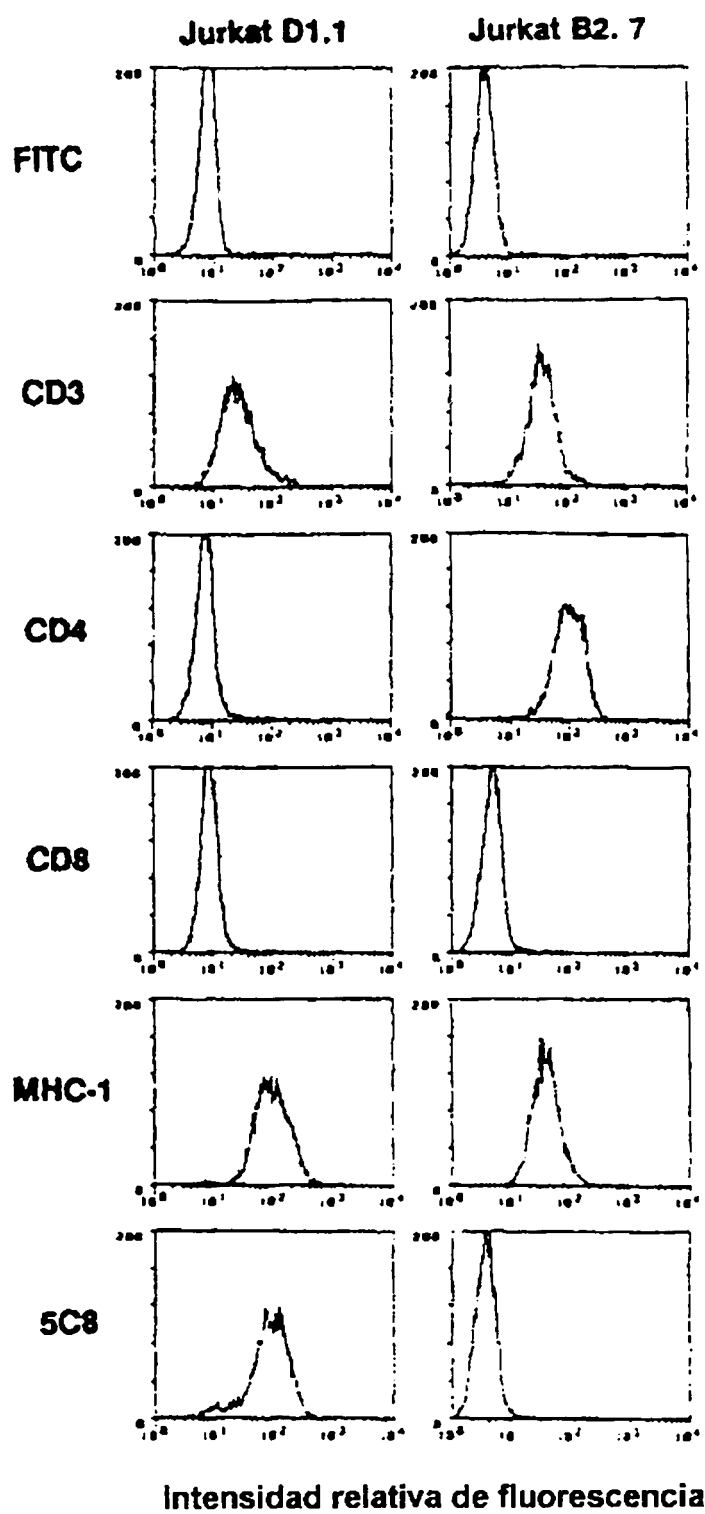
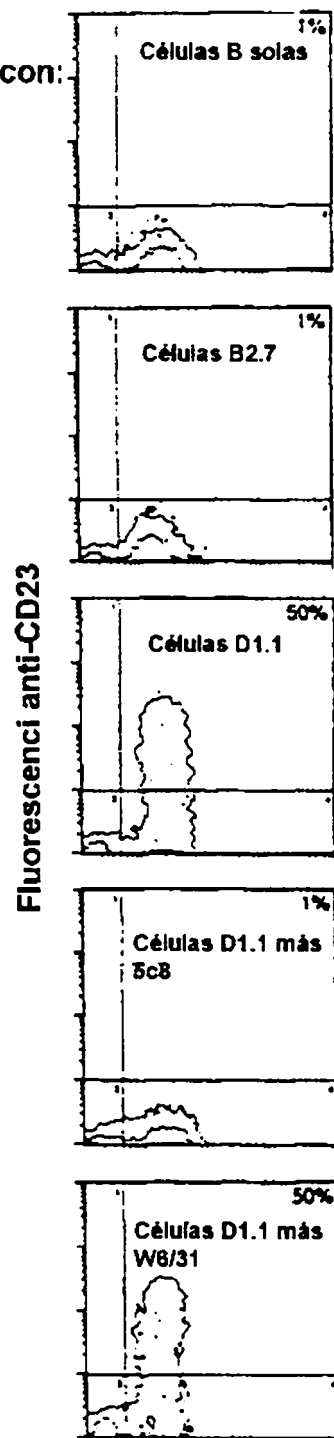


FIGURA 8

Células B
cultivadas con:



Fluorescencia anti-IgM

FIGURA 9A

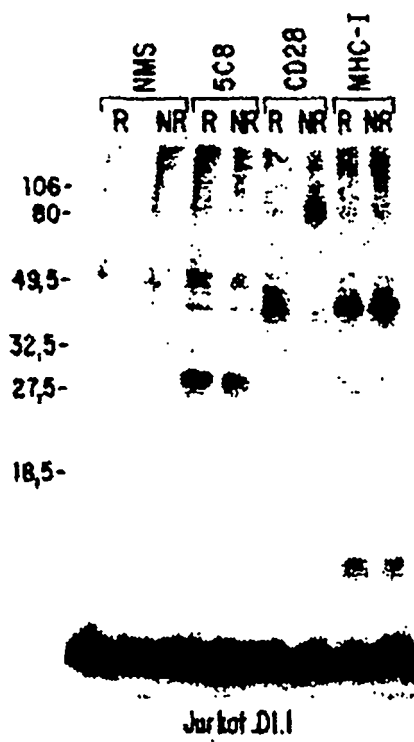
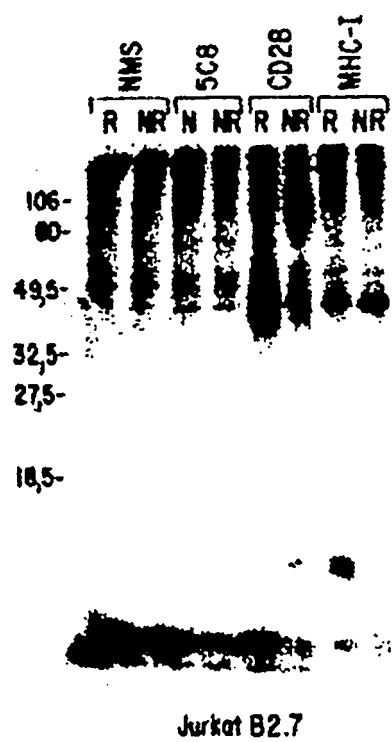


