



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 155 819**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/14 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **91901202 .1**

86 Fecha de presentación : **21.11.1990**

87 Número de publicación de la solicitud: **0526452**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.1993**

54 Título: **Inmunoglobulinas híbridas.**

30 Prioridad: **22.11.1989 US 440625**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.06.2001**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.09.2007**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.09.2007**

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
460 Point San Bruno Boulevard
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Capon, Daniel, J. y**
Lasky, Laurence, A.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 155 819 T5

DESCRIPCIÓN

Inmunoglobulinas híbridas.

5 Antecedentes de la invención

Esta invención hace referencia a receptores y moléculas de unión al ligando nuevos y a composiciones y procedimientos para mejorar la vida media en el plasma circulante de las moléculas de unión al ligando. En particular, esta invención hace referencia a las moléculas de inmunoglobulina híbridas.

Las inmunoglobulinas son moléculas que contienen cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro, teniendo de forma característica dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. En cada cadena, un dominio (V) tiene una secuencia aminoacídica variable que depende de la especificidad del anticuerpo de la molécula. Y el otro dominio (C) tiene una secuencia constante común entre las moléculas de la misma clase. La secuencia de los dominios se numera a partir del extremo aminoterminal.

La superfamilia de genes de inmunoglobulinas consiste en moléculas con dominios de tipo inmunoglobulina. Los miembros de esta familia incluyen los antígenos de histocompatibilidad principal de clase I y clase II, las inmunoglobulinas, las cadenas α , β , γ y δ del receptor de células T, CD1, CD2, CD4, CD8, CD28, las cadenas γ , δ y ϵ de CD3, OX-2, Thy-1, las moléculas de adhesión celular intercelular o neural (I-CAM o N-CAM), el antígeno-3 asociado a la función linfocítica (LFA-3), la proteína neurocitoplásmica (NCP-3), el receptor de poli-Ig, la glicoproteína asociada a mielina (MAG), el receptor de IgE de alta afinidad, la glicoproteína principal de mielina periférica (Po), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, el receptor del factor-1 estimulador de colonias, el receptor Fc de macrófagos, los receptores gamma Fc y el antígeno carcinoembrionario.

Es sabido que es posible sustituir diversos dominios variables (incluyendo las regiones hipervariables) de una inmunoglobulina por otra, y de una especie por otra. Ver, por ejemplo, las patentes europeas EP 0 173494; EP 0 1 250 23; Munro, *Nature*, 312: (13 de diciembre de 1984); Neuberger y col., *Nature*, 312: (13 de diciembre de 1984); Sharon y col., *Nature*, 309: (24 de mayo de 1984); Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y col., *Science*, 229:1202-1207 (1985); y Boulianne y col., *Nature*, 312:643-646 (13 de diciembre de 1984).

Morrison y col., *Science*, 229:1202-1207 (1985) muestran la preparación de una quimera de inmunoglobulinas que tiene una región variable de una especie fusionada con una región constante de una inmunoglobulina de otra especie. Esta referencia propone moléculas que tienen secuencias de inmunoglobulina fusionadas con secuencias que no son de inmunoglobulina (por ejemplo secuencias de enzimas de restricción), sin embargo la referencia muestra sólo dominios variables de inmunoglobulinas unidos a la secuencia que no es de inmunoglobulina. Morrison y col., patente europea EP 0 173 494 muestran una quimera similar. Mientras que el término "receptor" es utilizado por los autores y la sección de antecedentes hace referencia a "receptores como las inmunoglobulinas, enzimas y proteínas de membrana", el término "receptores de interés" incluye los receptores de células B y células T, más particularmente, las inmunoglobulinas, como IgM, IgG, IgA, IgD y IgE, así como los diversos "subtipos de los grupos individuales" (página 3, líneas 10-13). La descripción de esta referencia es específica de las quimeras de inmunoglobulinas (ver por ejemplo la página 3, líneas 21-30).

También se han producido dominios semejantes a los dominios variables de inmunoglobulina a partir de dos miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas--CD4 y del receptor de células T-- para un dominio variable en una inmunoglobulina; ver p.ej., Capon y col., *Nature*, 337:525-531, 1989, Traunecker y col., *Nature*, 339:68-70, 1989, Gascoigne y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:2936-2940, 1987, y la solicitud de patente europea EPO 0 325 224 A2.

Se sabe que un gran número de sustancias proteínicas funciona mediante su unión específica con moléculas diana. Estas moléculas diana son generalmente, aunque no es imprescindible, proteínas. Las sustancias que se unen a las moléculas diana o a los ligandos están referidas aquí como parejas de unión al ligando, e incluyen los receptores y proteínas transportadoras, así como hormonas, proteínas de adhesión celular, factores de adhesión específicos de tejido, moléculas de unión a lectinas, factores de crecimiento, enzimas, sustancias nutrientes y similares.

Los linfocitos son ejemplos de células que están dirigidas a tejidos específicos. Los linfocitos son mediadores de la inflamación de tejido normal así como de la lesión tisular patológica como ocurre en la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes. Los vertebrados han desarrollado un mecanismo para la distribución de linfocitos con especificidades antigénicas diversas por regiones espacialmente distintas del organismo (Butcher, E.C., *Curr. Top. Micro. Immunol.*, 128, 85 (1986); Gallatin, W.M., y col., *Cell* 44, 673 (1986); Woodruff, J.J., y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 201 (1987); Duijvestijn, A., y col., *Immunol. Today*, 10, 23 (1989); Yednock, T.A., y col., *Adv. Immunol.* (en publicación) (1989)).

Este mecanismo implica la recircularización continua de los linfocitos entre la sangre y los órganos linfoides. La migración de linfocitos entre la sangre, donde las células tienen el mayor grado de movilidad, y los órganos linfoides, donde los linfocitos hallan el antígeno secuestrado y procesado, se inicia mediante una interacción adhesiva entre receptores de la superficie de los linfocitos y los ligandos en las células endoteliales de vénulas postcapilarmente especializadas, p.ej., vénulas endoteliales altas (HEV) y vasos de tipo HEV inducidos en el sinovio inflamado de forma crónica.

Las moléculas de adhesión de linfocitos se han denominado específicamente receptores de localización, ya que permiten a estas células localizarse en o situarse en determinados órganos linfoides secundarios.

Se han identificado candidatos para el receptor de localización de linfocitos en el ratón, la rata y en el hombre (Gallatin, W. M., y col., *Nature*, 303, 30 (1983) Rasmussen, R.A., y col., *J. Immunol.*, 135, 19 (1985); Chin, Y. H., y col., *J. Immunol.*, 136, 2556 (1986); Jalkanen, S., y col., *Eur. J. Immunol.*, 10, 1195 (1986)). La siguiente literatura describe el trabajo realizado en esta área con la utilización de un anticuerpo monoclonal, denominado Mel 14, dirigido contra una forma murina de una proteína de superficie de linfocitos (Gallatin, W. M., y col., *supra*; Mountz, J.D., y col., *J. Immunol.*, 140, 2943 (1988); (Lewinsohn, D. M., y col., *J. Immunol.*, 138, 4313 (1987); Siegelman, M., y col., *Science*, 231, 823 (1986); St. John, T. y col., *Science*, 231, 845 (1986)).

Los experimentos de inmunoprecipitación han mostrado que este anticuerpo reconoce una proteína de superficie celular difusa de ~90.000 daltons en los linfocitos (Gallatin, W.M., y col., *supra*) y una proteína de ~100.000 daltons en neutrófilos (Lewinsohn, D.M., y col., *supra*).

Se describió por Siegelman y col. (Siegelman, M. y col., *Science*, 231, 823 (1986)) una secuencia parcial - 13 residuos - de un receptor de localización de linfocitos, la cual se identificó mediante secuenciación aminoacídica de marcaje radiactivo de una glicoproteína definida por el anticuerpo Mel 14.

Las lectinas son proteínas con un dominio de unión a carbohidratos que se han hallado en diversos animales, incluyendo los humanos así como también el percebe y el moscón gris de la carne. El concepto de lectinas con función en la adhesión celular se ejemplifica por la interacción de ciertos virus y bacterias con células huésped eucariotas (Paulson, J.C., *The Receptors* vol. 2, P.M. Conn, Eds. (Academic Press, NY, 1985), pág. 131; Sahron, N., *FEBS Lett.*, 217, 145 (1987)). En las interacciones célula-célula de eucariotas, se han deducido las funciones adhesivas de las lectinas endógenas en diversos sistemas (Grable, L., y col., *Cell*, 17, 477 (1979); Fenderson, B., y col., *J. Exp. Med.*, 160, 1591 (1984); Kunemund, V., *J. Cell Biol.*, 106, 106, 213 (1988); Bischoff, R., *J. Cell. Biol.*, 102, 2273 (1986); Crocker, P.R., y col., *J. Exp. Med.*, 164, 1862 (1986); incluyendo la fertilización de invertebrados (Glabae, C. G., y col., *J. Cell. Biol.*, 94, 123 (1982); DeAngelis, P., y col., *J. Biol. Chem.*, 262, 13946 (1987)) y la de vertebrados (Bleil, J. D., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 6778 (1988); Lopez, L. C., y col., *J. Cell Biol.*, 101, 1501 (1985)). La utilización de interacciones proteína-azúcar como medio de lograr el reconocimiento celular específico es bien conocida.

La literatura sugiere que una lectina puede estar implicada en la interacción adhesiva entre linfocitos y sus ligandos (Rosen, S.D., y col., *Science*, 228, 1005 (1985); Rosen, S.D., y col., *J. Immunol.*, (en publicación) (1989); Stoolman, L. M., y col., *J. Cell Biol.*, 96, 722 (1983); Stoolman, L. M., y col., *J. Cell Biol.*, 99, 1535 (1984); Yednock, T. A., y col., *J. Cell Biol.*, 104, 725 (1987); Stoolman, L. M., y col., *Blood*, 70, 1842 (1987); una aproximación relacionada por Brandley, B.K., y col., *J. Cell Biol.*, 105, 991 (1987); Yednock, T.A., y col., en preparación; y Yednock, T.A., y col., *J. Cell Biol.*, 104, 725 (1987)).

Se investigaron las características de una glicoproteína de superficie que puede estar implicada en la localización de linfocitos humanos con una serie de anticuerpos mono y policlonales denominados genéricamente Hermes. Estos anticuerpos reconocen una glicoproteína de superficie de ~90.000 daltons que se halló en un gran número de tipos celulares inmunes y no inmunes, los cuales mediante experimentos de preaclaramiento de anticuerpos se mostró que estaban relacionados con el antígeno de Mel 14. (Jalkanen, S., y col., *Ann. Rev. Med.*, 38, 467-476 (1987); Jalkanen, S., y col., *Blood*, 66 (3), 577-582 (1985); Jalkanen, S. y col., *J. Cell Biol.* 105, 983-990 (1987); Jalkanen, S., y col., *Eur. J. Immunol.*, 18, 1195-1202 (1986).

Se han hallado dominios de tipo factor de crecimiento epitelial en una amplia gama de proteínas, incluyendo factores de crecimiento, receptores de superficie celular, productos de genes del desarrollo, proteínas de la matriz extracelular, factores de coagulación, activadores del plasminógeno y el complemento (Doolittle, R.F., y col., *CSH Symp.* 51, 447 (1986)).

Se ha caracterizado una glicoproteína de superficie celular de linfocitos (referida anteriormente aquí como la "LHR"), dicha proteína media la unión de linfocitos al endotelio del tejido linfoide. Se han identificado y aislado clones de cADN de tamaño completo, así como el ADN que codifica la LHR humana y murina (HuLHR y MLHR, respectivamente), y además este ADN se expresa por células huésped recombinantes. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de la LHR humana (HuLHR) se muestran en la Fig. 1. La secuencia nucleotídica y aminoacídica de la LHR murina (MLHR) se muestra en la Fig. 2.

En la presente invención, se muestra que la LHR es una glicoproteína que contiene los siguientes dominios proteicos: una secuencia señal, un dominio de unión a carbohidratos, un dominio semejante al factor de crecimiento epitelial (egf), por lo menos una y preferentemente dos repeticiones del dominio de unión al complemento, un dominio de unión transmembrana (TMD) y un dominio intracelular o citoplasmático cargado.

Una estrategia exitosa en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de muchas anomalías en las interacciones de la pareja de unión al ligando ha sido la identificación de antagonistas que bloquean la unión o la interacción entre el ligando y la pareja de unión. Una aproximación ha sido la utilización de una pareja de unión exógena como un antagonista competitivo para la pareja de unión nativa. Sin embargo, muchas parejas de unión al ligando son proteínas de membrana celular que están ancladas en la bicapa lipídica de las células. La presencia de componentes

de membrana es indeseable desde el punto de vista de fabricación y purificación. Y ya que estas moléculas se hallan normalmente presentes sólo en las superficies celulares, sería deseable producirlas en una forma que sea más estable en la circulación. Además, las parejas de unión al ligando truncadas o solubles puede que no sean óptimamente eficaces como terapéuticos ya que poseen una vida media plasmática *in vivo* relativamente corta, puede que no atraviesen la placenta u otras barreras biológicas, y ya que secuestran su sitio de reconocimiento del ligando sin permitir la acción de una función efectora, pueden ser inadecuadas para propósitos terapéuticos.

Según ello, es un objetivo de la presente invención el producir parejas de unión al ligando fusionadas con porciones que sirvan para prolongar la vida media plasmática *in vivo* de la pareja de unión al ligando, es decir dominios de inmunoglobulina, y facilitar su purificación por la proteína A. Es otro objetivo el proporcionar nuevas moléculas de inmunoglobulina híbridas que combinen características de adhesión y unión a la diana de una pareja de unión al ligando con funciones efectoras de inmunoglobulina como la unión al complemento, unión al receptor celular y similar. Otro objetivo es proporcionar moléculas con funciones nuevas tales como las descritas anteriormente para utilización terapéutica, o para utilizar como reactivos diagnósticos para el ensayo *in vitro* de las parejas de unión al ligando o de sus dianas. Es otro objetivo el proporcionar moléculas multifuncionales en las que diversas parejas de unión al ligando (cada una de las cuales puede ser la misma o diferente) se ensambla, por lo que las moléculas son capaces de unirse a y/o activar más de un ligando.

En particular, es un objetivo el preparar moléculas para dirigir parejas de unión al ligando como las toxinas, parejas de superficie celular, enzimas, factores de crecimiento, hormonas o moléculas efectoras como las porciones semejantes a dominios constantes de un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas hacia las células que portan ligandos de las parejas de unión al ligando, y para facilitar la purificación de las parejas de unión al ligando.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar heteropolímeros híbridos de inmunoglobulina-pareja de unión al ligando, especialmente heterodímeros y heterotetrámeros, que se utilizan para dirigir la unión de porciones terapéuticas a tejidos específicos y ligandos.

Es otro objetivo de la presente invención el proporcionar un procedimiento para la expresión de estas moléculas en el cultivo de células recombinantes.

Resumen de la invención

Los objetivos de esta invención se logran al proporcionar un dímero de cadena pesada de inmunoglobulina de acuerdo con la reivindicación 1.

Las nuevas composiciones que se proporcionan aquí se purifican y formulan en vehículos aceptables farmacológicamente para la administración a los pacientes que necesitan una terapia antiviral, neuromoduladora o inmunomoduladora, y para la utilización en la modulación de la adhesión celular. Esta invención es particularmente útil para el tratamiento de pacientes que tienen anomalías mediadas por receptor. Además, las composiciones que se proporcionan aquí son intermediarios útiles en la purificación de la pareja de unión al ligando a partir del cultivo de células recombinantes, en donde los anticuerpos u otras sustancias capaces de unirse al componente de proteína plasmática estable se utilizan para absorber la fusión, o son útiles en los ensayos diagnósticos para la pareja de unión al ligando en donde la proteína plasmática estable sirve como un marcador indirecto.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la secuencia aminoacídica y del ADN de la LHR humana (HuLHR).