FIGURA 9B



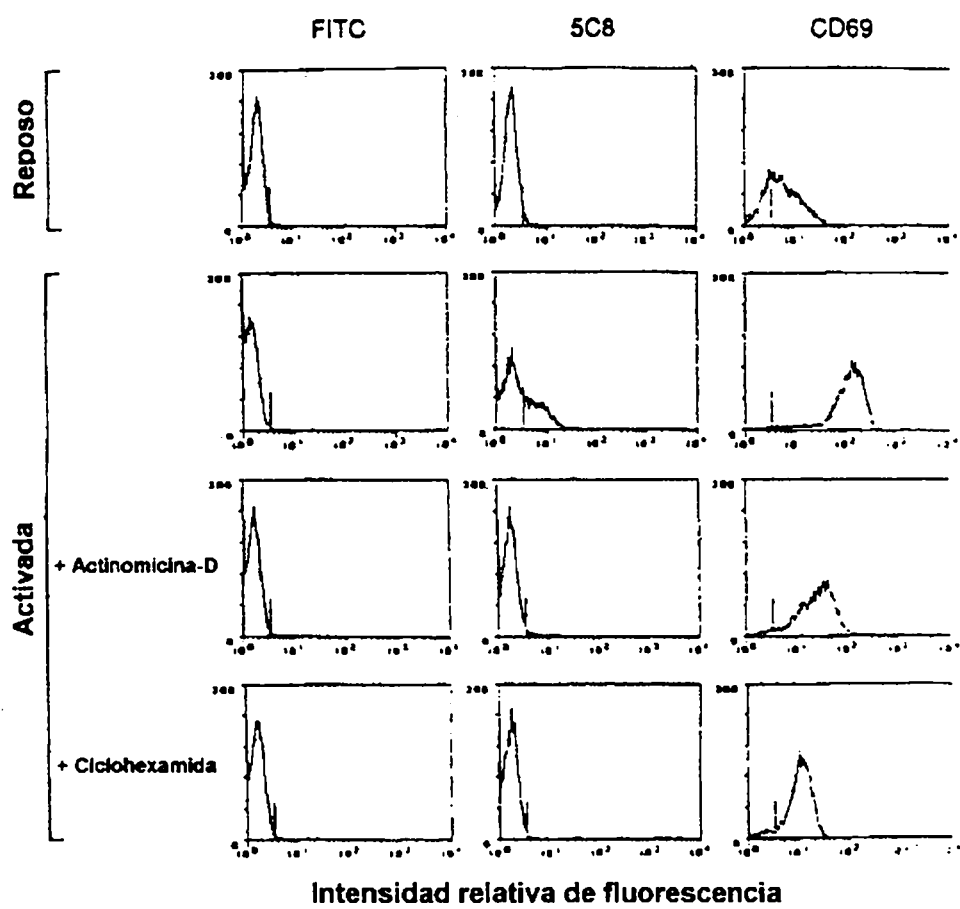


FIGURA 11

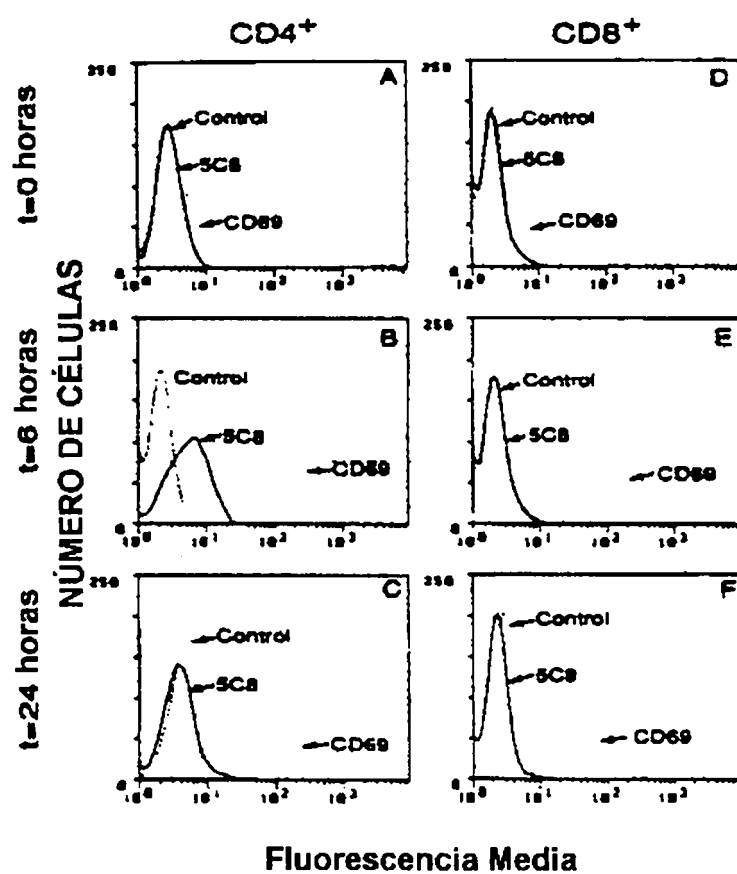


FIGURA 12

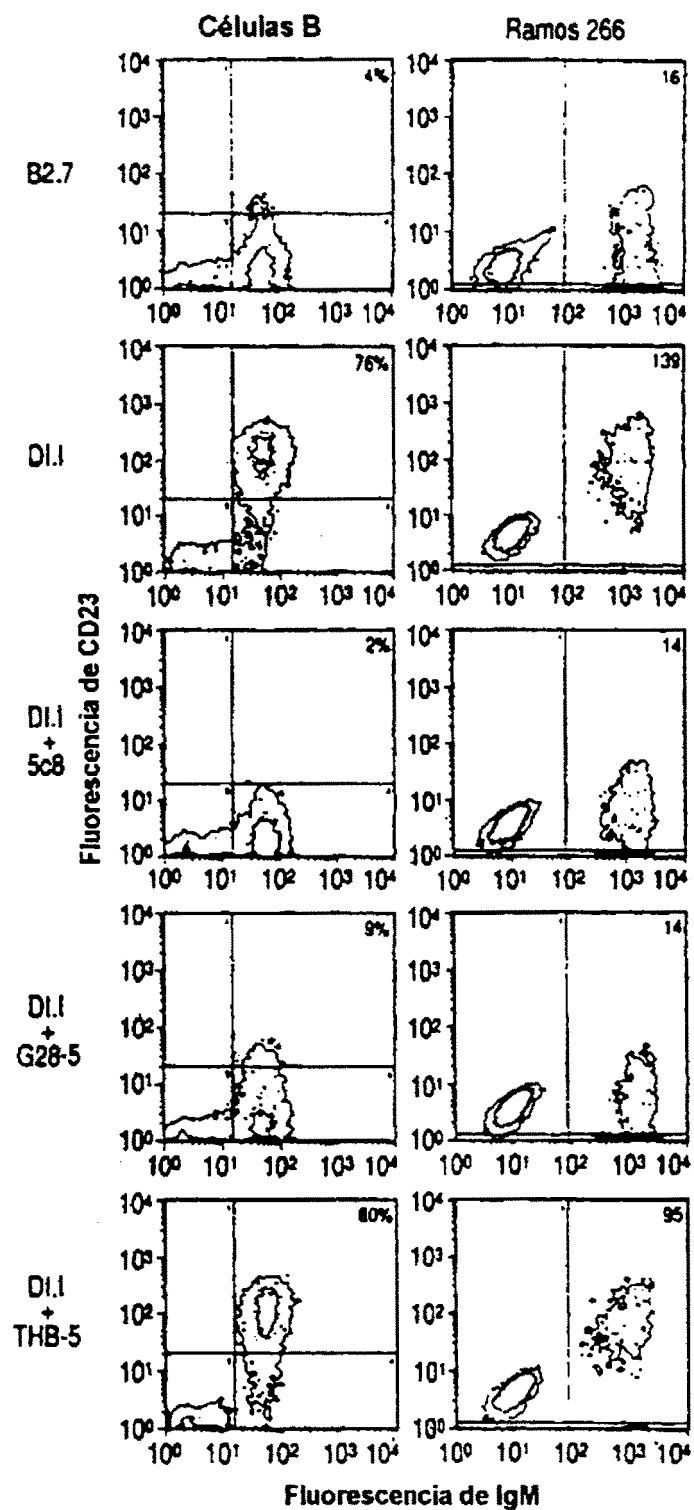


FIGURA 13

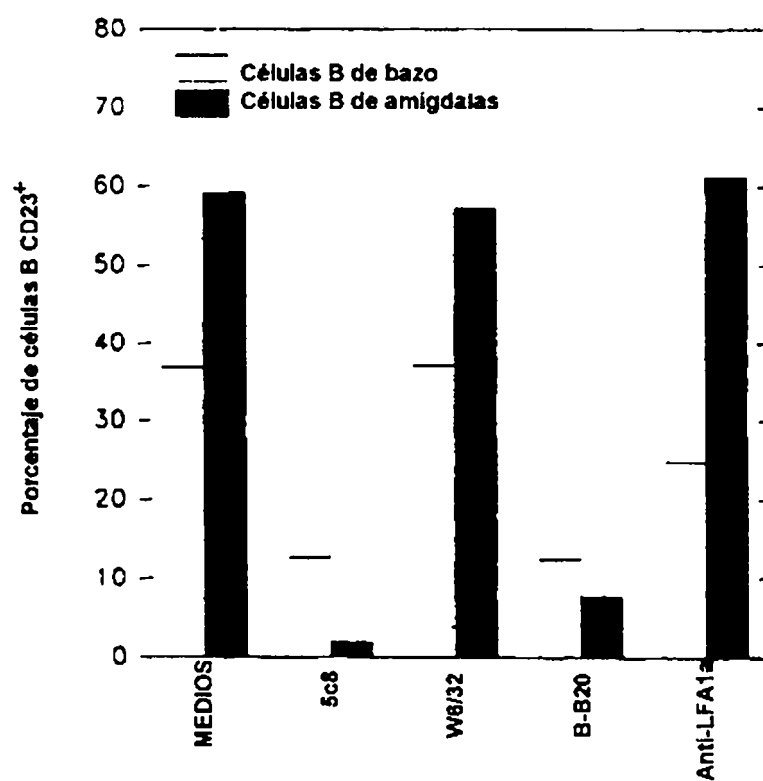


FIGURA 14A

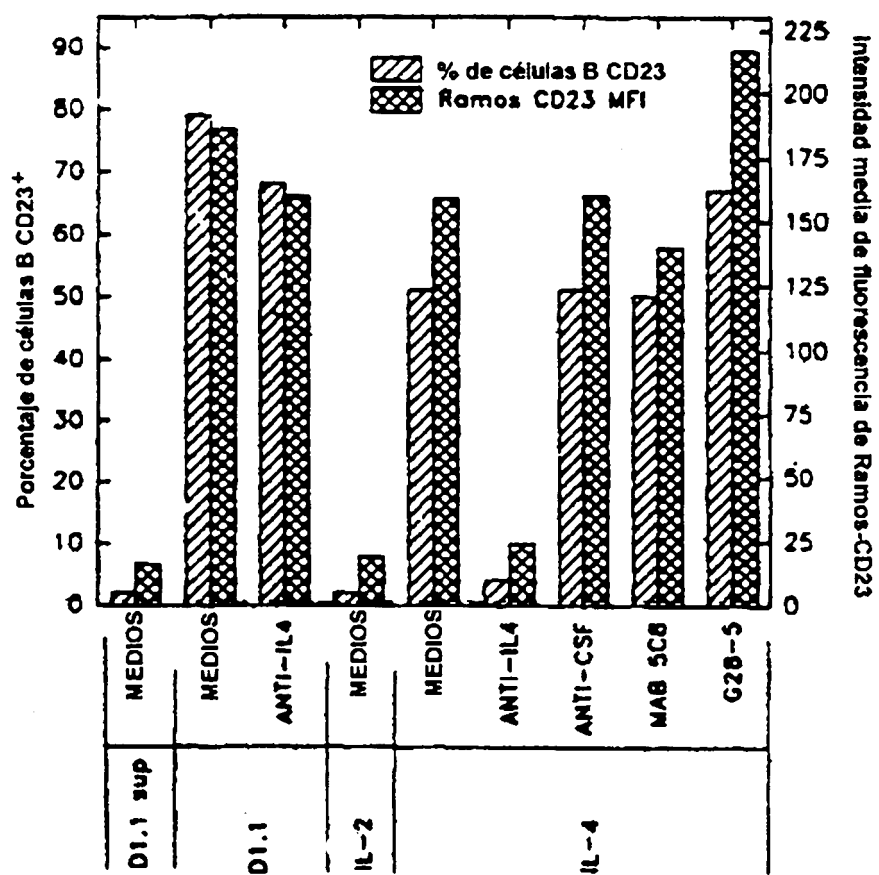


FIGURA 14B

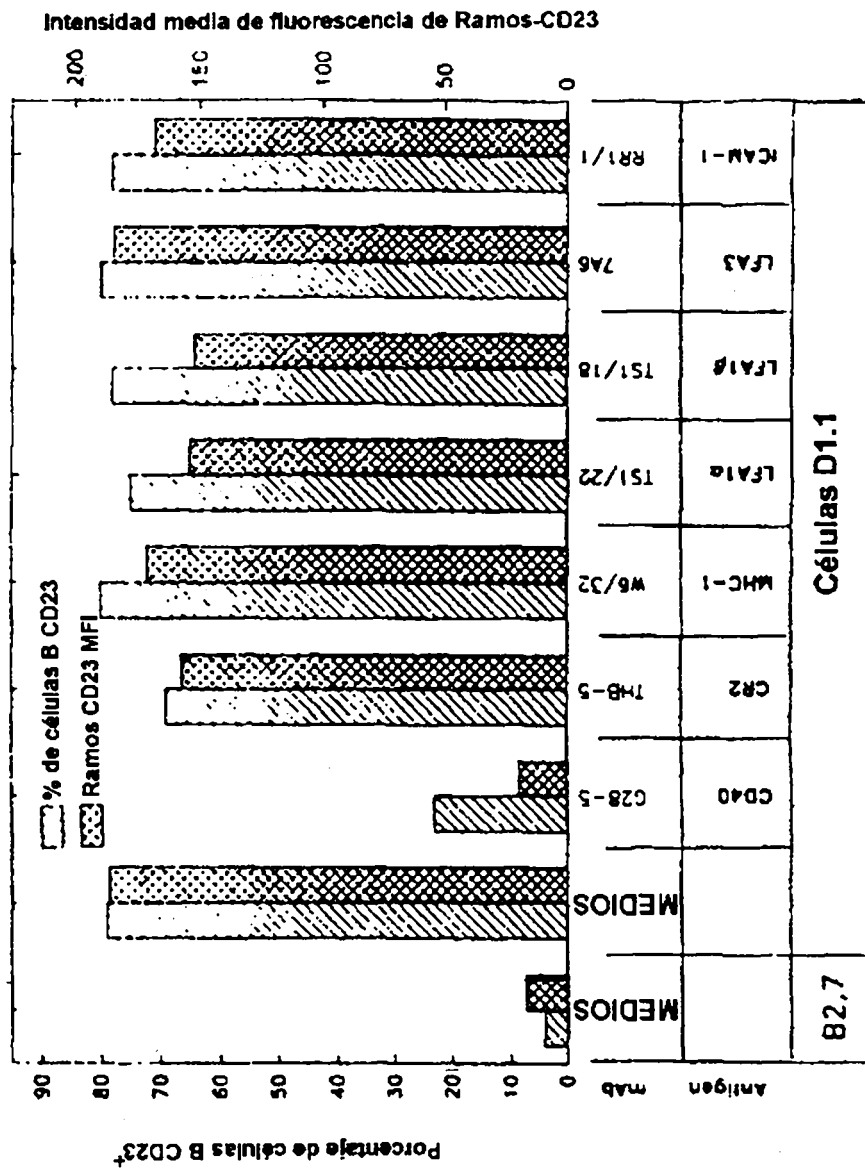


FIGURA 15

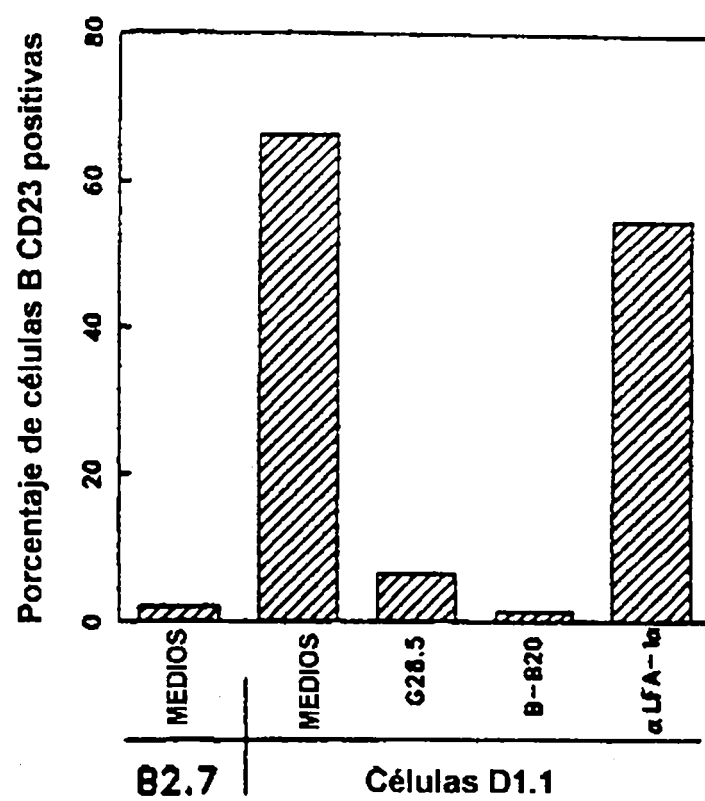


FIGURA 16A

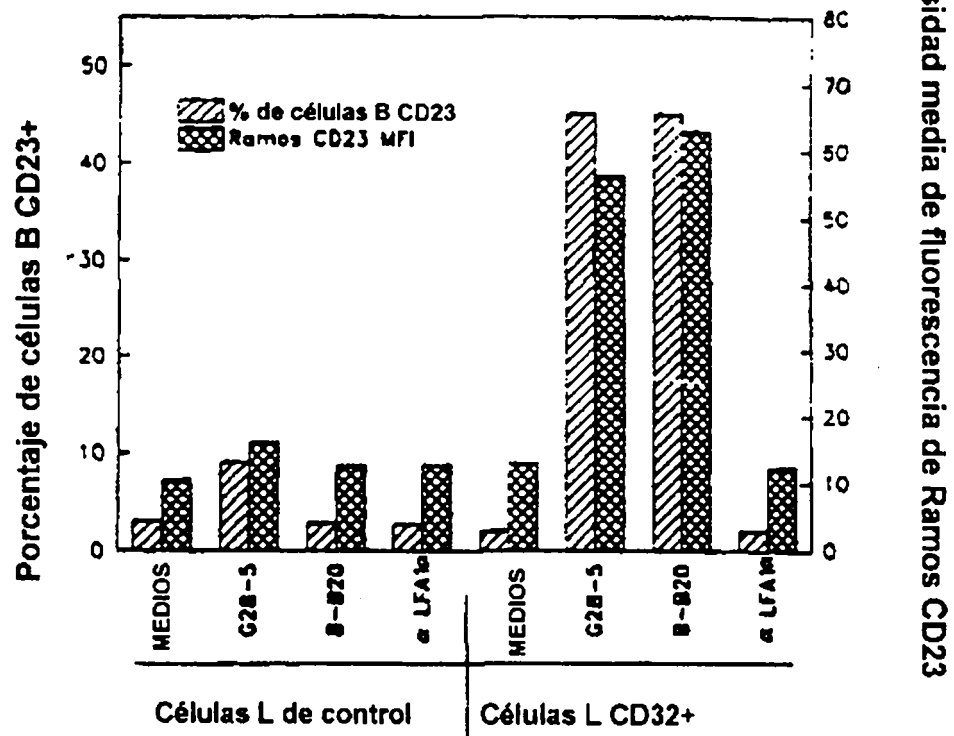


FIGURA 16B

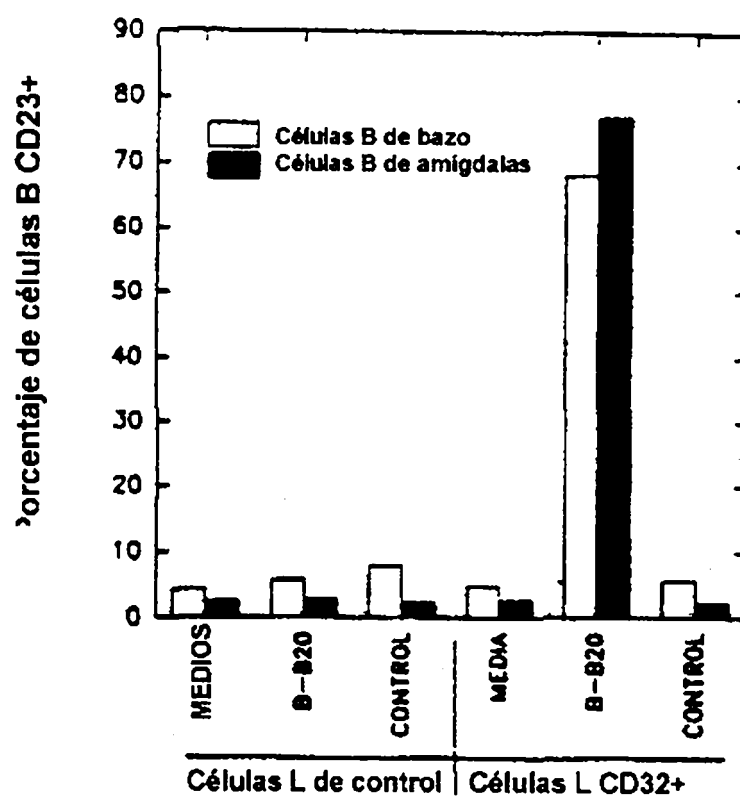


FIGURA 17A

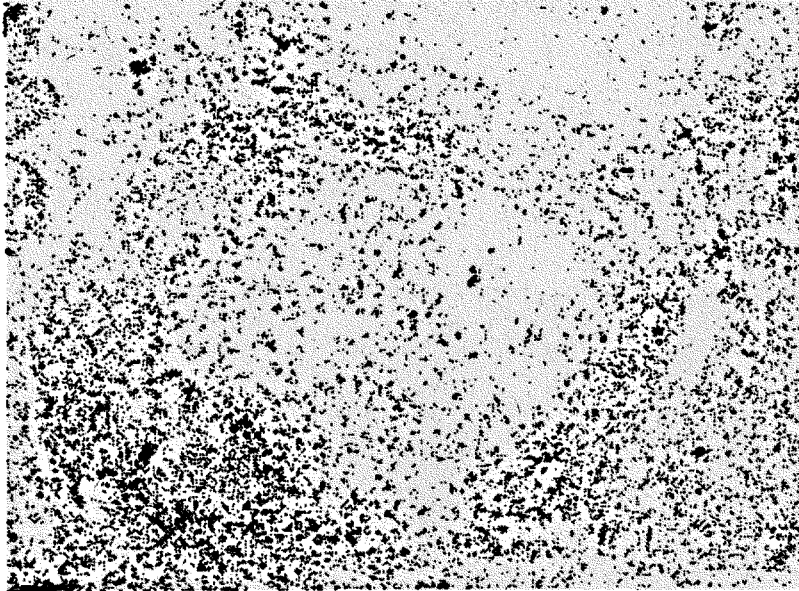


FIGURA 17B

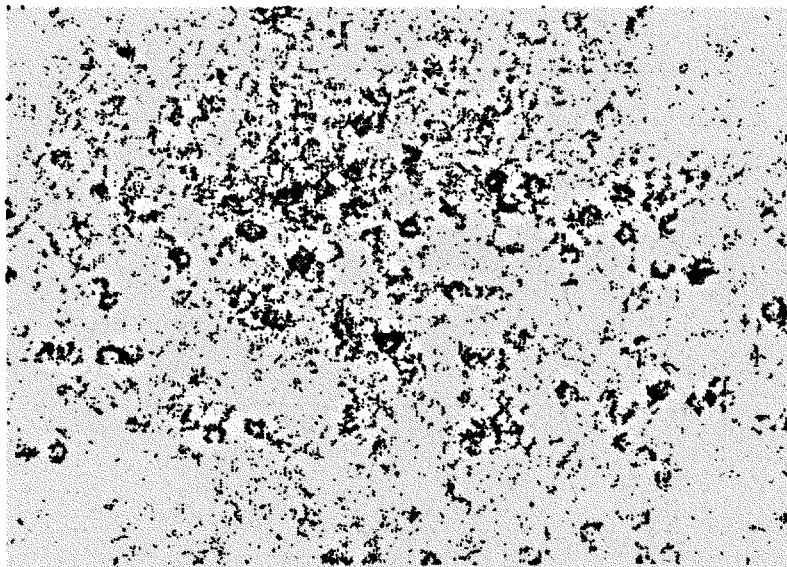


FIGURA 17C

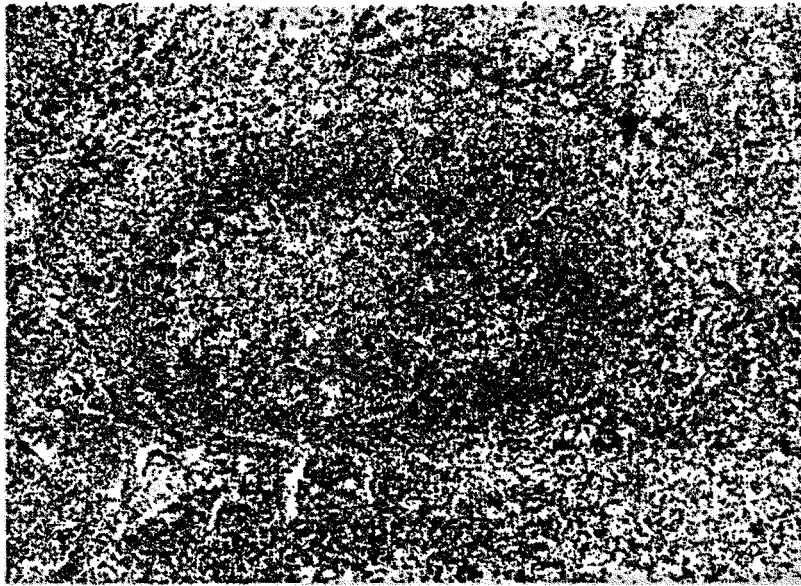


FIGURA 17D

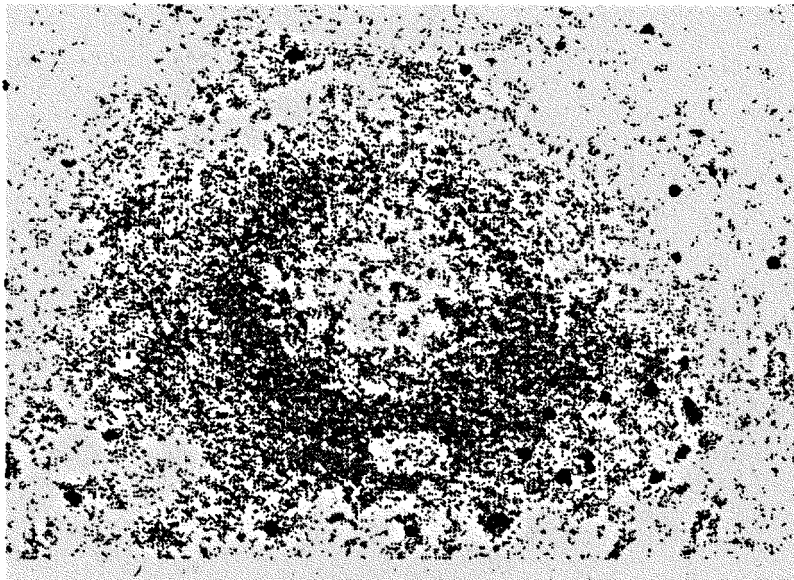


FIGURA 17E

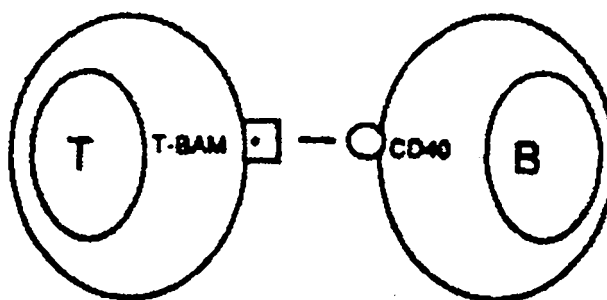


FIGURA 18

Modelos de interacciones moleculares T-B

Modelo N° 1

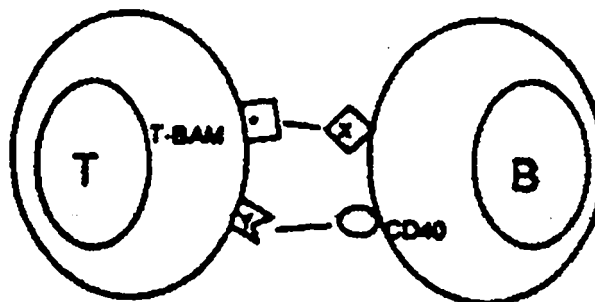
T-BAM-CD40: relación receptor-ligando



Modelo N° 2

Las interacciones entre T-BAM y CD40 con distintos ligandos son necesarias para la activación de células B

CD40 es un receptor para un ligando de célula T diferente



CD40 es un receptor para un factor soluble "autocrino" de la célula B

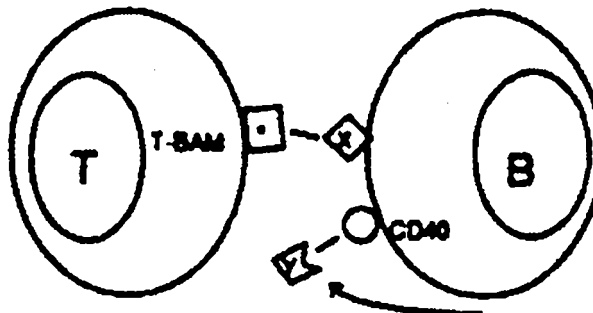


FIGURA 191

Artritis reumatoide
 α CD3 DAB a baja resolución



FIGURA 19A (CONTINUACIÓN)