La Figura 2 muestra la secuencia aminoacídica y del ADN de la LHR murina (MLHR).

La Figura 3 muestra una comparación entre las secuencias aminoacídicas de la HuLHR y MLHR.

Las Figuras 4A-4B muestran los resultados del aislamiento y de la secuenciación del extremo N-terminal de la MLHR. La Fig. 4A muestra los resultados de la degradación de Edmann en fase gaseosa de una banda de 90.000 daltons a partir de un gel de poliacrilamida-SDS a partir de material purificado por cromatografía de afinidad con el anticuerpo monoclonal Mel 14 de un extracto obtenido con detergente de bazo murino. Los residuos subrayados entre los aminoácidos 7 y 15 se eligieron para producir la sonda oligonucleotídica que se muestra en la Fig. 4B. La Fig. 4B muestra como sonda un oligonucleótido de 26-mer 32 veces redundante.

La Figura 5 muestra la expresión transitoria del clon de cADN de MLHR. Los carriles A-F corresponden a lo siguiente: A) Lisados de células 293 transfectadas con un plásmido de expresión de MLHR e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14. B) Sobrenadantes de las células 293 transfectadas con un plásmido de expresión de MLHR e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14. C) Lisados de las células 293 transfectadas con un plásmido que expresa la glicoproteína de la cubierta gp120 de VIH e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14. D) Sobrenadantes de las células 293 transfectadas con el plásmido de expresión de la cubierta de VIH inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14. E) Sobrenadantes de las células 38C13 e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14. F) Lisados de las células 38C13 marcadas en la superficie con I¹²⁶ e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14.

Las Figuras 6A-6C muestran las secuencias proteínicas que son heterólogas pero funcionalmente comparables con la MLHR.

Las líneas marcadas "MLHR" corresponden a la MLHR de la Fig. 2.

La Fig. 6A compara los dominios de unión al carbohidrato.

La Fig. 6B compara los dominios del factor de crecimiento epitelial.

La Fig. 6C compara los dominios del factor de unión al complemento.

La Figura 7 es un esquema de los dominios proteínicos hallados en la LHR, incluyendo la secuencia señal, el dominio de unión a carbohidratos, el dominio del factor de crecimiento epitelial (egf), dos repeticiones en el dominio de unión al complemento (flechas), el dominio de unión transmembrana (TMD) y el dominio intracelular cargado.

La Figura 8 muestra la construcción de quimeras de MLHR-IgG que contienen la lectina, lectina-egf y lectina-egf-motivos reguladores del complemento.

La Figura 9 muestra la electroforesis en gel de los productos de expresión y purificación de las quimeras de MLHR-IgG.

La Figura 10 muestra el análisis de unión del éster de polifosfomanano (PPME) de varias quimeras de MLHR-IgG.

Descripción detallada

Las parejas de unión al ligando se definen aquí como proteínas que se sabe se unen específicamente a las moléculas de ligando dianas, y se hallan generalmente en su estado nativo como polipéptidos secretados o unidos a membrana; las parejas de unión al ligando unidas a membrana incluyen de forma característica una región transmembrana hidrofóbica o un anclaje fosfolípido. Las parejas de unión al ligando incluyen los receptores y proteínas transportadoras, así como hormonas, proteínas de adhesión celular (proteínas que dirigen o inducen la adhesión de una célula a otra), moléculas de unión a lectina, factores de crecimiento, enzimas y similares. Los antígenos CD que no son miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas, o por otra parte excluidos como se indicó anteriormente, son parejas de unión al ligando adecuadas, Knapp y col., *Immunology Today*, 10 (8): 253-258, 1989. El receptor de insulina puede ser opcionalmente una pareja de unión al ligando. Las parejas de unión al ligando incluyen no sólo la forma nativa de tamaño completo, sino también secuencias truncadas u otras variantes de secuencia aminoacídica que continúan siendo capaces de unirse al ligando normal.

Como se utiliza aquí, el término "pareja de unión al ligando" excluye específicamente los miembros polimórficos y no polimórficos de la superfamilia de los genes de inmunoglobulina, y las proteínas que son homólogas a éstos, como los antígenos de histocompatibilidad principal de clase I y clase II, las inmunoglobulinas, las cadenas α , β , γ y δ del receptor de células T, CD1, CD2, CD4, CD8, CD28, las cadenas γ , δ y ϵ de CD3, OX-2, Thy-1, las moléculas de adhesión celular intercelular o neural (I-CAM o N-CAM), el antígeno-3 asociado con la función linfocítica (LFA-3), la proteína neurocitoplasmática (NCP-3), el receptor poli-Ig, la glicoproteína asociada a mielina (MAG), el receptor de alta afinidad IgE, la glicoproteína principal de mielina periférica (Po), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, el receptor del factor-1 estimulador de colonias, el receptor Fc de macrófagos, los receptores gamma Fc y el antígeno carcinoembrionario. Homólogo a un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, únicamente con el propósito de exclusión de esta superfamilia, quiere decir tener la secuencia de un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas, o tener una secuencia de ello que tenga sustancialmente la misma (o un elevado grado de) homología de secuencia aminoacídica con un miembro conocido de la superfamilia, como los ejemplos específicos proporcionados anteriormente tienen en relación con la secuencia de un dominio variable o constante de inmunoglobulina. Se ha de tener en cuenta que esto no excluye las realizaciones en las que una fusión de una pareja de unión al ligando se ensambla en un multímero con, además, un miembro o fusión de un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas.

También se excluyen de forma específica del término "pareja de unión al ligando" los polipéptidos de subunidades múltiples (cadenas) codificados por genes discretos (genes que no codifican un polipéptido precursor de cadena sencilla que conduce al polipéptido de subunidades múltiples), con al menos una subunidad del polipéptido insertada de forma ordinaria en la membrana de la célula, incluyendo los receptores celulares (p.ej., integrinas) para moléculas de la matriz extracelular, como se ejemplifica en la PCT Pub. WO90/06953 publicada el 28 de junio, 1990. Se ha de tener en cuenta que esto no excluye las realizaciones en las que una fusión de la pareja de unión al ligando se ensambla en un multímero con, además, un polipéptido de subunidades múltiples o fusión de un polipéptido de subunidades múltiples tal como se define en este párrafo.

La pareja de unión no es una LHR. La LHR se define como un polipéptido que tiene una actividad biológica cualitativa común con la LHR de la Fig. 1 o Fig. 2, y que contiene preferentemente un dominio con una homología superior al 70% en relación con el dominio de unión al carbohidrato, el dominio del factor de crecimiento epitelial, o el dominio de unión al carbohidrato de la LHR de la Fig. 1 o Fig. 2.

La homología en relación con una LHR se define aquí como el porcentaje de residuos en la secuencia de candidatos que son idénticos con los residuos en el dominio de unión al carbohidrato, el dominio del factor de crecimiento epitelial, o los dominios de unión al complemento en la Fig. 1 o Fig. 2 después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología.

Se incluyen dentro del ámbito de la LHR, tal como se utiliza aquí este término, las LHRs que tienen secuencias aminoácídicas de la HuLHR o MLHR como se indica en la Fig. 1 o 2, derivados desglucosilados o no glicosilados de la LHR, variantes de secuencia aminoácídica homóloga de la secuencia de la Fig. 1 o la 2, y variantes homólogas generadas *in vitro* y derivadas de la LHR, que son capaces de presentar una actividad biológica común con la LHR de la Fig. 1 o Fig. 2.

La actividad biológica de la LHR o del fragmento de LHR se definen como 1) la reactividad inmunológica cruzada con al menos un epitopo de la LHR, o 2) la posesión de al menos una función adhesiva, reguladora o efectora cualitativamente común con la LHR.

Un ejemplo de las actividades biológicas cualitativas de la LHR es su unión a ligandos en células endoteliales altamente especializadas de los tejidos linfoides. También, se requiere frecuentemente para la unión al ligando un catión divalente como el calcio.

Que reacciona de forma cruzada inmunológicamente tal como se utiliza aquí quiere decir que el polipéptido candidato es capaz de inhibir competitivamente la actividad biológica cualitativa de la LHR que tiene esta actividad con antisueros policlonales contra el análogo activo conocido. Tales antisueros se preparan de manera convencional mediante inyección en cabras o conejos, por ejemplo, de forma subcutánea con el análogo activo conocido en adyuvante completo de Freund, seguido por la inyección de refuerzo intraperitoneal o subcutánea en adyuvante incompleto de Freund.

Estructuralmente, como se muestra en la Figura 3, la LHR incluye varios dominios que se identifican de la manera siguiente (con ± 10 residuos): una secuencia señal (residuos 20-32), que se continua por un dominio de unión al carbohidrato (identificado en la Fig. 3 como un dominio de "lectina") (residuos 39-155), un dominio del factor de crecimiento epitelial (egf) (residuos 160-193), un dominio de unión al factor del complemento (residuos 197-317), un dominio de unión transmembrana (TMD) (residuos 333-355) y un dominio citoplasmático (residuos 356-372). La unión para el dominio extracelular de LHR se halla a, o en aproximadamente 30 residuos del extremo N-terminal del dominio transmembrana, y se identifica fácilmente a partir del análisis de la secuencia de LHR. Cualquiera de estos dominios se utiliza en la práctica de la presente invención.

Las Figs. 6A-6C muestran varias proteínas que tienen cierta homología con tres de estos dominios. La Fig. 6A muestra los dominios de unión al carbohidrato, la Fig. 6B muestra los dominios del factor de crecimiento epitelial la Fig. 6C muestra cierta homología con los dominios de unión al complemento.

En la Fig. 3 se muestra una comparación de las secuencias aminoácídicas de HuLHR y MLHR, y se muestra un elevado grado de homología en toda la secuencia global (83%). Los grados de homología entre los diversos dominios hallados en la HuLHR *versus* la MLHR son, sin embargo, variables. Por ejemplo, el grado de conservación de secuencia entre la MLHR y la HuLHR en el dominio de unión al carbohidrato y el dominio de egf es aproximadamente de ~83%, mientras que el grado de conservación en la primera repetición de unión del complemento se halla en el 79% y sólo en el 63% en la segunda repetición, para una homología global del dominio de unión al complemento del 71%. Además, mientras que las dos repeticiones del dominio de unión al complemento de MLHR son idénticas, las de HuLHR presentan diferencias y difieren también con las repeticiones murinas. Es interesante destacar que el grado de conservación entre los dos receptores en la secuencia transmembrana y regiones de alrededor es virtualmente idéntico, con sólo una sustitución hidrofóbica conservada, probablemente dentro de la región de anclaje transmembrana.

La glicoproteína de superficie, que es reconocida por las series de anticuerpos mono y policlonales denominados Hermes como se describió anteriormente está específicamente excluida del ámbito de la presente invención.

Las inmunoglobulinas y ciertas variantes de lo mismo son conocidas y muchas se preparan en cultivos de células recombinantes. Ver por ejemplo, la patente americana U.S. 4.745.055; la patente europea EP 256.654; Faulkner y col., *Nature*, 298: 286 (1982); la patente europea EP 120.694; la patente europea EP 125.023; Morrison, *J. Immunol.*, 123: 793 (1979); Kohler y col., *P.N.A.S. USA* 77:2197 (1980); Raso y col., *Cancer Res.*, 41:2073 (1981); Morrison y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 2:239 (1984); Morrison, *Science*, 229: 1202 (1985); Morrison y col., *P.N.A.S. USA*, 81:6851 (1984); la patente europea EP 255.694; la patente europea EP 266.663; y la patente internacional WO 88/03559. También son conocidas las cadenas de inmunoglobulinas recombinadas. Ver por ejemplo, la patente americana U.S. 4.444.878; la patente internacional WO 88/03565; y la patente europea EP 68.763 y las referencias allí citadas.

Generalmente, la pareja de unión al ligando se fusiona por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de la región constante de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas reteniendo por lo menos la bisagra, los dominios CHA2 y CH3 de la región constante de cadena pesada en lugar de la región(es) variable de las mismas.

Las regiones transmembrana o las secuencias de reconocimiento del anclaje lipídico o fosfolipídico de las parejas de unión al ligando que comprenden tales regiones o secuencias, preferentemente, se inactivan o delecionan antes de la fusión.

De modo característico, tales fusiones retienen por lo menos de forma funcionalmente activa la bisagra y los dominios CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan inmediatamente en el extremo N-terminal de la cadena pesada de CH1 o de la región correspondiente de la cadena ligera. Generalmente, esto se logra construyendo la secuencia de ADN adecuada y expresándola en un cultivo de células recombinantes. De modo alternativo, sin embargo, los polipéptidos de la presente invención se pueden sintetizar de acuerdo con procedimientos conocidos.

El sitio preciso en donde se realiza la fusión no es crítico, aunque sí se conocen bien sitios específicos que pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, secreción o las características de unión de la pareja de unión. El sitio óptimo se determinará mediante experimentación de rutina.

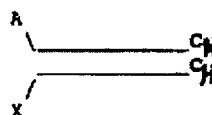
Las inmunoglobulinas híbridas se ensamblan como hetero- u homo-multímeros, y particularmente como dímeros o tetrameros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán unidades estructurales conocidas como las representadas por los diagramas siguientes.

En el diagrama siguiente, "A" significa una porción de una pareja de unión al ligando que contiene por lo menos un sitio de unión al ligando capaz de unirse a su ligando; X es un agente adicional, que puede ser otra pareja funcional de unión al ligando (idéntica a A o diferente) y CH representa los dominios constantes de cadena pesada de una inmunoglobulina.

homodímero:



heterodímero:



Se entenderá que estos diagramas son meramente ilustrativos, y que las cadenas de los multímeros están unidas por puentes disulfuro de la misma manera que las inmunoglobulinas nativas. De acuerdo con la presente invención, las inmunoglobulinas híbridas se secretan fácilmente a partir de células de mamífero transformadas con el ácido nucleico adecuado. Las formas secretadas incluyen aquellas en las que el epítipo de la pareja de unión está presente en los dímeros de cadenas pesadas.

Las composiciones de la presente invención, en la que se sustituye una porción activa biológicamente de una pareja de unión al ligando por la región variable de una cadena de inmunoglobulina se piensa que presentan mejor vida media plasmática *in vivo*. Estas inmunoglobulinas híbridas se construyen de forma similar a las construcciones donde un dominio semejante a la inmunoglobulina se sustituye por el dominio variable de una inmunoglobulina, ver p.ej. Capon y col., *Nature* 337:525-531, 1989, Traunecker y col., *Nature*, 339:68-70, 1989, Gascoigne y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:2936-2940, 1987, y la solicitud europea de publicación de patente EPO 0 325 224 A2. Las inmunoglobulinas híbridas de la presente invención también se construyen de forma similar a los anticuerpos quiméricos en los que un dominio variable de un anticuerpo de una especie se sustituye por el dominio variable de otra especie. Ver, por ejemplo, la patente europea EP 0 125 023; Munro, *Nature*, 312: (13 de diciembre de 1984); Neuberger y col., *Nature*, 312: (13 de diciembre de 1984); Sharon y col., *Nature*, 309: (24 de mayo de 1984); Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y col., *Science* 229:1202-1207 (1985); y Boulianne y col., *Nature*, 312:643-646 (13 de diciembre de 1984). El ADN que codifica la pareja de unión se corta mediante una enzima de restricción en o cerca del extremo 3' terminal del ADN que codifica el dominio(s) de la pareja de unión deseado y en un punto de o cerca del ADN que codifica el extremo N-terminal del polipéptido maduro (si se contempla la utilización de un péptido líder diferente), o en o cerca de la región que codifica el extremo N-terminal de la pareja de unión (si se utiliza un péptido señal nativo). Este fragmento de ADN se inserta luego en el ADN que codifica una región constante de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina y, si es necesario, el fragmento se recorta mediante mutagénesis deleccional. Preferentemente, esto es una inmunoglobulina humana cuando la variante se desea para terapia *in vivo* en humanos.