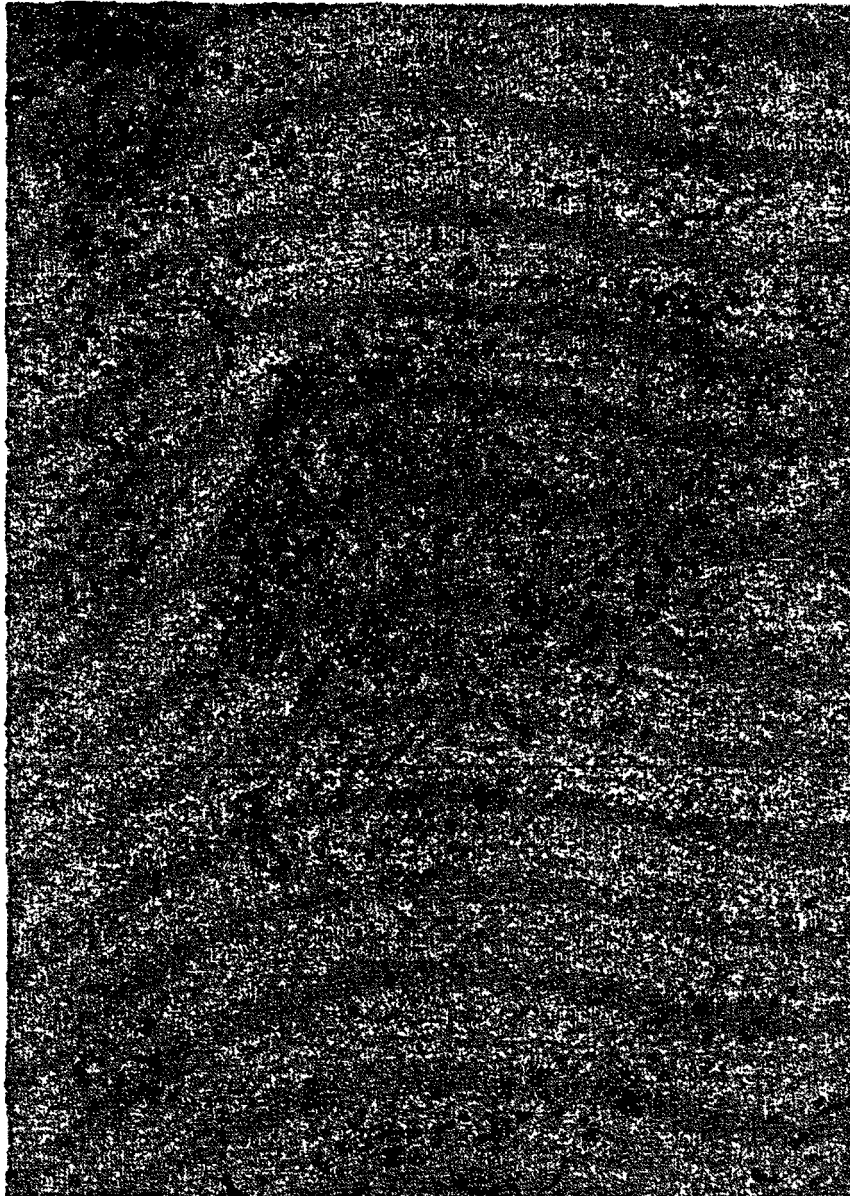


FIGURA 19B

Artritis reumatoide
 α CD3 DAB a alta resolución



FIGURA 19B (CONTINUACIÓN)



FIGURA 19C

Artritis reumatoide
anti-CD4 (azul)
anti-TBAM (marrón)



FIGURA 19C (CONTINUACIÓN)

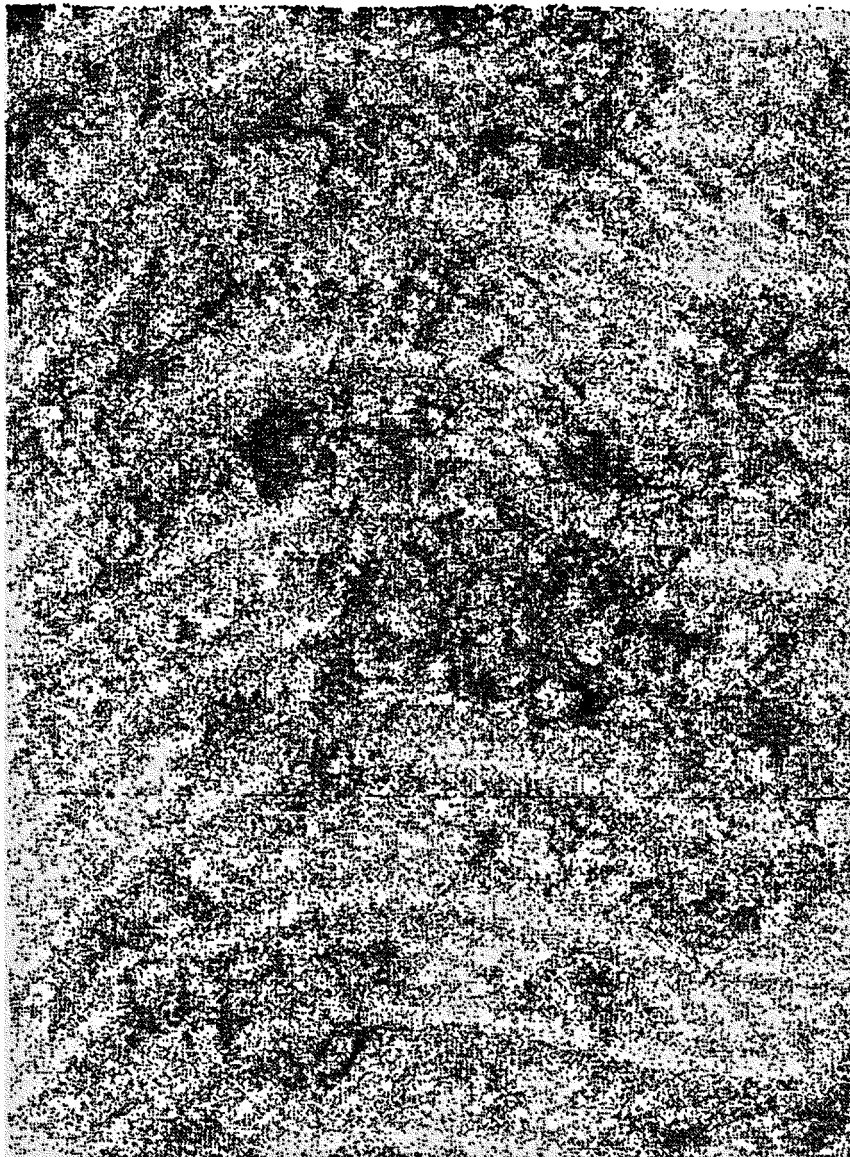


FIGURA 19D

Artritis reumatoide

anti-CD8 (azul)

antil-TBAM (marrón)

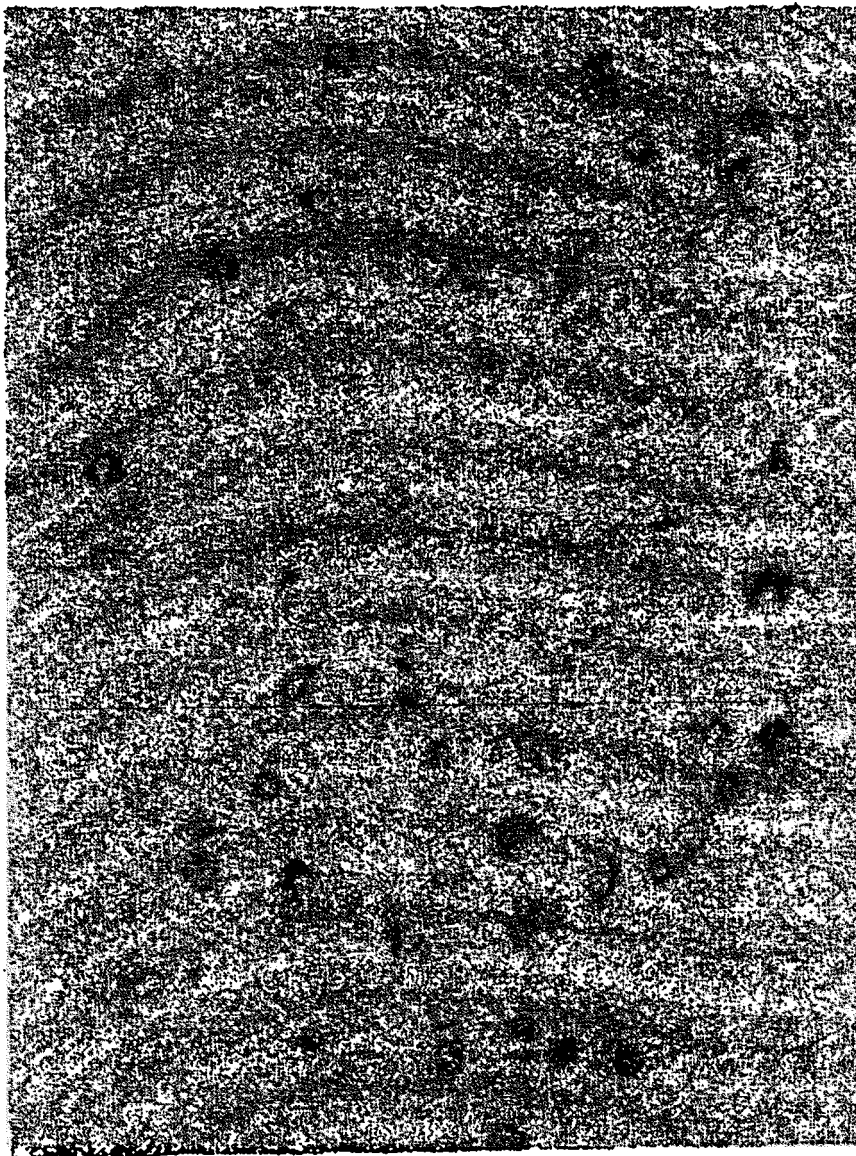


FIGURA 19D (CONTINUACIÓN)