Los ADNs que codifican las regiones constantes de las cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas son conocidos o fácilmente disponibles a partir de librerías de cADN, o bien se pueden sintetizar. Ver por ejemplo, Adams y col., *Biochemistry*, 19:2711-2719 (1980); Gough y col., *Biochemistry*, 19: 2702-2710 (1980); Dolby y col., *P.N.A.S. USA* 77:6027-6031 (1980); Rice y col., *P.N.A.S. USA* 79:7862-7865 (1982); Falner y col., *Nature*, 298:286-288 (1982); y Morrison y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 2:239-256 (1984). En la presente invención se proporcionan las secuencias de ADN que codifican la LHR. Todas aquellas secuencias de ADN que codifican otras parejas de unión deseadas que sean conocidas o fácilmente disponibles a partir de librerías de cADN son adecuadas para la práctica de la presente invención.

El ADN que codifica una fusión de la presente invención se transfecta en una célula huésped para su expresión. Si se desean multímeros, entonces se transforma la célula huésped con el ADN que codifica cada cadena que formará parte del multímero, seleccionándose de forma óptima la célula huésped capaz de ensamblar las cadenas de los multímeros de la manera deseada.

En general, las fusiones se expresan intracelularmente y se secretan bien, pero también se ha hallado de forma corriente un importante grado de variación en el nivel de secreción de diversas fusiones a partir de huéspedes recombinantes.

La presente invención también contempla las variantes de secuencia aminoacídica de la pareja de unión. Las variantes de secuencia aminoacídica de la pareja de unión se preparan teniendo presente diversos objetivos, que incluyen el incremento de la afinidad de la pareja de unión por su ligando, la facilitación de la estabilidad, la purificación y preparación de la pareja de unión, la modificación de su vida media plasmática, el mejorar la eficacia terapéutica y el disminuir la gravedad o la ocurrencia de efectos secundarios durante la utilización terapéutica de la pareja de unión. En la discusión posterior, se proporcionan las variantes de secuencia aminoacídica de la LHR, ejemplos de las variantes que pueden seleccionarse para las parejas de unión al ligando de la invención.

Las variantes de secuencia aminoacídica de la pareja de unión al ligando se hallan dentro de una o más de las tres clases siguientes: variantes insercionales, sustitucionales o deleciones. Estas variantes se preparan generalmente mediante mutagénesis dirigida de nucleótidos en el ADN que codifica la pareja de unión al ligando, por lo que gracias a ello se obtiene el ADN que codifica la variante, y después se expresa el ADN en un cultivo de células recombinantes. Sin embargo, los fragmentos que tienen más de 100-150 residuos de aminoácidos se preparan de forma conveniente mediante síntesis *in vitro*. La siguiente discusión se aplica con igual efecto a cualquier pareja de unión al ligando en la extensión aplicable a la estructura o función de ésta.

Las variantes de secuencia aminoacídica de la pareja de unión al ligando son variantes predeterminadas, que no se hallan en la naturaleza o en los alelos que se producen de forma natural. Las variantes exhiben de forma característica la misma calidad biológica, por ejemplo, la actividad de unión al ligando que el análogo natural. Sin embargo, las variantes y derivados que no son capaces de unirse con sus ligandos son también útiles, (a) como un reactivo en ensayos diagnósticos para la pareja de unión al ligando, o anticuerpos contra la pareja de unión al ligando, (b) insolubilizados de acuerdo con procedimientos conocidos, como agentes para purificar anticuerpos anti-pareja de unión al ligando a partir de antiseros o sobrenadantes de cultivos de hibridomas, y (c) como inmunógenos para lograr anticuerpos contra la pareja de unión al ligando o como componentes de equipos de inmunoensayo (marcados, como un reactivo competitivo para la pareja de unión al ligando nativa, o no marcados como un estándar para el ensayo de la pareja de unión al ligando) siempre y cuando por lo menos un epitopo de la pareja de unión al ligando permanezca activo.

Mientras que se predetermina el sitio para la introducción de una variación de secuencia, la mutación *per se* no lo necesita. Por ejemplo, con el fin de realizar una mutación en un sitio dado, se procede a realizar mutagénesis al azar o de saturación (donde se inserten los 20 residuos posibles) en el codón diana y se rastrea la combinación óptima de actividades deseadas de las variantes expresadas. Dicho rastreo es bien conocido por un experto en la materia.

Las inserciones aminoacídicas se hallarán generalmente en el orden de 1 a 10 residuos de aminoácidos; las sustituciones se introducen de forma característica para residuos únicos; y las deleciones serán de aproximadamente 1 a 30 residuos. Las deleciones o inserciones se realizan preferentemente en pares adyacentes, es decir una delección de 2 residuos o inserción de 2 residuos. Se hará bien evidente a partir de la siguiente discusión que las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de lo mismo se introducen o combinan para lograr una construcción final.

Las variantes insercionales de secuencia aminoacídica de la pareja de unión al ligando son aquellas en las que se introducen uno o más residuos aminoacídicos extraños a la pareja de unión al ligando en un sitio predeterminado en la pareja de unión al ligando diana, desplazando dichos residuos a los preexistentes.

Generalmente, las variantes insercionales son fusiones de proteínas heterólogas o polipéptidos con el extremo amino o carboxilo terminal de la pareja de unión al ligando. Tales variantes se denominan fusiones de la pareja de unión al ligando y un polipéptido que contiene una secuencia distinta a la que se halla normalmente en la pareja de unión al ligando en la posición insertada. Se incluyen aquí diversos grupos de fusiones.

Los polipéptidos nuevos de esta invención son útiles en el diagnóstico o en la purificación de la pareja de unión al ligando mediante técnicas de inmunoafinidad conocidas *per se*. Alternativamente, en la purificación de la pareja de unión, se utilizan los polipéptidos nuevos para adsorber la fusión de mezclas impuras, después de lo cual se eluye la fusión y, si se desea, se recupera la pareja de unión de la fusión, p.ej., mediante corte enzimático.

Fusiones deseables de la pareja de unión, que pueden ser o no activas inmunológicamente, incluyen las fusiones de la secuencia de la pareja de unión madura con una secuencia señal heteróloga a la pareja de unión.

Cuando se requiera, se utilizan fusiones de secuencia señal con el fin de dirigir de forma más concisa la secreción de la pareja de unión al ligando. La señal heteróloga reemplaza la señal nativa de la pareja de unión al ligando, y cuando la fusión resultante es reconocida, es decir es procesada y cortada por la célula huésped, la pareja de unión

al ligando se secreta. Las señales se seleccionan en función de la célula huésped elegida, y pueden incluir secuencias bacterianas, de levaduras, de mamíferos y víricas. La secuencia señal de la LHR nativa o la señal de la glicoproteína gD del virus herpes son adecuadas para utilizar en sistemas de expresión de mamíferos.

- 5 Las variantes de sustitución son aquellas en las que por lo menos se ha eliminado un residuo en la secuencia de la Fig. 1 o 2 y en su lugar se ha insertado un residuo diferente. Tales sustituciones se realizan generalmente de acuerdo con la siguiente Tabla 1, cuando se desea modular de forma más fina las características de la pareja de unión al ligando.

Residuo original	Ejemplos de sustituciones
Ala	ser
Arg	lys
15 Asn	gln; his
Asp	glu
20 Cys	ser; ala
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
25 His	asn; gln
Ile	leu; val
30 Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; ile
35 Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
40 Trp	tyr
Tyr	trp; phe
45 Val	ile; leu

Se incluyen dentro del ámbito de la presente invención las secuencias de nuevos aminoácidos, así como de análogos alostéricos (aminoácidos u otros).

- 50 Se realizan cambios sustanciales en función o de la identidad inmunológica mediante selección de sustituciones que son menos conservadoras que las de la Tabla 1, es decir, seleccionando los residuos que difieren más significativamente en su efecto de mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades serán aquellas en las que (a) un residuo hidrofílico, p.ej., seril o treonil se sustituye por (o mediante) un residuo hidrofóbico, p.ej. leucil, isoleucil, fenilalanil, valil o alanil; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o mediante) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p.ej., lisil, arginil, o histidil, se sustituye por (o mediante) un residuo electronegativo, p.ej., glutamil o aspartil; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p.ej., fenilalanina, se sustituye por (o mediante) uno que no tenga una cadena lateral, p.ej., glicina.

- 60 Algunas delecciones, inserciones y sustituciones no producirán cambios radicales en las características de la molécula. Sin embargo, cuando el efecto exacto de la sustitución, delección, o inserción sea difícil de predecir con anterioridad a su realización, por ejemplo cuando se modifica un dominio de unión al carbohidrato o un epitopo inmune, un experto en la materia entenderá que el efecto debe evaluarse mediante ensayos de rastreo rutinario. Por ejemplo, 65 una variante se realiza típicamente mediante mutagénesis dirigida del ácido nucleico, expresión del ácido nucleico variante en el cultivo de células recombinantes y, opcionalmente, purificación a partir del cultivo celular por ejemplo mediante adsorción por inmunoadfinidad en una columna con anticuerpos policlonales (con el fin de adsorber la va-

riante por al menos uno de los epitopos inmunes restantes). La actividad del lisado celular de la variante purificada se rastrea entonces en un ensayo de rastreo adecuado para las características deseadas. Por ejemplo, un cambio en el carácter inmunológico, como la afinidad para un anticuerpo dado, se cuantifica mediante un inmunoensayo de tipo competitivo. Las modificaciones de tales propiedades proteicas como la estabilidad redox o térmica, hidrofobicidad, susceptibilidad a la degradación proteolítica, o la tendencia a la agregación con transportadores o en multímeros se analiza mediante procedimientos bien conocidos por un experto en la materia.

Otra clase de variantes son las variantes de delección. Las delecciones se caracterizan por la eliminación de uno o más residuos aminoacídicos de la secuencia.

La inactivación del dominio transmembrana de la pareja de unión al ligando, típicamente mediante delección o sustitución de los residuos de hidroxilación del dominio transmembrana, facilitará la recuperación y la formulación al reducir su afinidad celular o afinidad por lípidos de membranas y mejorar así su solubilidad acuosa. Si se delecionan los dominios transmembrana y citoplasmático, se evita la introducción de epitopos potencialmente inmunogénicos, bien mediante la exposición de otros polipéptidos intracelulares que pueden ser reconocidos por el cuerpo como extraños, o mediante la inserción de polipéptidos heterólogos que son potencialmente inmunogénicos. La inactivación de la función de unión a membrana se logra mediante la delección de los suficientes residuos para producir un perfil de hidropatía hidrofílico en este sitio, o mediante la sustitución con residuos heterólogos que brinden el mismo resultado.

Una ventaja principal de la pareja de unión al ligando inactivada a nivel transmembrana es que puede secretarse en el medio de cultivo de huéspedes recombinantes. Esta variante es soluble en los fluidos corporales tales como la sangre y no presenta una afinidad apreciable por los lípidos de membrana, por lo que se simplifica de forma considerable su recuperación a partir del cultivo de células recombinantes.

En términos generales, todas las variantes no poseerán un dominio transmembrana funcional y preferentemente no tendrán una secuencia citoplasmática funcional.

Por ejemplo, el dominio transmembrana se puede sustituir por cualquier secuencia aminoacídica, p.ej., una secuencia aleatoria o predeterminada de unos 5 a 50 residuos de serina, treonina, lisina, arginina, glutamina, ácido aspártico y residuos hidrofílicos similares, que juntos presentan un perfil de hidropatía hidrofílico. Estas variantes se secretan en el medio de cultivo de huéspedes recombinantes.

Se incluyen dentro del ámbito de la presente invención las modificaciones covalentes de las moléculas. Tales modificaciones se introducen haciendo reaccionar los residuos aminoacídicos diana de la proteína recuperada con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o con los residuos terminales, o aprovechando los mecanismos de modificación post-traducciona que funcionan en células huésped recombinantes seleccionadas. Tales modificaciones se hallan dentro de la práctica ordinaria de los procedimientos y se realizan sin experimentación excesiva.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil en la preparación de agregados intermoleculares de la inmunoglobulina híbrida con polipéptidos, así como para la unión de la inmunoglobulina híbrida a una matriz o superficie soporte insoluble en agua para utilizar en el ensayo, o para la purificación por afinidad de sus ligandos. Además, un estudio de las uniones intracatenarias proporcionará información directa sobre la conformación estructural. Los agentes de unión incluyen el 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo los ésteres con el ácido 4-azidosalicílico, los imidoésteres homobi-funcionales incluyendo los ésteres de disuccinimidil como el 3,3'-ditiobis (succinimidil-propionato), y las maleimidas bifuncionales como el bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes como el metil-3-[(p-azido-fenil)ditio] propionimato rinden intermediarios fotoactivables que son capaces de formar uniones en presencia de luz. Alternativamente, matrices insolubles en agua y reactivas como los carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sistemas que reaccionan en presencia de sustratos descritos en las patentes americanas U.S. 3.959.080; 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; 4.055.635; y 4.330.440 se utilizan para la inmovilización y la unión de proteínas.

Ciertas derivatizaciones post-traduccionales son el resultado de la acción de células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de glutaminil y asparaginil son frecuentemente desamidados post-traducciona en los residuos glutamyl y aspartil correspondiente. Alternativamente, estos residuos se desamidán en condiciones ligeramente acídicas. Cualquier forma de estos residuos se halla dentro del ámbito de la presente invención.

Otras modificaciones post-traduccionales incluyen la hidroxilación de residuos de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de seril o treonil, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco pág. 79-86 [1983], la acetilación de la amina del extremo N-terminal, y en algunos casos, la amidación del carboxilo del extremo C-terminal.

Otros derivados comprenden los polipéptidos nuevos de la presente invención unidos covalentemente a un polímero no proteico. El polímero no proteico es generalmente un polímero sintético hidrofílico, es decir, un polímero que no se halla en la naturaleza. Sin embargo, los polímeros que existen en la naturaleza y que son producidos mediante procedimientos recombinantes o *in vitro* son también útiles, como lo son los polímeros aislados de la naturaleza. Se hallan dentro del ámbito de la presente invención los polímeros de polivinil hidrofílicos, p.ej., el polivinilalcohol y

la polivinilpirrolidona. De especial utilidad son los ésteres de polialquilenos como el polietilén glicol, el polipropilén glicol, los ésteres de polioxietileno o metoxi polietilén glicol; los polioxiálquilenos como el polioxietilén, el polioxi-propilén y copolímeros en bloque de polioxietilén y polioxipropilén (Pluronic); los polimetacrilatos; los carbamatos; polisacáridos ramificados o no que comprenden los monómeros de azúcares como la D-manosa, la D- y L-galactosa, la fucosa, la fructosa, la D-xilosa, la L-arabinosa, el ácido D-glucurónico, el ácido siálico, el ácido D-galacturónico, el ácido D-manurónico (p.ej., el ácido polimanurónico, o el ácido algínico), la D-glucosamina, la D-galactosamina, la D-glucosa y el ácido D-neuramínico incluyendo los homopolisacáridos y heteropolisacáridos como la lactosa, la amilopectina, el almidón, el hidroexitil almidón, la amilosa, el sulfato de dextrano, el dextrano, las dextrinas, el glucógeno, o la subunidad de polisacáridos de mucopolisacáridos ácidos, p.ej., el ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar como el polisorbitol y el polimanitol; y la heparina o el heparón.