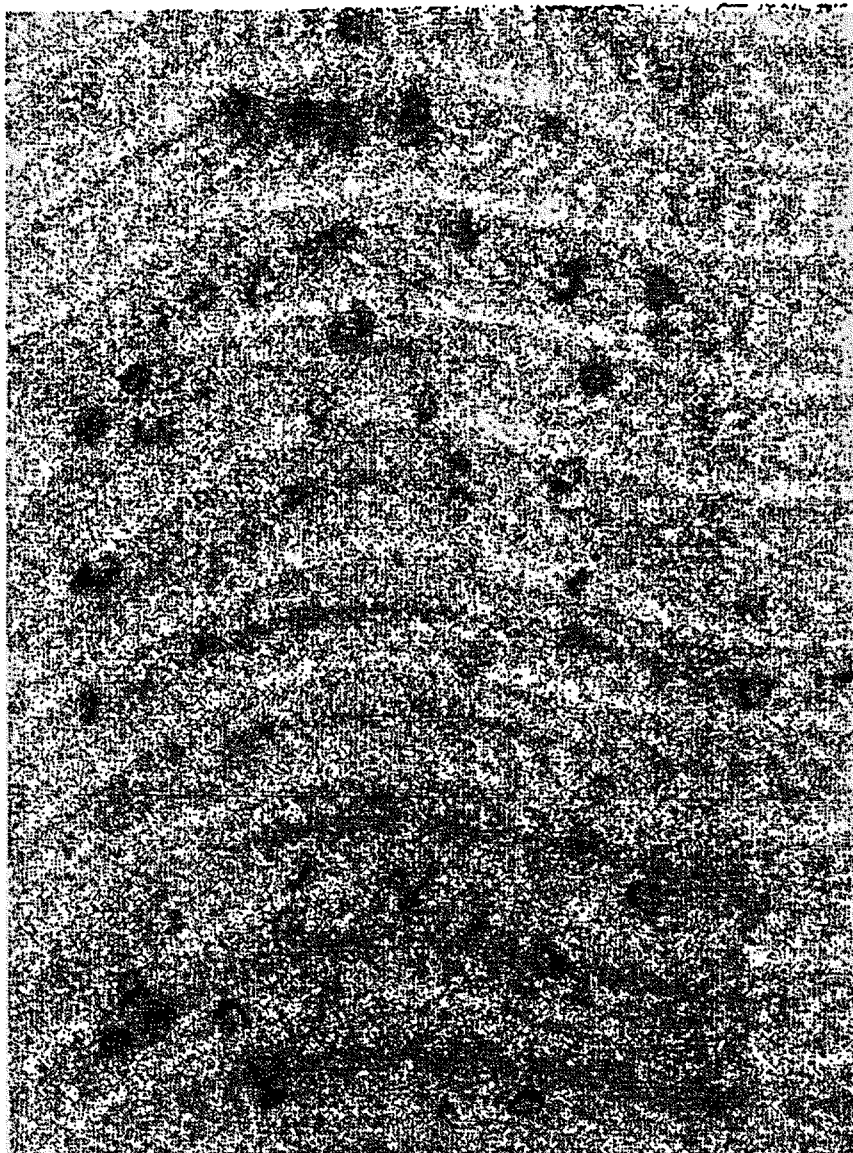


FIGURA 20A

Psoriasis-baja resolución



FIGURA 20A (CONTINUACIÓN)