Si el polisacárido es la glicosilación nativa o la glicosilación que se espera de la expresión recombinante, entonces el sitio de sustitución puede localizarse en un sitio distinto al sitio de N- u O-glicosilación nativa, en donde se haya introducido un sitio de N- u O-glicosilación adicional o sustitutivo en la molécula. Se pueden utilizar mezclas de tales polímeros, o el polímero puede ser homogéneo. Antes de la unión, no es necesario que el polímero sea soluble en agua, aunque es preferible, en cambio, que el conjugado final sí lo sea. Además, el polímero no debería ser altamente inmunogénico en la forma conjugada, ni debería presentar viscosidad, lo que es incompatible con la infusión o inyección intravenosa si se pretende administrar por dichas vías.

De forma preferente, el polímero sólo contiene un grupo reactivo. Esto ayuda a evitar la unión cruzada de moléculas proteicas. Sin embargo, se halla dentro del ámbito de la presente invención el optimizar las condiciones de reacción para reducir la unión cruzada, o para purificar los productos de reacción a través de filtración en gel o criba cromatográfica para recuperar los derivados esencialmente homogéneos.

El peso molecular del polímero se hallará de forma deseable en el margen de unos 100 a 500.000, y preferentemente de unos 1.000 a 20.000. El peso molecular elegido dependerá de la naturaleza del polímero y del grado de sustitución. En general, cuanto mayor es la hidrofiliidad del polímero mayor es el grado de sustitución y menor el peso molecular que se puede utilizar. Los pesos moleculares óptimos se determinarán mediante experimentación de rutina.

Generalmente, el polímero está unido covalentemente a la inmunoglobulina híbrida mediante un agente de unión multifuncional que reacciona con el polímero y con uno o más residuos aminoácídicos o de azúcares del híbrido. Sin embargo, se halla dentro del ámbito de la presente invención el unir de forma directa el polímero haciendo reaccionar un polímero derivatizado con el híbrido o vice versa.

El sitio de unión covalente en la inmunoglobulina híbrida incluye los grupos amino y épsilon amino del extremo N-terminal que se hallan en los residuos de lisina, así como otros grupos amino, imino, carboxil, sulfidril, hidroxil u otros grupos hidrofílicos. El polímero puede unirse de forma covalente directamente al híbrido sin utilizar un agente de unión multifuncional (generalmente bifuncional). La unión covalente con los grupos amino se logra mediante reacciones químicas conocidas basadas en cloruro cianúrico, diimidazol carbonil, grupos reactivos de aldehídos (PEG alcóxido más dietil acetal de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, o PEG cloruro más fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres activos de succinimidil, PEG activado por ditiocarbonato, PEG activado por 2,4,5-triclorofenilcloroformato o p-nitrofenilcloroformato). Los grupos carboxilo se derivatizan mediante conjugación de PEG-amina utilizando carbodiimida.

Los polímeros se conjugan con grupos de oligosacáridos mediante oxidación utilizando reactivos químicos, p.ej., metaperyodato, o enzimas, p.ej., glucosa o galactosa oxidasa, (produciendo cualquiera de ellos el derivado aldehído del carbohidrato), seguido de la reacción con hidrazida o polímeros amino-derivatizados, de la misma manera que se describe por Heitzmann y col., *P.N.A.S.*, 71:3537-3541 (1974) o Bayer y col., *Methods in Enzymology*, 62:310 (1979), para el marcaje de los oligosacáridos con biotina o avidina. Además, son también adecuados otros procedimientos químicos o enzimáticos que se han utilizado anteriormente para unir oligosacáridos y polímeros. Los oligosacáridos sustituidos son particularmente ventajosos porque, en general, hay menos sitios de sustitución que en los aminoácidos para la derivatización, y por ello los productos de oligosacáridos son más homogéneos. También, se modifica opcionalmente los sustituyentes de oligosacáridos mediante digestión enzimática para eliminar los azúcares, p.ej., mediante digestión por neuraminidasa, antes de la derivatización del polímero.

El polímero llevará un grupo que reacciona directamente con la cadena lateral del aminoácido, o el extremo N- o C-terminal del polipéptido, o que reacciona con el agente de unión multifuncional. En general, los polímeros que llevan tales grupos reactivos son bien conocidos en la preparación de proteínas inmovilizadas. Con el fin de emplear tales reacciones químicas, se debería utilizar un polímero soluble en agua o derivatizado de la misma forma que los polímeros insolubles utilizados anteriormente para la inmovilización de proteínas. La activación por bromuro de cianógeno es un procedimiento de particular utilidad para utilizar en la unión de polisacáridos.

“Soluble en agua” en relación con el polímero inicial quiere decir que el polímero o su intermediario reactivo utilizado para la conjugación es suficientemente soluble en agua como para participar en la reacción de derivatización.

“Soluble en agua” en relación con el conjugado de polímeros quiere decir que el conjugado es soluble en fluidos fisiológicos como la sangre.

El grado de sustitución de un tal polímero variará dependiendo del número de sitios reactivos en la proteína, si se utiliza toda la proteína o un fragmento de ella, si la proteína es una fusión con una proteína heteróloga, del peso molecular, de las características hidrofílicas y otras características del polímero y de los sitios elegidos para la derivatización de la proteína en particular. En general, el conjugado contiene aproximadamente de 1 a 10 moléculas de polímero, mientras que cualquier secuencia heteróloga puede sustituirse con un número esencialmente ilimitado de moléculas de polímero siempre y cuando la actividad deseada no se vea afectada negativamente de forma significativa. El grado óptimo de unión se puede determinar fácilmente con ayuda de una matriz experimental y haciendo variar las condiciones de tiempo, temperatura y otras condiciones de la reacción para cambiar el grado de sustitución, después de lo cual se determina la capacidad de los conjugados para funcionar en la forma deseada.

El polímero, p.ej. PEG, se une mediante muy diversos procedimientos conocidos *per se* para lograr la modificación covalente de proteínas con polímeros no proteicos como el PEG. Sin embargo, algunos de estos procedimientos no son adecuados para los actuales propósitos. La química del cloruro cianúrico conduce a muchas reacciones secundarias, incluyendo la unión de proteínas. Además, es muy probable que conduzca a la inactivación de proteínas que contienen grupos sulfhidrilo. La química del carbonil diimidazol (Beauchamp y col., *Anal. Biochem.*, 131:25-33 [1983]) requiere un pH elevado (>8,5), que puede inactivar proteínas. Además, ya que el intermediario de "PEG activado" puede reaccionar con agua, se necesita un gran exceso molar de "PEG activado" en relación a la proteína. La elevada concentración de PEG que se necesita para la química del carbonil diimidazol también conlleva a problemas con la purificación, por lo que tanto la cromatografía de filtración en gel como la cromatografía de interacción hidrofóbica se ven negativamente afectadas. Además, la elevada concentración de "PEG activado" puede precipitar la proteína, un problema que ya se había observado anteriormente (Davis, patente americana U.S. 4.179.337). Por otra parte, la química del aldehído (Royer, patente americana U.S. 4.002.531) es más eficiente ya que solamente requiere un exceso molar de 40 veces de PEG y de 1-2 h de incubación. Sin embargo, el dióxido de manganeso sugerido por Royer para la preparación del aldehído de PEG es problemático "debido a la tendencia pronunciada del PEG de formar complejos con agentes oxidantes con base de elementos metálicos" (Harris y col., *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 22:341-352 [1984]). La utilización de la oxidación de moffatt, con DMSO y anhídrido acético, solventa este problema. Además, el borohidrato de sodio sugerido por Royer debe utilizarse a un pH alto y tiene una tendencia significativa para reducir enlaces disulfuro. En cambio, es preferible el cianoborohidruro de sodio, que es efectivo a un pH neutro y tiene una leve tendencia a reducir los enlaces disulfuro.

Los conjugados de la presente invención se separan de los materiales iniciales que no han reaccionado mediante filtración en gel. De la misma manera, las especies heterólogas de los conjugados se purifican una de otra.

El polímero también puede ser insoluble en agua, como un gel hidrofílico o un artículo de determinada forma como un tubo quirúrgico en la forma de un catéter o un conducto de drenaje.

El ADN que codifica las parejas de unión al ligando se sintetiza mediante procedimientos *in vitro* o se obtiene fácilmente a partir de librerías de cADN. Los procedimientos para la creación sintética del ADN, bien manualmente o con ayuda de aparatos automáticos, son generalmente bien conocidos por un experto en la materia, en particular a la luz de las enseñanzas aquí contenidas. Como ejemplos del estado actual de las técnicas relacionadas con la síntesis de polinucleótidos, ver Maniatis y col., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1984), y Horvath y col., An Automated ADN synthesizer Enmploying Deoxynucleoside 3'-Phosphoramidites, *Methods in Enzymology* 154:313-326, 1987.

Generalmente, se utilizan los procariotas para el clonaje de secuencias de ADN en la construcción de vectores de utilidad en la invención. Por ejemplo, la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC No. 31446) es de particular utilidad. Otras cepas microbianas que pueden utilizarse incluyen *E. coli* B y *E. coli* X1776 (ATCC No. 31537). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes. Alternativamente, son adecuados los procedimientos de clonaje *in vitro*, p.ej. la reacción en cadena de la polimerasa.

Los polipéptidos de esta invención se expresan directamente en el cultivo de células recombinantes como un análogo de metionil N-terminal, o como una fusión con un polipéptido heterólogo al híbrido/porción, preferentemente con una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de corte específico en el extremo N-terminal del híbrido/porción.

Los nuevos polipéptidos se pueden expresar en cualquier célula huésped, pero preferentemente se sintetizan en huéspedes de mamífero. Sin embargo, también son útiles para la expresión las células huésped de procariotas, hongos, levaduras, insectos y similares. Ejemplos de procariotas son las cepas adecuadas para el clonaje como *E. coli* W3110 (F-' λ '-prototrófico, ATCC No. 27325), otras enterobacteriáceas como *Serratia marcesans*, bacilli y diversas pseudomonas. Preferentemente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas.

Los huéspedes de expresión se transforman de forma típica con el ADN que codifica el híbrido que ha sido ligado en un vector de expresión. Tales vectores contienen generalmente un origen de replicación (aunque no es necesario si tiene lugar la integración cromosómica). Los vectores de expresión también incluyen secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en las células transformadas, como se discutirá más adelante. Por ejemplo, *E. coli* se transforma de forma típica utilizando un pBR322, un plásmido derivado de una especie *E. coli* (Bolívar, y col., *Gene* 2: 95 (1977)). El pBR322 contiene genes para la resistencia a ampicilina y tetraciclina y por ello proporciona medios fáciles para la identificación de células transformadas, tanto para clonar o expresar. Los vectores

de expresión también contendrán de forma óptima secuencias que son de utilidad para el control de la transcripción y la traducción, p.ej., secuencias promotoras y de Shine-Dalgarno (para procariotas) o promotores e incrementadores (para células de mamífero). Los promotores pueden ser, aunque no es obligatorio, inducibles; sorprendentemente, incluso promotores constitutivos poderosos como el promotor CMV de huéspedes de mamífero producen LHR sin

causar toxicidad en la célula huésped. Aunque es concebible que los vectores de expresión no necesiten contener ningún elemento control de expresión, orígenes de replicación o genes de selección, su ausencia puede dificultar la identificación de los transformantes híbridos y el lograr un alto nivel de expresión de la inmunoglobulina híbrida.

Los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas incluyen como ejemplo los sistemas del promotor de la β -lactamasa y la lactosa (Chang y col., *Nature*, 275:615 [1978]; y Goeddel y col., *Nature*, 281:544 [1979]), el sistema del promotor de la fosfatasa alcalina, del triptófano (trp) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 [1980] y la solicitud de patente europea EPO Appln. Publ. No. 36.776) y los promotores híbridos como el promotor tac (H. de Boer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 [1983]). Sin embargo, también son adecuados otros promotores bacterianos funcionales. Sus secuencias nucleotídicas son generalmente conocidas, por lo que se permite al trabajador experto en la materia su ligación con el ADN codificante (Siebenlist y col., *Cell*, 20:269 [1980]) mediante la utilización de engarces o adaptadores para aportar cualquier diana de restricción necesaria. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente con el ADN codificante.

Además de los procariotas, también son adecuados los microbios eucariotas como las levaduras o los hongos filamentosos. *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo eucariota más comúnmente utilizado, aunque otras muchas cepas están disponibles comercialmente. El plásmido YRp7 es un vector de expresión satisfactorio en levaduras (Stinchcomb, y col., *Nature*, 282:39 [1979]; Kingsman y col., *Gene*, 7: 141 [1979]; Tschemper y col., *Gene*, 10: 157 [1980]). Este plásmido ya contiene el gen trp1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en ausencia de triptófano, por ejemplo la ATCC No. 44076 o la PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 [1977]). La presencia de la lesión trp1 como una característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para la detección de la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano.

Secuencias promotoras adecuadas para utilizar con huéspedes de levadura incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.* 255:2073 [1980]) u otras enzimas glicolíticas (Hess y col., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 [1968]; y Holland, *Biochemistry* 17:4900 [1978]), como la enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y las enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para utilizar en la expresión de levaduras se describen con mayor detalle en R. Hitzeman y col., patente europea EP 73.73.557A.

Las secuencias control de la expresión son bien conocidas en eucariotas. En general, todos los genes eucariotas tienen una región rica en A-T localizada a aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Otra secuencia que se halla a unas 70 a 80 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción de muchos genes es la región CXCAAT donde X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas se halla una secuencia AATAAA que puede ser la señal de adición de la cola poliA en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan en los vectores de expresión de mamíferos.

Se obtienen fácilmente promotores adecuados para el control de la transcripción de vectores en células huésped de mamífero a partir de diversas fuentes, por ejemplo, los genomas de virus como el virus del polioma, SV40, adenovirus, MMV (inducible por esteroides), retrovirus (p.ej., el LTR o el VIH), el virus de la hepatitis B y más preferentemente el citomegalovirus, o a partir de promotores heterólogos de mamífero, p.ej. el promotor de la beta actina. Los promotores tardío y temprano de SV40 se obtienen de forma conveniente de un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. Fiers y col., *Nature*, 273: 113 (1978). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de forma conveniente como un fragmento de restricción HindIII. Greenaway, P.J. y col., *Gene* 18:355-360 (1982).

La transcripción de un ADN que codifica para la inmunoglobulina híbrida y/o porciones del híbrido por eucariotas superiores se incrementa mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Las secuencias intensificadoras son elementos de ADN que actúan en cis, generalmente de unas 10-300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Las secuencias intensificadoras tienen una orientación y posición relativamente independiente, se han hallado en 5' (Laimins, L. y col., *PNAS* 78:993 [1981] y en 3' (Lusky, M.L. y col., *Mol. Cell. Biol.* 3: 1108 [1983]) de la unidad de transcripción, dentro de un intrón (Banerji, J.L. y col., *Cell* 33:729 [1983]), así como también dentro de la propia secuencia codificante (Osborne, T.F., y col., *Mol. Cell. Biol.* 4:1293 [1984]). Se conocen actualmente muchas secuencias intensificadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, se utilizará de forma característica una secuencia intensificadora de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen la secuencia intensificadora de SV40 en el sitio tardío del origen de replicación

(pb 100-270), la secuencia intensificadora del promotor temprano de citomegalovirus, la secuencia intensificadora del polioma en el sitio tardío del origen de replicación y las secuencias intensificadoras del adenovirus.

Los vectores de expresión que se utilizan en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción, que puedan afectar la expresión del mRNA. Estas regiones se transcriben como segmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica la inmunoglobulina híbrida. Las regiones 3' no traducidas también incluyen los sitios de finalización de la transcripción.

Los vectores de expresión pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables de células de mamífero son la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidina quinasa (TK) o la neomicina. Cuando tales marcadores seleccionables se transfieren con éxito a la célula huésped de mamífero, ésta es capaz de sobrevivir si se la coloca bajo presión selectiva. Existen dos categorías distintas ampliamente utilizadas de regímenes de selección. La primera categoría se basa en el metabolismo de las células y en la utilización de una línea celular mutante que carece de la capacidad de crecer de forma independiente de un medio suplementado. Dos ejemplos son las células CHO DHFR- y las células de ratón LTK-. Estas células carecen de la capacidad de crecer sin la adición de nutrientes como timidina o hipoxantina. Debido a que estas células carecen de ciertos genes necesarios para una vía de síntesis de ácidos nucleicos completa, no pueden sobrevivir si no se les proporciona el nucleótido carente en un medio suplementado. Una alternativa al medio suplementado es introducir un gen DHFR o TK intacto en las células carentes de los respectivos genes, alterando así sus requerimientos de crecimiento. Las células individuales que no fueron transformadas con el gen DHFR o el TK no serán entonces capaces de sobrevivir en un medio no suplementado.

La segunda categoría de regímenes selectivos es la selección dominante que hace referencia a un esquema de selección utilizado con cualquier tipo de células y no requiere la utilización de una línea celular mutante. Estos esquemas utilizan típicamente un fármaco para parar el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transformen con éxito con un gen heterólogo expresan una proteína que les confiere resistencia al fármaco y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de tal selección dominante utilizan los fármacos neomicina (Southern y col., *J. Molec. Appl. Genet.* 1: 327 (1982)), ácido micofenólico (Mulligan y col., *Science* 209:1422 (1980)) o higromicina (Sudgen y col., *Mol. Cell. Biol.* 5:410-413 (1985)). Los tres ejemplos dados anteriormente utilizan genes bacterianos bajo control eucariótico para convertir la resistencia al fármaco G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente.

Células huésped eucariotas adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina híbrida incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecer en cultivo en suspensión, Graham, F.L. y col., *J. Gen. Virol.*, 36:59 [1977]); células de riñón de bebé hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *PNAS* (USA) 77:4216, [1980]); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23:243-251 [1980]); células de riñón de mono (CV1ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); y células TRI (Mather, J.P. y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 [1982]).

La construcción de vectores adecuados que contienen las secuencias codificantes y control deseadas emplea las técnicas de ligación estándares. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN se cortan, se forman extremos compatibles y se religan en la forma deseada para producir los plásmidos requeridos.

En el análisis para confirmar la presencia de secuencias correctas en los plásmidos construidos, las mezclas de ligación se utilizan para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31446) y se seleccionan los transformantes con éxito mediante su resistencia a ampicilina o tetraciclina, según sea el caso. Se preparan plásmidos a partir de los transformantes, y se analizan mediante restricción y/o secuenciación por el procedimiento de Messing y col., *Nucleic Acids Res.* 9:309 (1981) o mediante el procedimiento de Maxam y col., *Methods in Enzymology* 65:499 (1980).

Se transforman las células huésped con los vectores de expresión de la presente invención y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según se requiera para inducir los promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y similar, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para cualquier experto en la materia.

Las células huésped referidas en esta descripción abarcan las células en cultivo *in vitro* así como las células dentro del animal huésped.

La "transformación" significa la introducción de ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica. Salvo que se indique lo contrario, el procedimiento utilizado aquí para la transformación de las células huésped es el procedimiento de Graham, F. y van der Eb, A., *Virology* 52:456-457 (1973). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para la introducción de ADN en las células como la inyección nuclear o la fusión de protoplastos. Si se utilizan células procariotas o células

que contienen una importante pared celular, el procedimiento preferido de transfección es el tratamiento con calcio utilizando cloruro cálcico tal como se describe por Cohen, F.N. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 69:2110 (1972).

La "transfección" hace referencia a la introducción de ADN en una célula huésped independientemente de que se exprese cualquiera de las secuencias codificantes que contiene dicho ADN. Numerosos procedimientos de transfección son conocidos por cualquier experto en la materia, por ejemplo, CaPO_4 y la electroporación. La transformación de células huésped es el indicio de una transfección con éxito.

El polipéptido nuevo se recupera y purifica a partir de los cultivos de células recombinantes mediante procedimientos conocidos, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de inmutafinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. Otros procedimientos de purificación conocidos dentro del ámbito de la presente invención utilizan carbohidratos, el factor de crecimiento epitelial, o dominios del complemento inmovilizados. Además, la HPLC de fase inversa y la cromatografía que utiliza ligandos para la inmunoglobulina híbrida son útiles para la purificación del híbrido. De preferencia, pueden estar presentes concentraciones bajas de iones calcio (aproximadamente 1-5 mM) durante la purificación. La purificación se realiza preferentemente en presencia de un inhibidor de proteasas como el PMSF.

La selección de parejas de unión al ligando con afinidad específica para determinados tejidos incrementa de forma clara la capacidad de liberación de los agentes terapéuticos que son estables, tienen vidas medias relativamente largas y son capaces de recortarse de forma precisa sin experimentación excesiva.

El nuevo polipéptido se dispone en formulaciones isotónicas estériles junto con los cofactores necesarios y se administra de forma opcional mediante métodos estándares bien conocidos en la materia. La formulación es preferentemente líquida, y es generalmente una solución salina fisiológica que contiene calcio 0,5-10 mM, tampón no fosfatado a pH 6,8-7,6, o puede ser un polvo liofilizado.

Es preferible que la ruta principal para la administración terapéutica sea la liberación intravenosa, o la liberación a través de catéter u otro conducto quirúrgico. Rutas alternativas incluyen tabletas y similares, nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas e inhalación de receptores liofilizados o aerosolizados. Las formulaciones líquidas se pueden utilizar después de la reconstitución de formulaciones en polvo.

El nuevo polipéptido también puede administrarse mediante microesferas, liposomas u otros sistemas de liberación de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos, incluyendo la sangre. Ejemplos adecuados de transportadores de liberación sostenida incluyen las matrices de polímeros semipermeables en la forma de artículos con formas determinadas, p.ej., supositorios, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen los poliláctidos (patente americana U.S. 3.773.919, patente europea EP 58.481), copolímeros del ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (U. Sidman y col., 1985, *Biopolymers* 22 (11):547-556), poli(2-hidroxiethyl-metacrilato) o etilén vinil acetato (R. Langer y col., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-227 y R. Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105). Los liposomas que contienen la inmunoglobulina híbrida se preparan mediante procedimientos bien conocidos: patente danesa DE 3.218.121A; Epstein y col., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692; Hwang y col., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030-4034; patentes europeas EP 36676A, EP 88046A, EP 143949A, EP 142541A; solicitud de patente japonesa 83-11808; patentes americanas U.S. 4.485.045 y 4.544.545; y UP 102.342A. Generalmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en donde el contenido lipídico es superior a 30 mol.% de colesterol, la proporción seleccionada se ajusta a la tasa óptima de liberación sostenida del polipéptido.

Las preparaciones polipeptídicas de liberación sostenida se implantan o inyectan en la proximidad del sitio de inflamación o terapia, por ejemplo adyacentes a las articulaciones artríticas o a los nódulos linfáticos periféricos.

Las dosis de los nuevos polipéptidos administrados dependerán de las propiedades del híbrido utilizado, p.ej. su actividad de unión y la vida media plasmática *in vivo*, la concentración del híbrido en la formulación, la ruta de administración del híbrido, el sitio y la tasa de dosificación, la tolerancia clínica del paciente implicado, la condición patológica que lo afecta y similar, así como también dependerán de la competencia del clínico.

Los polipéptidos de la presente invención, pueden administrarse solos o junto con otros agentes farmacológicos utilizados para tratar las condiciones citadas anteriormente, como antibióticos, agentes antiinflamatorios y agentes antitumorales. También puede ser útil administrar el polipéptido junto con otras proteínas terapéuticas como el interferón gamma y otros inmunomoduladores.

Con el fin de facilitar la comprensión de los ejemplos siguientes se describirán algunos procedimientos y/o términos utilizados corrientemente.

Los "plásmidos" se denominan mediante una p en minúscula precedida y/o seguida por letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos iniciales de la presente invención están disponibles comercialmente, disponibles al público sin restricciones, o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos publicados. Además, los plásmidos equivalentes a los descritos son conocidos en la materia y serán evidentes para cualquier experto en la materia.

En particular, es preferible que estos plásmidos tengan todas o alguna de las características siguientes: (1) contener un número mínimo de secuencias del organismo huésped; (2) ser estables en el huésped deseado; (3) ser capaces de estar presente en un número elevado de copias en el huésped deseado; (4) tener un promotor regulable; y (5) tener al menos una secuencia de ADN que codifica una característica seleccionable presente en una porción del plásmido separada del lugar donde se insertará la secuencia de ADN nueva. La alteración de plásmidos para alcanzar los criterios anteriores se realiza fácilmente por aquellos expertos en la materia a la luz de la literatura disponible y de las enseñanzas de la presente invención. Se sobreentenderá que pueden existir en la actualidad vectores de clonaje adicionales, o se descubrirán nuevos vectores que tengan las propiedades anteriormente indicadas y sean por ello adecuados para utilizar en la presente invención, por lo tanto dichos vectores se contemplan también dentro del ámbito de la presente invención.

La “digestión” de ADN hace referencia al corte catalítico del ADN con una enzima de restricción que actúa sólo en ciertas secuencias del ADN. Las diversas enzimas de restricción utilizadas aquí están disponibles comercialmente y sus condiciones de reacción y otros requisitos se utilizaron como es conocido por cualquier experto en la materia. Con fines analíticos, se utiliza generalmente 1 μ g de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 2 unidades de enzima en unos 20 μ l de solución tamponada. Para el propósito de aislamiento de los fragmentos de ADN para la construcción del plásmido, se digiere generalmente de 5 a 50 μ g de ADN con 20 a 250 unidades de enzima en un gran volumen. Las cantidades de tampón y sustrato a utilizar para cada enzima determinado se especifican por el fabricante. Los tiempos de incubación son de aproximadamente 1 hora a 37°C, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones suministradas. Después de la digestión la reacción se migra directamente en una electroforesis en gel de poliacrilamida para aislar el fragmento deseado.

La separación por tamaño de los fragmentos de restricción se realiza utilizando un gel de poliacrilamida del 8 por ciento descrito por Goeddel, D. y col., *Nucleic. Acids Res.*, 8:4057 81980).

La “desfosforilación” hace referencia a la eliminación de los fosfatos 5' mediante el tratamiento con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP). Este procedimiento evita que los dos extremos digeridos por restricción de un fragmento de ADN se “recircularicen” o formen un bucle cerrado que impida la inserción de otro fragmento de ADN en el sitio de restricción. Los procedimientos y reactivos para la desfosforilación son convencionales. Maniatis, T. y col., *Molecular Cloning* pág. 113-134 (1982). Las reacciones que utilizan BAP se llevan a cabo en Tris 50 mM a 68°C para suprimir la actividad de cualquier exonucleasa que esté presente en las preparaciones enzimáticas. Las reacciones se llevan a cabo durante 1 hora. Después de la reacción, el ADN se migra en una electroforesis en gel y se purifica del gel.

Los “oligonucleótidos” hacen referencia a un polidesoxinucleótido de cadena sencilla o a dos cadenas de polidesoxinucleótidos complementarias que pueden sintetizarse químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos no tienen fosfato 5' y por lo tanto no se ligarán con otro oligonucleótido sin la adición de un fosfato con un ATP en presencia de una quinasas. Un oligonucleótido sintético se ligará a un fragmento que no se ha desfosforilado.

La “ligación” hace referencia a la formación de enlaces fosfodiésteres entre fragmentos de ácido nucleico de doble cadena (Maniatis, T. y col., *Id.* pág. 146). Salvo que se especifique lo contrario, la ligación se realiza utilizando tampones y condiciones conocidas con 10 unidades de T4 ADN ligasa (“ligasa”) por cada 0,5 μ g de cantidades equimolares aproximadamente de los fragmentos de ADN a ligar.

El “relleno” o “formación de extremos romos” hace referencia a procedimientos mediante los cuales el extremo de cadena sencilla en un extremo protuberante de un ácido nucleico digerido con una enzima de restricción se convierte en una cadena doble. Esto elimina los extremos protuberantes y forma extremos romos. Este proceso es una herramienta versátil para convertir un extremo de corte de restricción que puede ser protuberante con los extremos creados por sólo una o unas pocas enzimas de restricción en un extremo compatible con cualquier endonucleasa de restricción que produce extremos romos u otro extremo protuberante relleno. Típicamente, la formación de extremos romos se logra mediante incubación de 2-15 μ g del ADN diana en tampón de MgCl₂ 10 mM, ditiotritol 1 mM, NaCl 50 mM, Tris 10 mM (pH 7,5) a aproximadamente 37°C en presencia de 8 unidades de fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y 250 μ M de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato. La incubación se finaliza generalmente al cabo de 30 min y se realiza una extracción con fenol y cloroformo y una precipitación con etanol.

Actualmente se piensa que la estructura tridimensional de las composiciones de la presente invención es importante para su funcionamiento tal como se ha descrito aquí. Por ello, todos los análogos estructurales relacionados que mimeticen la estructura activa de los formados por las composiciones reivindicadas aquí se incluyen específicamente dentro del ámbito de la presente invención.

Se entiende que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o situación específico se hallará dentro de las capacidades de cualquier experto en la materia a la luz de las enseñanzas aquí contenidas. Procesos representativos para el aislamiento, utilización y fabricación de moléculas de inmunoglobulina-LHR híbridas aparecen más adelante, y son ilustrativos de la invención aunque se refieren al receptor de localización de linfocitos.

Ejemplos

Todas las referencias, en estos ejemplos, al anticuerpo monoclonal “Mel 14” o a “Mel 14” hacen referencia a un anticuerpo monoclonal dirigido contra una forma murina determinada de una proteína de superficie de linfocitos, como se describe por Gallatin, y col., *supra*, *Nature*, 303:30 (1983).

Ejemplo 1

*Purificación y clonaje de MLHR*5 *Aislamiento de un clon de cADN que codifica el MLHR*

La MLHR se aisló de bazo de ratón tratados con detergente mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando el anticuerpo monoclonal Mel 14.

10 En una preparación típica, se trocearon 300 bazos de ratones hembras ICR (16 semanas) y luego se homogeneizaron con un molinillo de tejidos Potter-Elvehjem en 180 ml de TritonX-100 al 2% en PBS-Dulbecco que contenía PMSF 1mM y aprotinina al 1%. La lisis se continuó durante 30 minutos en un agitador a 4°C. El lisado se centrifugó sucesivamente a 2.000 g durante 5 minutos y a 40.000 g durante 30 minutos.

15 El sobrenadante se filtró a través de un filtro Nitex preaclorado mediante adsorción con suero de rata conjugado con Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (10 ml de gel empaquetado). El suero de rata se diluyó a 1:10 para la conjugación, la cual se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aplicó el flujo a una columna de 3 ml conjugada con anticuerpo MEL-14 a 0,5 mg por ml de Sepharose 4B. Todos los tampones de la columna contenían azida de sodio al 0,02%.

20 La columna se lavó con 25 ml de Triton X-100 al 2% en PBS seguido por 25 ml de CHAPS 10 mM en el mismo tampón. El antígeno se liberó mediante la adición de 10 ml de CHAPS 10 mM en glicina 100 mM, NaCl 200 mM, pH 3 y se neutralizó recogiendo en 1 ml de Tris-HCl pH 7,6. Después de lavar la columna con trietilamina 20 mM, NaCl 200 mM, pH 11 y reequilibrarse en CHAPS 10 mM en PBS, el antígeno neutralizado, se diluyó en 100 ml del tampón de la columna, se reaplicó a la columna y se repitieron las etapas de lavado y liberación.