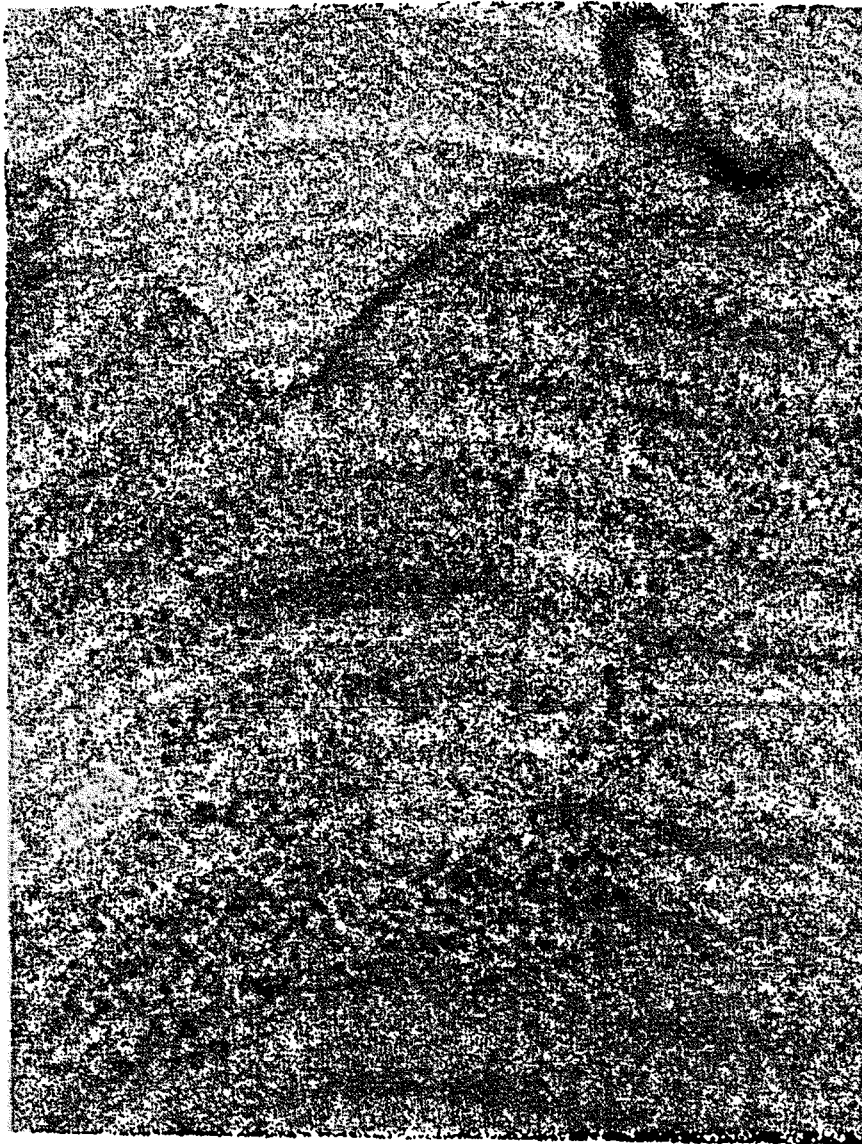


FIGURA 20B

Psoriasis-alta resolución

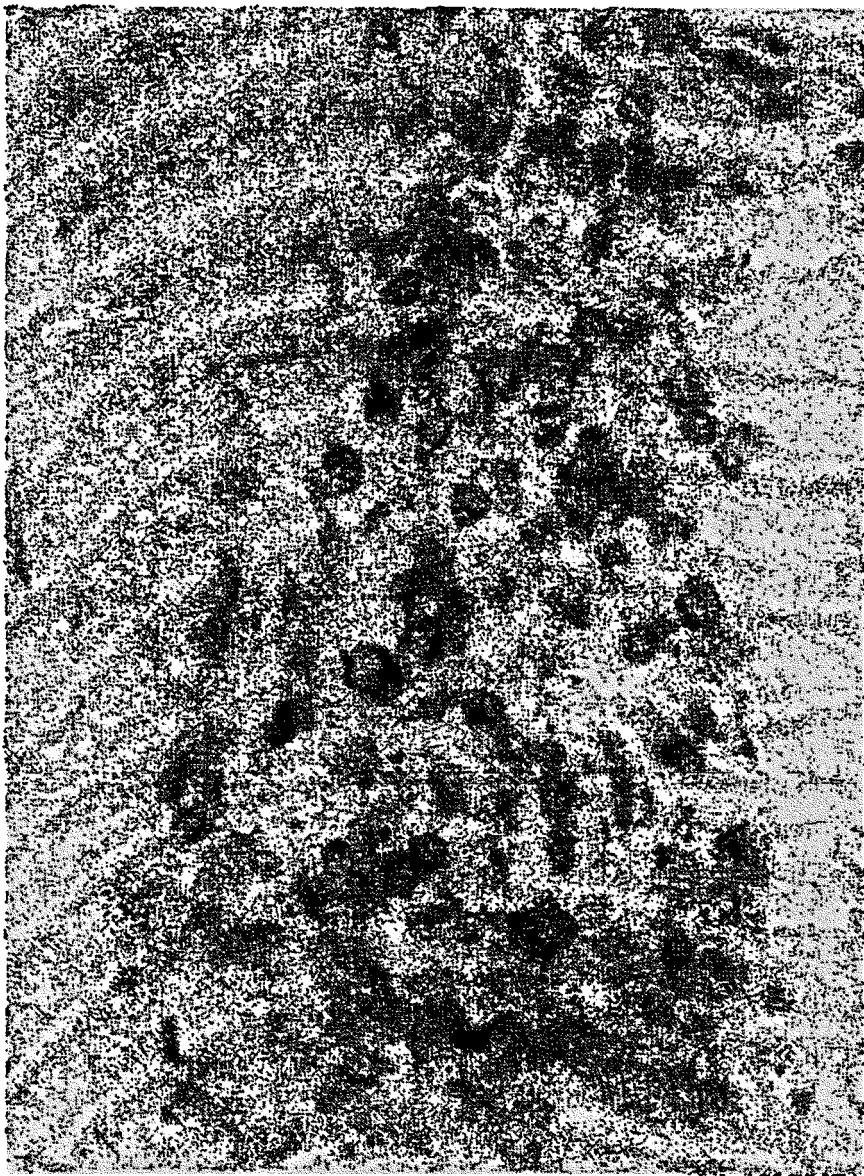
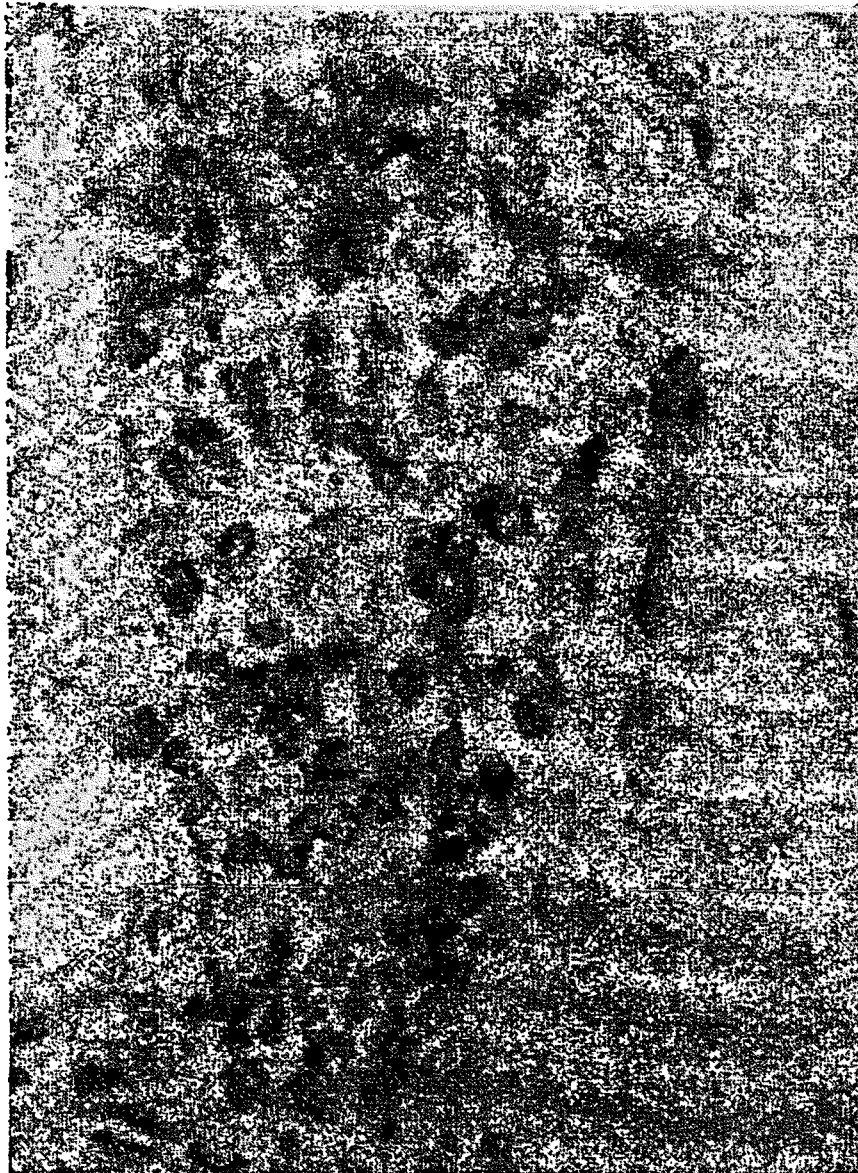


FIGURA 20B (CONTINUACIÓN)



ES 2 207 634 T5

FIGURA 21A

Linfoma no Hodgkins

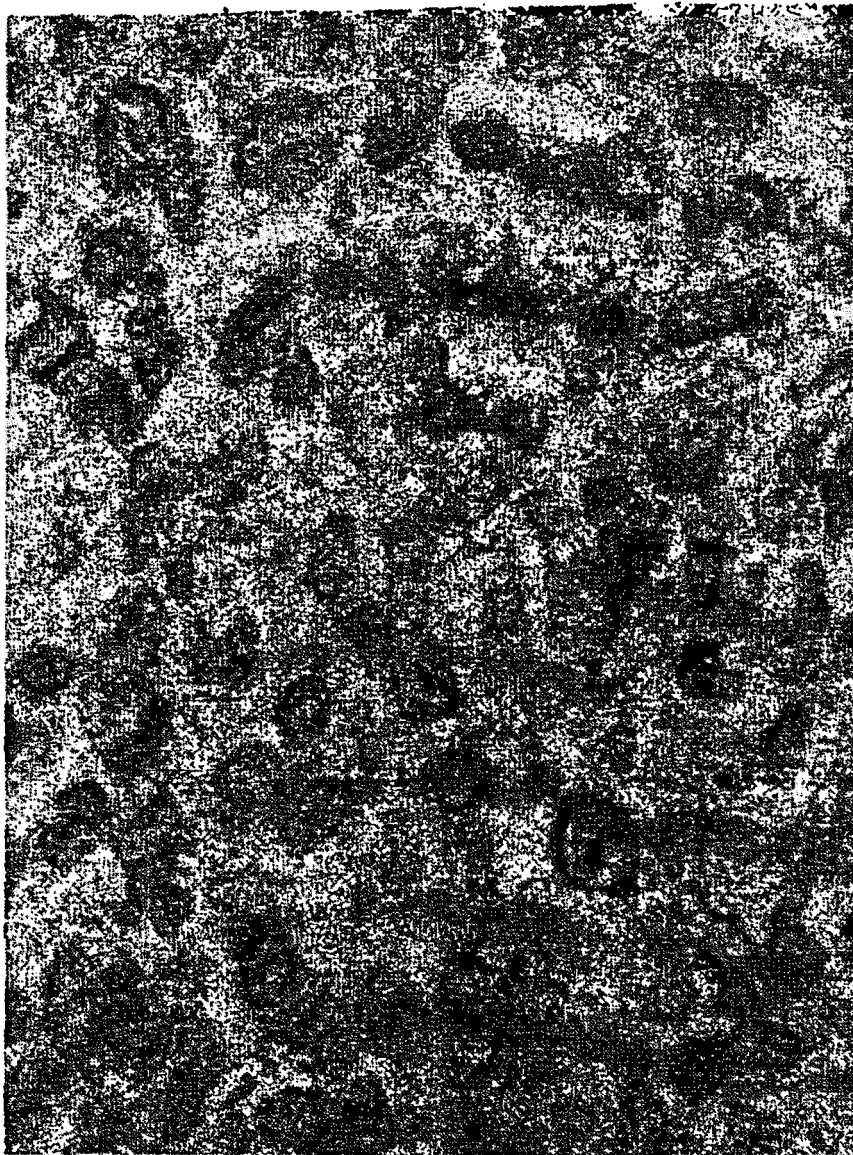


FIGURA 21A(CONTINUACIÓN)