La proteína purificada se concentró en un Centricon 30 (Amicon, Inc.) y se analizó mediante SDS-PAGE (acrilamida al 7,5%) con la utilización de tinción de plata para su visualización. Una purificación típica produjo de 30-40 µg de antígeno por 300 ratones, basándose en la comparación con los estándares de orosomucoides.

30 En resultados no mostrados, un gel de poliacrilamida del material purificado mostró una banda difusa de migración a aproximadamente 90.000 daltons y una proteína de peso molecular superior a aproximadamente 180.000 daltons. El cociente del componente de 90.000 daltons con relación al de 180.000 daltons fue de 10:1 o superior en todas las amplias series de preparaciones. El material se visualizó mediante tinción de plata de un gel de poliacrilamida al 10%.

35 La degradación de Edman de fase gaseosa de la banda de 90.000 daltons dio como resultado la identificación de una secuencia N-terminal única (Fig. 4A), incluyendo el aminoácido del extremo más N-terminal. Se identificaron 38 aminoácidos en el extremo N-terminal, con cuatro huecos (X) en las posiciones 1, 19, 33 y 34. La asparagina (N) en la posición 22 se dedujo de la ausencia de una señal aminoacídica en esta posición combinada con los residuos siguientes de tirosina (Y) y treonina (T), lo que dio como resultado una secuencia consenso de sitio de glicosilación (NXT/S).

40 La secuencia de 13 residuos que se muestra en la Fig. 4A en el extremo N-terminal de 38 residuos de largo es la que se dedujo previamente por Siegelman y col., *supra* mediante secuenciación aminoacídica radioactiva, que muestra un alto nivel de homología (11 de 13 residuos) con la secuencia de la LHR determinada aquí.

45 No se obtuvo ninguna secuencia de ubiquitina a partir de las tres migraciones de secuencia que se realizaron con dos preparaciones de MLHR por separado. Seguramente, esta modificación estaba ausente en los esplenocitos de ratón, o el extremo N-terminal de la ubiquitina se bloqueó durante la degradación de Edman en la LHR de esta fuente.

50 La secuencia de aminoácidos de la Fig. 2 se comparó con secuencias conocidas en la base de datos de proteínas de Dayhoff, mediante la utilización del algoritmo de Lipman, D. y col., *Science* 227:1435-1441 (1981).

55 Los residuos que están subrayados en la Fig. 4A entre los aminoácidos 7 y 15 se eligieron para producir la sonda oligonucleotídica que se muestra en la Fig. 4B. Una sonda oligonucleotídica de 26-mer 32 veces redundante se diseñó a partir de estos residuos y se sintetizó en un sintetizador de oligonucleótidos Applied Biosystems. Todas las redundancias posibles se incluyeron en esta sonda, con la excepción de la prolina en posición 9, donde el codón CCC se eligió basándose en las reglas de utilización de codones de mamíferos.

60 El rastreo de una librería de cADN de bazo murina, obtenida a partir de bazos diseccionados de ratones con esta sonda, dio como resultado el aislamiento de un sólo clon de cADN que hibridaba. Se sembraron 600.000 calvas a 50.000 fagos por placa (12 placas) de una librería de cADNs en lambda gt10 cebada con oligo-dT, de 10 bazos murinos obtenida a partir de mRNA aislados de esplenocitos murinos con 5 µg/ml de Concanavalina A durante 6 horas. Las placas se hibridaron con la sonda oligonucleotídica de 26-mer 32 veces redundante que se muestra en la Fig. 4B, en tampón de formamida al 20%, 5XSSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardtts 5X, sulfato de dextrano al 10% y 20 µg/ml de esperma de salmón troceado y desnaturalizado a 42°C durante toda la noche. Estos parámetros hacen referencia aquí a "condiciones de estrictencia". Los filtros se lavaron en 1XSSC, SDS al 0,1% a 42°C durante 2X 30 min y se autoradiografiaron a -70°C durante toda la noche. Un clon positivo duplicado se rastreó de nuevo, se aisló en inserto *EcoRI* y se insertó en los vectores M13 o PUC 118/119

y se determinó la secuencia nucleotídica a partir de moldes de cadena sencilla utilizando cebadores específicos de la secuencia.

La Figura 2 muestra la secuencia de ADN completa del inserto *EcoRI* de 2,2 Kb contenido en este bacteriófago. El mayor marco de lectura abierto se inicia con un codón metionina en la posición 106-108. Se halló una homología con la caja Kozak alrededor de este codón metionina, lo que sugiere que probablemente este codón funcione iniciando la traducción proteica. Una secuencia proteica de 373 aminoácidos de aproximadamente 42.000 daltons de peso molecular está codificada en este marco de lectura abierto. La proteína traducida muestra una secuencia desde el residuo 40 al 76 que corresponde exactamente con la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal determinada a partir de la MLHR aislada.

Este resultado sugiere que el extremo maduro N-terminal de la MLHR se inicia con el residuo de triptófano en la posición 39. Sin embargo, se cree que puede haber ocurrido algún proceso proteolítico del extremo N-terminal actual de la LHR durante el aislamiento de la proteína.

Un perfil de hidrofobicidad de la proteína puso de manifiesto un dominio hidrofóbico localizado en el extremo N-terminal que podría funcionar como una secuencia señal para la inserción en el lumen del retículo endoplasmático. La secuencia deducida para las posiciones 39 a 333 es predominantemente hidrofílica seguida por un dominio de 22 residuos hidrofóbico, que es característico de un dominio de parada de transferencia o de anclaje de membrana.

La región intracelular putativa en el extremo C-terminal de la proteína es bastante corta, sólo 17 residuos de longitud. En el sitio inmediato al C-terminal del dominio transmembrana existen diversos aminoácidos básicos, un hecho típico de uniones entre anclajes de membrana y dominios citoplasmáticos de receptores de superficie celular, Yarden y col., *Nature*. Un sólo residuo de serina, potencialmente un sitio para la fosforilación, está presente dentro del dominio citoplasmático putativo.

La proteína contiene diez sitios de N-glicosilación potenciales, estando todos ellos dentro del dominio extracelular que sobresale. La ausencia de asparagina en la posición 60 (residuo 22 de la proteína madura) en el análisis de secuencia peptídica confirma la glicosilación en este sitio y establece la orientación extracelular de esta región. La región codificante contiene un total de 25 residuos de cisteína, aunque 4 de estos residuos de cisteína están localizados en la secuencia líder putativa.

Motivos proteicos dentro de la MLHR

Como se muestra en la Fig. 6, la comparación de la secuencia aminoacídica de MLHR deducida con otras proteínas de la base de datos de secuencia proteica de Dayhoff mediante la utilización del programa fastp (Lipman, D., y Pearson, W., *Science*, 227:1435-1441, 1985) puso de manifiesto diversas homologías de secuencia interesantes.

Las proteínas con los niveles de homología de secuencia más elevados se muestran con cajas que rodean las regiones de mayor homología de secuencia. Los números en el inicio de las secuencias muestran la posición dentro de las proteínas donde estas secuencias homólogas se localizan.

La Fig. 6A muestra que el motivo del extremo N-terminal de la LHR (residuos 39 a 155) tiene ciertas homologías de proteína de unión con carbohidratos, como se indica (el porcentaje de homología de estas secuencias con la MLHR se muestra entre paréntesis, y las referencias indicadas se proporcionan después de los Ejemplos): Drickamer, los residuos aminoacídicos hallados por Drickamer y col., (1); MuLHR, la secuencia de MLHR; Hu.HepLec (27,8%), lectina hepática humana (2); Barn. lec (25%), lectina de percebe (3); Ra.HepLec (23,5%), lectina hepática de rata (4); Ch.HepI.Lec (27,5%), lectina hepática de pollo (5); Hu.IgERec (28,6%), receptor de IgE humano (6); RaHepLec2 (22,6%), lectina hepática de rata 2 (7); Ra.ASGRec (22,6%), receptor de asialoglicoproteína de rata (8); RA.IRP (25,6%), proteína de regeneración de islotes de rata (9); Ra.MBP (26,1%), proteína de unión a manosa de rata (10); RA.MBDa (26,1%), precursor de la proteína de unión a manosa de rata A (11); RA.KCBP (27%), proteína de unión de células Kupffer de rata (12); FlyLec (23,1%), lectina del moscón gris de la carne (Sarcophaga) (13); y Rab.Surf (20,9%), tensoactivo de pulmón de conejo (14).

Como se puede ver en la Fig. 6A se muestra que el motivo localizado en el extremo N-terminal de la LHR muestra un nivel elevado de homología con varias lectinas animales dependientes de calcio, es decir, lectinas de tipo C (1). Estas incluyen pero no se limitan a, diversas proteínas de unión de azúcares hepáticos del pollo, rata y humanos, lectinas de unión a manosa soluble, una lectina de células Kupffer, el receptor de asialoglicoproteína, una proteína del core de proteoglicano del cartílago, apoproteínas tensoactivas pulmonares y dos lectinas de invertebrados del moscón gris de la carne y del percebe. A pesar del adjetivo "invariante" para los aminoácidos reconocido inicialmente por Drickamer y col., *supra*, como una característica común de las lectinas animales de tipo C, éstas no tienen todas una secuencia completamente conservada en el dominio de unión al carbohidrato de la MLHR, aunque el grado de homología en estos residuos y en otras posiciones es evidente. Las lectinas conocidas pertenecientes a la familia de tipo C presentan un margen de especificidades de unión a azúcares, incluyendo los oligosacáridos con galactosa terminal, N-acetilglucosamina y manosa (1).

El hecho de que existan muchos residuos que son invariantes en todas estas proteínas de unión a carbohidratos, sugiere de forma importante que esta región funciona como un dominio de unión al carbohidrato en la MLHR y

explica aparentemente la capacidad observada de los linfocitos para unirse al endotelio especializado del tejido linfoide, dependiendo su unión al azúcar de la presencia de calcio. En algunas realizaciones, en la práctica de la presente invención se utiliza el dominio de unión al carbohidrato de la LHR sólo, sin ninguna región flanqueante.

- 5 El próximo motivo (residuos 160-193) que se halla casi inmediatamente después del dominio de unión al carbohidrato muestra un elevado grado de homología con la familia de factores de crecimiento epitelial (egf). La Fig. 6B muestra las homologías con el factor de crecimiento epitelial (egf): MLHR, secuencia de MLHR; Notch (38,5%), locus notch de *Drosophila melanogaster* (15); S. purp (31,7%), proteína semejante al egf de *Strongylocentrotus purpuratus* (16); Pro.Z (34,1%), proteína Z bovina (17); Fact. X (34,2%), factor de coagulación X (18); Fact. VII (27,3%), factor VII de coagulación (19); Fact. IX (33,3%), factor IX de coagulación (20); Lin-12 (32,1%), locus Lin-12 de *Caenorhabditis elegans* (21); Fact. XII (26%), factor de coagulación XII (22); y Mu.egf (30%), egf murino (23).

- Como se puede ver en la Fig. 6B, el mayor grado de homología en esta región de la MLHR se halló con el locus neurogénico de *Drosophila*, notch, aunque también existe homología significativa con otros miembros de esta gran familia. La localización variable de este dominio entre los miembros de esta familia sugiere que esta región puede estar contenida dentro de un segmento genómico que puede hallarse en proteínas diferentes para funciones distintas.

- Además de los 6 residuos de cisteína, por término general todos los miembros de esta familia comparten tres residuos de glicina. La conservación de los residuos de cisteína y glicina es consistente con la posibilidad de un papel estructural para esta región en la LHR. Se cree que este dominio puede colocar el extremo N-terminal localizado en la región de unión al carbohidrato en una orientación adecuada para la interacción con el ligando. Además se cree que este dominio puede servir para reforzar la interacción entre el linfocito y el endotelio mediante la unión con un homólogo del receptor de egf sobre una superficie endotelial.

- 25 El motivo de la proteína final en la región extracelular de la MLHR está codificado por los aminoácidos 197 a 328. Esta región de la glicoproteína contiene dos repeticiones directas de una secuencia de 62 residuos que contiene un motivo aminoacídico con elevada homología con diversas proteínas de unión del factor del complemento (Fig. 6C).

- La Fig. 6C muestra las homologías de la proteína de unión al complemento: MLHR, secuencia de MLHR; Hu-ComH (31,9%), precursor H de la proteína del complemento humana (24); MuComH (28,9%), precursor H de la proteína del complemento murina (25); HuBeta (25,6%), glicoproteína I beta-2 humana (26); HuCR1 (29,9%), CR1 humana (27); EBV/3d (25,6%), receptor del virus de Epstein-Barr humano/Cd3 (28); HuC2 (27,1%), precursor del complemento humano (29); HuB (23,1%), factor B del complemento humano (30); MuC4b (22%), precursor de unión de C4b murino (31); HuC1s (29,2%), zimógeno C1s humano (32); HuC4b (26,1%), proteína de unión a C4b humana (33); HuDAF (27,1%), factor de deceleración humana (34); VacSecP (26,2%), péptido secretor del virus vaccinia (35).

- Estas proteínas, que codifican un amplio margen de múltiplos de este dominio repetido, incluyen, entre otras, los precursores del complemento H humano y murino, la glicoproteína beta 2 humana, el receptor del virus de Epstein Barr/Cd3, la proteína de unión de C4b humana, el factor de deceleración y el polipéptido secretor del virus vaccinia.

- La Figura 7C muestra las homologías entre las dos repeticiones directas halladas en la MLHR y en las halladas en las proteínas incluidas en la familia de unión al complemento. Muchos de los aminoácidos que están conservados en esta clase de proteínas de unión al complemento, incluyendo diversos residuos de cisteína conservados, también se hallan en las dos repeticiones en esta región de la MLHR.

- Es interesante remarcar, que las dos repeticiones contenidas dentro de la MLHR no son sólo duplicaciones exactas una de otra a nivel aminoacídico, sino que también muestran homología exacta a nivel de secuencia nucleotídica (residuos nucleotídicos 685-865 y 866-1056). Aunque es posible que este resultado sea debido a un artefacto de clonaje, se halló una región duplicada en varios otros clones aislados separadamente de una librería de cADN producida a partir de la línea celular que expresa la MLHR, 38C13 (disponible por la Universidad de Stanford, Palo Alto, California, U.S.A.), así como en una homóloga humana de la MLHR (que se discute más adelante). Además, varios genes, principalmente el gen Lp(a), muestran un elevado nivel de conservación de la secuencia de repetición intragénica de este dominio. Estos resultados sugieren que la MLHR, al igual que otros miembros de la familia de unión al complemento, contiene múltiples repeticiones de este dominio de unión.

- En conclusión, parece ser que la región extracelular de la MLHR contiene tres motivos proteicos separados que se han unido para brindar una nueva función o funciones. En la Fig. 7 se muestra un resumen de los motivos proteicos dentro de esta glicoproteína.

60 Ejemplo 2

Clonaje de la HuLHR

- En general, el clonaje de HuLHR se realizó como en el ejemplo descrito anteriormente. Se aisló el inserto *EcoR1* de 2,2 Kb del clon de cADN del antígeno de Mel 14 murino descrito anteriormente, se marcó mediante síntesis "random primed" con la ADN polimerasa y trifosfatos marcados con P³² a elevada actividad específica y se utilizó para rastrear los 600.000 clones de una librería de cADN en lambda gt10 cebada con oligo dT y obtenida a partir del mRNA de linfocitos de sangre periférica. Los filtros se hibridaron durante toda la noche a 42°C con formamida al 40%, 5XSSC

(1XSSC es NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), sulfato de dextrano al 10%, solución de 5X Denhardt y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón troceado y desnaturalizado. Los filtros se lavaron 2X40 min en 0,2XSSC, sodio dodecil sulfato al 0,1% a 55°C. Se repicaron 12 clones (aproximadamente 1 positivo por cada placa de 50.000 fagos), y se aisló el inserto *EcoR1* mayor (2,2 Kb) y se determinó la secuencia del ADN mediante secuenciación con dideoxinucleótidos en el bacteriófago m13 utilizando cebadores específicos de secuencia.