ES 2 207 634 T5

FIGURA 21B

Linfoma no Hodgkins

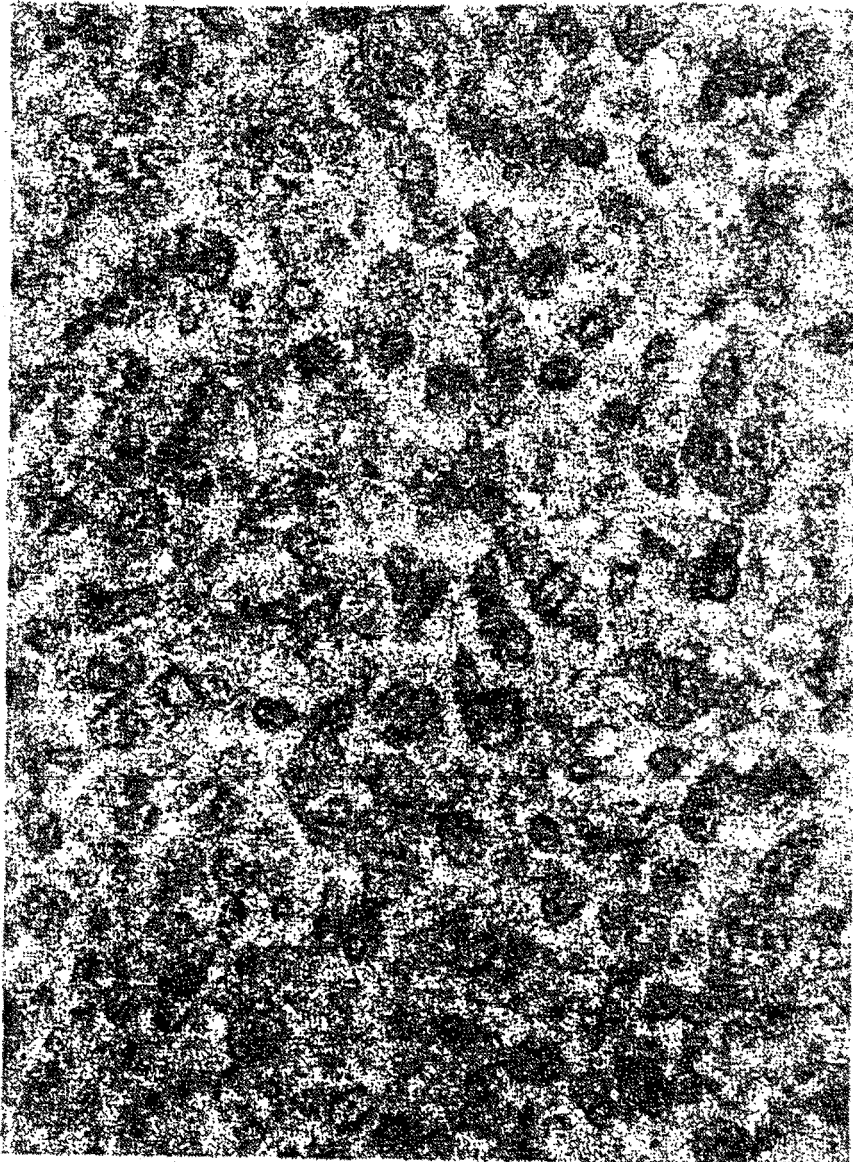
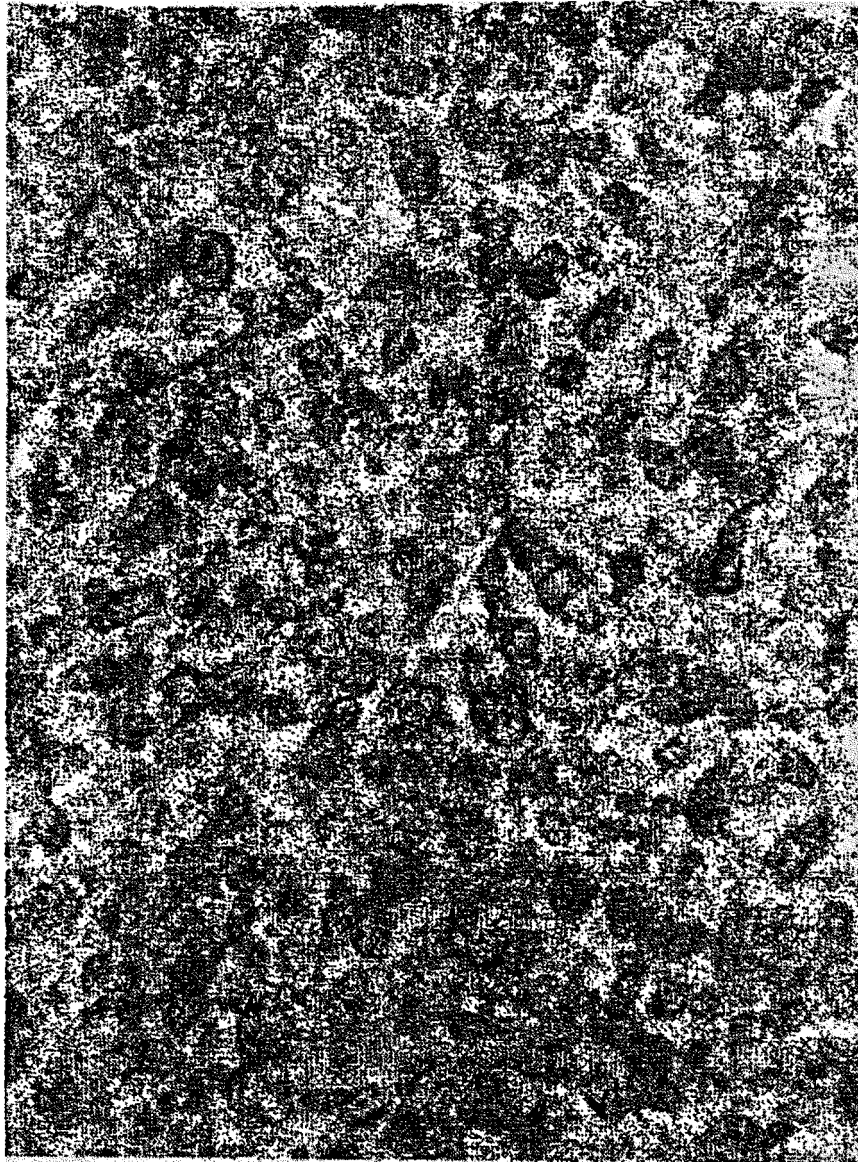


FIGURA 21B (CONTINUACIÓN)



ES 2 207 634 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Lederman, Seth
Chess, Leonard
Yellin, Michael J.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: EL ANTICUERPO MONOCLONAL MURINO (5c8) RECONOCE UNA GLICOPROTEÍNA HUMANA EN LA SUPERFICIE DE LINFOCITOS T.
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 16
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: Cooper & Dunham
(B) CALLE: 30 Rockefeller Plaza
(C) CIUDAD: Nueva York
20 (D) ESTADO: Nueva York
(E) PAÍS: Estados Unidos de América
(F) CÓDIGO POSTAL: 10112
- 25 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
(B) ORDENADOR: PC IBM compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOFTWARE: PatenIn Release N° 1.0; Versión N° 1.25
- (iv) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
35 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:
- 40 (A) NOMBRE: White, John P.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 28.678
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 0575/39757-A-PCT
- 45 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: (212) 977-9550
(B) TELEFAX: (212) 664-0525
50 (C) TELEX: 422523 COOP UI

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 17 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CADENA: sencilla
60 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 65 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 1.

ATHGARACNT AYAAYCA

17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº. 2:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 10 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 - 15 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 - (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº. 2:
 - 20 ATGATHGARA CNTAYAAYCA

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº. 3:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 30 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 - 35 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 - (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº. 3:
 - 40 TGRTTTRTANG TYTCDATCAT

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº. 4:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 50 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 - 55 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 - (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº. 4:
 - 60 GCATGATAGA AACATACAGC CAAC

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº. 5:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 pares de bases

ES 2 207 634 T5

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 5:

AACTGGACTT CCAGCGAGCA T

21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 6:

GGATCCTCAT CACCTCTTTG C

21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 7:

ACAACGTGTG CTGCAATTTG AGG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

ES 2 207 634 T5

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 8:

5 TGACACCAGA CCAACTGGTA ATGG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 9:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

20 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 9:

25 Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Gln Ser Pro Pro Xaa Ala Ala Ser
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 10:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

35 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

40 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 10:

45 Met Ile Glu Thr Tyr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 11:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

55 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

60 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 11:

65 Xaa Ile Glu Xaa Tyr Asn Gln Xaa Ser Pro
1 5 10

ES 2 207 634 T5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº. 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº. 12:

CTTTCAGTCA GC

12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº. 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 325 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº. 13:

TGGACTTOCA	GOGAGCATGA	AGATTTTTAT	GTATTTACTT	ACTGTTTTCC	TTATCACCCA	60
AATGATTGGA	TCTGTGCTTT	TTGCTGTGTA	TCITCATAGA	AGATTGGATA	AGGTCGAAGA	120
GGAAGTAAAC	CTTCATGAAG	ATTTTGTATT	CATAAAAAAG	CTAAAGAGAT	GCAACAAAGG	180
AGAAAGATCT	TTATCCTTGC	TGAACTGTGA	GGAGATGAGA	AGGCAATTTC	AAGACCTTGT	240
CAAGGATATA	ACGTTAAACA	AAGAAGAGAA	AAAAGAAAAC	AGCTTTGAAA	TGCAAGAGAG	300
TGATGAGGAT	CCTCAAATTG	CAGCA				325

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº. 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 342 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº. 14:

ES 2 207 634 T5

	TGGACTTCCA ACOGANTTGG GAAAAATTTT ATTGTATTTA CTTTCCTTGT TTTTCTTATC	60
	CACCCCAAGA TGATTGGGTC AAGCACTTTT TNCGTGTAT CTTATAAGA AOGGTTGGAC	120
5	AAGATAGAAG ATGAAAGGAA TCTTCATTGA AGATTTTCTA TTCATGAAAA CGATACAGAG	180
	ATGCAACACA GGAGAAAGAT CCCTTATCCT TACTGAACTG TGAGGAGATT AAAAGCCAGT	240
	TTGAAGGCTT TGTGAAGGAT ATAATGTTAA ACAAAGAGGA GACGAAGAAA GAAAACAGCT	300
10	TTGAAATNCA AAGAGGTGAT GAGGATCCAT CGAATTCCTG CA	342

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 15:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 53 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 20 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 - 25 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 - (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 15:

30	TGCAACACAG GAGAAAGATC CTTATCCTTA CTGCAACTGT GAGGAGATTA AAA	53
----	--	----

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°. 16:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 53 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 40 (C) CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) DE MOLÉCULA: ADNc
 - 45 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 - (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°. 16:

50	TGCAACACAG GAGAAAGATC CCTTATCCTT ACTGAACTGT GAGGAGATTA AAA	53
----	--	----

55

60

65