Este clon de 2,2 Kb codificaba para un marco de lectura abierto de 372 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 42.200 daltons que se iniciaba con una metionina precedida por una homología con la caja Kozak. La proteína codificada contenía 26 residuos de cisteína y 8 sitios de N-glicosilación potenciales. Una región altamente hidrofóbica en el extremo N-terminal de la proteína (residuos 20-33) fue una secuencia señal potencial, mientras que otra región altamente hidrofóbica localizada en el extremo C-terminal de 22 aminoácidos de longitud (residuos 335-357) fue una parada de transferencia potencial o dominio de anclaje de membrana. Esta región hidrofóbica en el extremo C-terminal estaba seguida por una región cargada, presumiblemente citoplasmática.

La comparación de la secuencia nucleotídica de este clon humano con la hallada previamente para la MLHR mostró un elevado grado de homología de secuencia de ADN (83%). Los grados relativos de conservación de secuencia aminoacídica entre la MLHR y la HuLHR en cada uno de los dominios de la LHR son: 83% para el dominio de unión al carbohidrato; 82% para el dominio semejante a egf; 79% para la repetición 1 de unión del complemento; 63% para la repetición 2 de unión del complemento; 71% para el dominio de unión del complemento en general; y 96% para el dominio transmembrana.

La comparación de la secuencia Hermes publicada, Jalkanen, *supra* con la secuencia HuLHR de la Fig. 1 muestra una falta de homología de secuencia.

Ejemplo 3

Expresión de la MLHR

Con el fin de comprobar de forma concluyente que el clon de cADN murino aislado aquí codificaba para la MLHR, se insertó el clon en un vector de expresión y se analizó en un ensayo de transfección celular transitoria. La expresión de la HuLHR se realizó de forma similar.

El fragmento *EcoR1* que contenía el marco de lectura abierto descrito anteriormente (fragmento *EcoR1* de 2,2 Kb cuya secuencia se muestra en la Fig. 2) se aisló y se ligó en el vector pRK5 que contiene un promotor de citomegalovirus (Eaton, D., y col., *Biochemistry* 25:8343-8347, 1986; patente europea EP 307247 publicada el 15 de marzo de 1989). Se seleccionó un plásmido que contenía el cADN insertado en la orientación correcta relativa al promotor y se transfectó en las células renales embrionales humanas 293 utilizando el método de la precipitación con CaPO₄.

Al cabo de dos días las células se incubaron con 500 microcuries de cisteína S³⁵ y metionina S³⁵. Se prepararon los lisados y los sobrenadantes como se describió previamente (Lasky, L., y col., *Cell*, 50:975-985, 1987) y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal Mel 14 (purificado mediante cromatografía de inmunoafinidad) utilizando un anticuerpo policlonal IgG anti-rata en un sándwich entre el anticuerpo monoclonal Mel 14 y la proteína A Sepharose.

Al mismo tiempo, el linfoma de células B, 38C13, una línea celular que expresa la MLHR, se marcó metabólicamente con metionina o cisteína, para el análisis de la MLHR del sobrenadante, o se marcaron las glicoproteínas de superficie celular con I¹²⁵ y lactoperoxidasa para el análisis de la LHR asociada a células, y se analizaron mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo Mel 14.

Los inmunoprecipitados resultantes se analizaron en geles de poliacrilamida al 7,5% y SDS y se autoradiografiaron durante toda la noche a -70°C.

Los resultados de estos ensayos se muestran en la Fig. 5. En dicha figura, los carriles A-F corresponden a lo siguiente:

- A. Lisados de células 293 transfectadas con un plásmido de expresión de MLHR, e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14.

- B. Sobrenadantes de células 293 transfectadas con un plásmido de expresión de MHLR, e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14.

- C. Lisados de células 293 transfectadas con un plásmido que expresa la glicoproteína de cubierta gp120 de VIH e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14.

- D. Sobrenadantes de células 293 transfectadas con un plásmido de expresión de la cubierta de VIH e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14.

- E. Sobrenadantes de las células 38C13 inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14.

- F. Lisados de las células 38C13 marcadas en la superficie con I¹²⁵ e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal Mel 14.

Como se puede ver en la Fig. 5, las células transfectadas con esta construcción producen dos proteínas asociadas a células que reaccionan de forma específica con el anticuerpo Mel 14. Las proteínas asociadas a células migraron a aproximadamente 70.000 daltons y 85.000 daltons, lo que sugiere que la proteína del core de 42.000 daltons se glicosila en las células transfectadas. Tras el tratamiento con sialidasa, la banda mayor sufrió un desplazamiento en su peso molecular (resultados no mostrados), lo que sugiere que es una forma relativamente madura de la glicoproteína, mientras que la banda de menor peso molecular fue resistente a la enzima, lo que indicaba que podía ser una forma precursora.

El análisis por FACS de las líneas celulares transfectadas con el anticuerpo Mel 14 mostró que una porción de la LHR expresada en dichas células se detectaba es la superficie celular (resultados no mostrados).

Se observó que la glicoproteína de mayor peso molecular producida en la línea celular transfectada era ligeramente menor que la producida por el linfoma de células B de localización en nódulo linfático periférico, 38C13 (Fig. 5, carril F), un resultado que ya se había observado con otras líneas celulares transfectadas y que puede ser debido a diferencias celulares específicas en la glicosilación.

Es interesante remarcar que las células 38C13 y las células humanas transfectadas secretan en el medio una forma de MLHR de menor peso molecular (Fig. 5, carriles B y E). La naturaleza de esta molécula secretada es incierta, aunque su peso molecular reducido sugiere que puede ser un producto de hidrólisis de la forma proteica de superficie celular que resulta de la proteólisis cerca del anclaje de membrana.

En conclusión, estos resultados demuestran de forma convincente que el clon de cADN que se había aislado codifica la MLHR.

Ejemplo 4

30 Construcción, purificación y análisis de quimeras truncadas de MLHR-IgG

La Fig. 8 muestra la construcción de quimeras de MLHR-IgG que contienen los motivos de lectina, lectina-egf y lectina-egf-motivos reguladores del complemento. La parte superior de la figura muestra los dominios proteicos del receptor de localización de linfocitos murinos (MLHR) incluyendo la secuencia señal del extremo N-terminal (SS), la lectina, el factor de crecimiento epitelial (egf) y los dominios reguladores del complemento (CDB) así como también un dominio de anclaje transmembrana (TMD) y una secuencia corta citoplasmática. Las tres quimeras MLHR-IgG truncadas que contienen la lectina (MLHR-L+IgG), la lectina y el egf (MLHR-LE+IgG) y la lectina, egf y dos motivos reguladores del complemento (MLHR-LEC+IgG) también se muestran en la Fig. 8. Todas estas proteínas truncadas están unidas a una región de cadena pesada de gamma 1 humana justo cadena arriba del dominio bisagra (H), de modo que tales quimeras contienen los dos residuos cisteína (C) de la bisagra responsables de la dimerización de la inmunoglobulina así como también de las regiones constantes CH2 y CH3. Se utilizó una caja de región constante de cadena pesada de IgG1 humana caracterizada previamente (Capone y col., *supra*, 1989). Los sitios de unión entre las secuencias de LHR e IgG humana se eligieron de modo que la unión de las moléculas cerca de la región bisagra diera como resultado moléculas quiméricas que se sintetizaran y dimerizaran de forma eficiente en la ausencia de producción de cadena ligera. Además, la utilización de la región constante de IgG1 humana obvia cualquier dificultad debida a la reactividad cruzada con IgGs murinas endógenas en los experimentos inmunohistoquímicos descritos más adelante.

Como se puede ver a partir de la figura 9, estas quimeras se sintetizaron y secretaron de forma eficiente en estos ensayos de transfección transitoria. La reactividad de estas quimeras con la proteína A sepharose en ausencia de anticuerpos añadidos demuestra que los dominios de la región constante se pliegan normalmente. La Figura 9 muestra que estas moléculas se dimerizan en condiciones no reductoras, lo que demuestra que la región bisagra es completamente funcional en estas quimeras. Por último, la reactividad de la proteína A también permite la purificación casi homogénea de estas quimeras en columnas de proteína A sepharose. Los resultados presentes demuestran la producción de entidades semejantes a anticuerpos, cuyo dominio "variable", se puede decir, deriva de la MLHR mientras que el dominio constante deriva de la cadena pesada de la IgG gamma 1 humana.

Construcción de quimeras

Se inició con un plásmido de expresión MLHR-PRK5 descrito anteriormente (Eaton y col., 1986; Lasky y col., *Cell* 50:975-985, 1987) y una copia de cADN de una cadena pesada de IgG humana (Capon y col., *Nature* 337:525-531, 1989). Un fragmento HindIII de 1.100 pb que codifica las regiones CH1-CH3 de la región constante de IgG1 humana se insertó en 3' del sitio poliA del cADN de MLHR. Este plásmido se convirtió en un molde de cadena sencilla utilizando un origen de replicación de m13 y el fago auxiliar K07, después de lo cual las regiones entre la bisagra y la lectina, egf y la segunda repetición de unión del complemento N-terminal a la región de anclaje transmembrana putativa, se eliminaron mediante formación y escisión de un bucle por mutagénesis *in vitro* utilizando oligonucleótidos de 48-mer (Zoller y Smith, 1982). Los mutantes resultantes se rastrearon con oligonucleótidos de 21 mer marcados con P³² abarcando las juntas de la delección, y se secuenciaron los mutantes aislados mediante secuenciación de cadena doble.

Se analizaron los mutantes correctos para conocer su expresión mediante transfección en células 293 renales humanas mediante la utilización de los procedimientos descritos anteriormente. Se analizaron los sobrenadantes marcados con metionina y cisteína marcados con S³⁵ mediante inmunoprecipitación con bolas de proteína A separarose en ausencia de anticuerpos añadidos. Las proteínas precipitadas se analizaron en geles de poliacrilamida al 7,5% y SDS con o sin reducción por beta mercaptoetanol. Los plásmidos que dieron como resultado quimeras expresadas correctamente se introdujeron en células 293 mediante transfección en presencia de plásmidos de selección que codificaban para la resistencia a G418 así como la dihidrofolato reductasa. Los clones se seleccionaron en G418 y los plásmidos incorporados se amplificaron en presencia de metotrexato. Las líneas celulares estables que expresaban niveles elevados de cada construcción se crecieron a gran escala en frascos de cultivo T y los sobrenadantes celulares se clarificaron mediante centrifugación y filtración. Los sobrenadantes resultantes se concentraron mediante filtración en Amicon y se pasaron por columnas de proteína A separarose, se lavaron con PBS y se eluyeron con ácido acético 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 3,5). El material eluido se neutralizó inmediatamente con Tris 3 M, pH 9 y se cuantificó mediante electroforesis en gel con SDS así como también en un ensayo ELISA.

Los resultados de la electroforesis en gel descritos en el párrafo anterior se muestran en la Fig. 9. Las proteínas reducidas se muestran en los carriles A-F, las proteínas no reducidas en los carriles G-I y las proteínas purificadas en los carriles J-L. Los pesos moleculares de marcadores se muestran en kilodaltons. Los carriles se indentificaron de la forma siguiente: A. MLHRLEC-IgG secretada, B. MLHRLEC-IgG intracelular, C. MLHRLE-IgG secretada, D. MLHRLE-IgG intracelular, E. MLHRL-IgG secretada, F. MLHRL-IgG intracelular, G. MLHRLEC-IgG secretada, H. MLHRLE-IgG secretada, I. MLHRL-IgG secretada, J. MLHRLEC-IgG purificada, K. MLHRLE-IgG purificada y L. MLHRL-IgG purificada.

Las quimeras LHR-IgG aisladas se cuantificaron utilizando un formato ELISA que consistía de pocillos de microtitulación recubiertos con un anticuerpo monoclonal de ratón específico anti-IgG 1 humana. Se incubaron las muestras desconocidas y el estándar de inmunoadhesión CD4-IgG1 humano altamente purificado con las placas recubiertas de anticuerpo, después se lavaron las placas y el material unido se hizo reaccionar con anticuerpo de cabra anti-IgG1 humana conjugado a peroxidasa de rábano, se prosiguió por diversos lavados y adición de sustrato. Este ensayo cuantitativo permitió la cuantificación de cantidades del orden de subnanogramos de las quimeras LHR-IgG aisladas.

Análisis de la reactividad PPME de la quimera MLHR-IgG mediante ELISA

La capacidad de diversas quimeras para reconocer el carbohidrato de pared celular de levaduras, éster de polifosfomanano o PPME se analizó mediante un formato ELISA tal como se describió anteriormente (Imai y col., 1989). Brevemente, se recubrieron pocillos de microtitulación con cantidades aproximadamente equivalentes de quimeras purificadas, durante toda la noche a 4°C. Los sitios no específicos se bloquearon con BSA, después de lo cual los antígenos unidos se hicieron reaccionar con 5 µg por ml de una solución de PPME. El carbohidrato unido se detectó con un anticuerpo policlonal dirigido contra éste y mediante reactivos estándares de tinción inmunohistoquímica (Vector). La inhibición con Mel 14 se realizó mediante preincubación de los pocillos que contenían MLHRLEC-IgG con el anticuerpo monoclonal antes de la adición de PPME, mientras que la dependencia de calcio de la interacción receptor de localización-carbohidrato se demostró mediante la inclusión de EGTA 10 mM durante la reacción de unión. En los ensayos para examinar la inhibición se añadieron diversos otros aditivos antes de la incubación con PPME. Al cabo de 1 h a 22°C, las placas se lavaron e incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el PPME durante 1 h a 22°C. Las placas se lavaron e incubaron con Vector-ABC-AP durante 30 min, se lavaron y revelaron. Los ensayos resultantes se cuantificaron en un lector de placas. Los carbohidratos utilizados en los ensayos inhibitorios se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO.).

Los resultados de la unión con PPME se muestran en la Fig. 10. Los carriles contienen las siguientes quimeras MLHR-IgG: A. unión de PPME con quimeras MLHRL-, MLHRLE- y MLHRLEC-IgG. B. Inhibición de la unión de MLHRLEC-IgG-PPME con el anticuerpo monoclonal Mel 14 y EGTA. C. Inhibición de la unión de MLHRLEC-IgG-PPME con otros carbohidratos.

Trabajos anteriores habían demostrado que la LHR era capaz de unirse a un manano, éster de fosfomanano o PPME de pared celular de levadura (Yednock y col., *J. Cell Biol.*, 104:725-731, 1987), y por ello esta unión inhibía la capacidad de los linfocitos de adherirse a vénulas endoteliales altas de nódulos linfáticos periféricos, de acuerdo con la suposición de que el dominio de lectina de LHR del nódulo linfático periférico puede reconocer un carbohidrato en el endotelio del nódulo linfático periférico. Además, se halló que el anticuerpo Mel 14 inhibía la unión de PPME con la superficie del linfocito (Yednock y col., *supra*, 1987), lo que era consistente con la noción de que este carbohidrato se unía dentro del dominio de lectina de la LHR del nódulo linfático periférico.

Se halló que la quimera que se unía al PPME era la que contenía la lectina, el egf y las estructuras de repetición de unión del complemento duplicadas. Esta unión era inhibida por el anticuerpo Mel 14, de acuerdo con los resultados que demostraban que la quimera MLHRLEC-IgG era reconocida por este anticuerpo (resultados no mostrados), y era comparable cuantitativamente con la hallada previamente utilizando la MLHR aislada a partir de células del bazo (Imai y col., enviado a publicación, 1989), lo que sugiere que dicha unión representa la misma interacción proteína-carbohidrato que se había hallado con la LHR en la superficie de linfocitos (Yednock y col., *supra*, 1987). Además, se halló que la unión era dependiente de calcio (Stoolman y Rosen, *J. Cell Biol.* 96:722-729), lo que

implicaba que el dominio de lectina dependiente de calcio o de tipo C (Drickamer, *J. Biol. Chem.*, 263:9557-9560, 1988) era al menos responsable de esta interacción, como se había mostrado para el receptor asociado de linfocitos (figura 9b).

5 Trabajos anteriores habían demostrado que diversos carbohidratos además del PPME eran capaces de ser reconocidos por la MLHR derivada del bazo (Yednock y col., *supra*; Imai y col., *supra*, 1989). Estos incluyen la fucoidina, el sulfato de dextrano y las sulfatidas derivadas del cerebro. Se examinó la capacidad de estos carbohidratos para inhibir la interacción entre la quimera MLHRLEC-IgG y el PPME con el fin de investigar la especificidad de esta molécula *versus* la glicoproteína derivada del bazo descrita anteriormente (Imai y col., *supra*, 1989). Como se
10 puede ver en la figura 9, la fucoidina, el sulfato de dextrano y la sulfatida son capaces de inhibir la interacción entre el PPME y la MLHRLEC-IgG, lo que implica que la especificidad del carbohidrato de esta proteína derivada recombinante mimetiza la anteriormente descrita para la proteína natural. La falta de inhibición provocada por los otros dos carbohidratos cargados, condroitín sulfato y heparina, sugiere que la inhibición es debida al reconocimiento específico del carbohidrato y no a la interferencia inespecífica debida a la naturaleza altamente cargada de los
15 componentes.

Ensayos bloqueantes de células con quimeras MLHR-IgG

El ensayo bloqueante de células de Stampfer-Woodruff (Stampfer y Woodruff, *J. Exp. Med.* 144:828-833, 1976)
20 se realizó con secciones de cortes con criostato de nódulos linfáticos periféricos de ratón, así como también con las placas de Peyer como se describió anteriormente (Geoffrey Rosen, *J. Cell Biol.*, en publicación, 1989). Brevemente, las secciones de tejido congelado se incubaron con linfocitos mesentéricos en presencia de quimeras MLHR-IgG, MLHR derivadas de bazos aislados, o sólo con tampón. Las quimeras MLHR-IgG se incluyeron en concentraciones tan elevadas como 10 µg por sección y se preincubaron en secciones congeladas antes de la adición de 1×10^7 células
25 por ml. Los portaobjetos se lavaron, y se cuantificó la unión de los linfocitos mediante morfometría digital como el número de linfocitos unidos a HEV en estos órganos linfoides por unidad de área.

En resultados no mostrados, se halló que la quimera MLHRLEC-IgG inhibía la unión de linfocitos con HEV del nódulo linfático periférico a un nivel de inhibición de aproximadamente el 75% mientras que, en este ensayo, la MLHR
30 derivada del bazo bloqueaba a un nivel de aproximadamente el 50%. Esta inhibición era dependiente de calcio y era bloqueada por la inclusión del anticuerpo monoclonal Mel 14 (resultados no mostrados).

Análisis inmunohistoquímicos de quimeras MLHR-IgG

35 Se utilizaron quimeras MLHR-IgG aisladas para experimentos inmunohistoquímicos utilizando procedimientos idénticos a los descritos para los anticuerpos monoclonales. Secciones de 8-10 micras de tejido se cortaron en un criostato y se fijaron con cacodilato 0,1 M, paraformaldehído al 1% durante 30 minutos a 4°C. Las secciones se lavaron con PBS de Dulbecco y se tiñeron con cantidades variables de la quimera MLHR-IgG en suero de ratón normal al 5% a 4°C durante 30 min. Luego, se lavaron las secciones y se incubaron en una segunda etapa con un anticuerpo
40 específico Fc anti-humano de cabra biotinilado (Vector). La peroxidasa endógena se eliminó mediante tratamiento de las secciones con peróxido de hidrógeno-metanol después de la adición del reactivo de la segunda etapa y antes de la adición del complejo Vector ABC. Las secciones se lavaron e incubaron con el sustrato (AEC) durante 5-10 minutos. Por último, las secciones se contrastaron con tinción de hematoxilina acuosa (Biomedica) y se visualizaron con un Zeiss Axiophot.

45 Estos análisis inmunohistoquímicos de las tres quimeras MLHR-IgG utilizaron nódulos linfáticos periféricos como fuente de tejido. La elección del nódulo linfático periférico como fuente histológica fue dictada por la amplia bibliografía al respecto que demostraba que los linfocitos se unen a las HEV de este tejido linfoide de manera que la unión pueda ser bloqueada por Mel-14, lo que implicaba que el mayor nivel de ligando reconocido por la MLHR debería hallarse en este tejido (Gallatin y col., *Nature*, 304:30-34, 1983). La quimera MLHRLEC-IgG fue capaz de teñir las HEV del nódulo linfático periférico. La tinción se halló exclusivamente sobre las células del endotelio altamente tabicado, sin que se tiñeran otras regiones ad- o abluminales. Además esta tinción podía bloquearse
50 por el anticuerpo Mel 14 y era dependiente de la presencia de calcio, lo que sugiere que la unión de MLHRLEC-IgG con las HEV del nódulo linfático periférico mimetiza la adhesión entre los linfocitos y las HEV. De acuerdo con los resultados de unión con PPME, la tinción de HEV del nódulo linfático periférico por MLHRLEC-IgG se podía inhibir por la fucoidina y el sulfato de dextrano (figura 5), mientras que el condroitín sulfato y los mananos sencillos eran incapaces de inhibir la reacción de tinción (resultados no mostrados), lo que implica de nuevo que la reacción de tinción era debida al reconocimiento de un ligando del carbohidrato expresado en las HEV del nódulo
55 linfático periférico. Estos resultados ponen de manifiesto que este tipo de reactivo inmunohistoquímico puede utilizarse para analizar la distribución de la molécula(s) endotelial capaz de interaccionar con la LHR del nódulo linfático periférico.

El ligando de MLHR se halla en las placas de Peyer

65 Se halló, en los resultados de los ensayos inmunohistoquímicos no mostrados, que la quimera MLHRLEC-IgG es, sorprendentemente, capaz de reconocer específicamente el endotelio de las placas de Peyer. La quimera parece teñir el endotelio altamente tabicado de los vasos de las placas de Peyer que contienen linfocitos. Esta tinción es inhibida por el anticuerpo Mel 14 y también es dependiente de calcio. Es interesante resaltar que la tinción de HEV de las placas de

Peyer de parece algo más débil en relación con la hallada para la tinción de HEV del nódulo linfático periférico, lo que implica que en este órgano linfoide se expresa un nivel inferior de ligando(s) de MLHR. Estos resultados demuestran que, aunque otros sistemas de adhesión puedan estar implicados en este órgano (Holzman y col., *Cell*, 56:37-46, 1989), el ligando(s) para la LHR del nódulo linfático periférico se expresa y, por ello, está implicado en la unión de linfocitos con el endotelio de este órgano linfoide.

Referencias de los ejemplos

1. **Drickamer**, K., *J. Biol. Chem.*, 263, 9557 (1988); **Dricakmaer**, K., *Kidney Int.*, 32, S167 (1987).
2. **Spiess**, M., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 82:6465 (1985).
3. **Muramoto**, K., y col., *Biochem. Biophys. Acta* 874:285 (1986).
4. **Leung**, J., y col., *J. Biol. Chem.* 260:12523 (1985); **Holland**, E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7388 (1984).
5. **Drickamer**, K., *J. Biol. Chem.* 256:5827 (1981).
6. **Kikutani**, H., y col., *Cell* 47:657 (1986).
7. **McPhaul**, M., y col., *Molec. Cell Biol.* 7:1841 (1987).
8. **Halberg**, D., y col., *J. Biol. Chem.*, 262:9828 (1987).
9. **Terzaono**, K., y col., *J. Biol. Chem.*, 263:2111 (1988).
10. **Drickamer**, K., *J. Biol. Chem.*, 262:2582 (1987).
11. **Drickamer**, K., *J. Biol. Chem.*, 261:6878 (1986).
12. **Hoyle**, G., y col., *J. Biol. Chem.*, 263:7487 (1988).
13. **Takahashi**, H., y col., *J. Biol. Chem.*, 260:12228 (1985).
14. **Boggaram**, V., y col., *J. Biol. Chem.*, 263:2939 (1988).
15. **Kidd**, S., y col., *Mol. Cell Biol.* 6:3094 (1986).
16. **Hursh**, D., y col., *Science*, 237:1487 (1987).
17. **Hojrup**, P., y col., *FEBS Lett.* 184:333 (1985).
18. **Fung**, M., y col., *Nucl.Acids. Res.* 12:4481 (1984).
19. **Takeya**, H., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4990 (1979).
20. **McMullen**, B., y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115: 8 (1983).
21. **Greenwald**, I., *Cell*, 43:583 (1985).
22. **Cool**, D., y col., *Biol. Chem.*, 260:13666 (1985).
23. **Gray**, A., y col., *Nature*, 303:722 (1983).
24. **Schulz**, T., y col., *Eur. J. Immunol.*, 16:1351 (1986).
25. **Kristensen**, T., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 83:3963 (1986).
26. **Lozier**, J., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA., 81:3640 (1984).
27. **Bentley**, D., *Biochem. J.*, 239:339 (1986).
28. **Moore**, M., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 84:9194 (1987).
29. **Bentley**, D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 81:1212 (1984).
30. **Mole**, J., y col., *J. Biol. Chem.*, 263:549 (1988).

ES 2 155 819 T5

31. **DiScipio**, R., y col., *J. Biol. Chem.*, 263:549 (1984).
32. **Kusomoto**, H., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:7307 (1988).
- 5 33. **Lintin**, S., y col., *FEBS Lett.*, 204:77 (1986).
34. **Caras**, I., y col., *Nature*, 325:545 (1987).
- 10 35. **Kotwat**, G., y col., *Nature*, 335:176 (1988).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

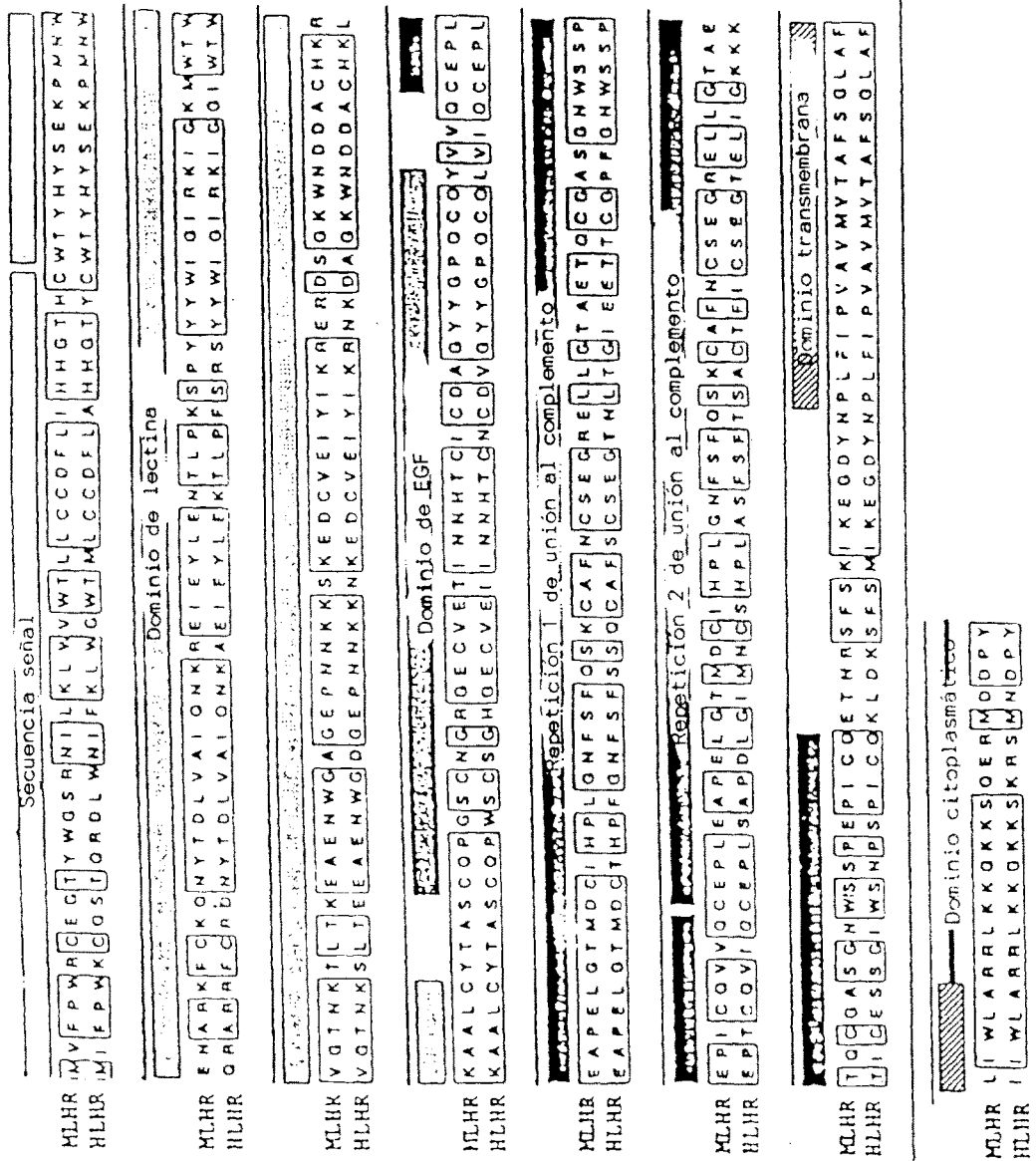
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fabricación de un dímero de cadena pesada de inmunoglobulina, en el cual una secuencia aminoacídica de una pareja de unión al ligando que es una cadena única y es un receptor, una proteína transportadora, una hormona, un factor de crecimiento o una enzima y no es un receptor de localización de linfocitos, no es un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas ni una proteína homóloga a éstos, ni tampoco un polipéptido de subunidades múltiples codificadas por genes discretos, se sustituye por las regiones variables de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, en donde dichas cadenas pesadas de inmunoglobulina retienen al menos bisagra y los dominios CH2 y CH3 de la región constante de cadena pesada.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pareja de unión al ligando es un receptor.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pareja de unión al ligando es una proteína transportadora.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pareja de unión al ligando es una hormona.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pareja de unión al ligando es un factor de crecimiento.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la pareja de unión al ligando es una enzima.
7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el dímero comprende una secuencia de inmunoglobulina obtenida a partir de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD, o IgM.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el dímero comprende un dominio constante de una cadena pesada de IgG.
9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dímero se une a un marcador detectable.
10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dímero comprende una secuencia de inmunoglobulina humana.
11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la mencionada pareja de unión al ligando es humana.
12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la mencionada proteína de la pareja de unión al ligando en la fusión es incapaz de anclarse en la membrana celular.
13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la mencionada pareja de unión al ligando es una proteína de membrana celular.
14. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una mencionada cadena de inmunoglobulina procede de una especie distinta a la de la pareja de unión.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las dos regiones variables se sustituyen en el dímero por secuencias aminoacídicas de unión al ligando distintas.
16. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dímero no está asociado con glicosilación.
17. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dímero se acompaña de un vehículo aceptable fisiológicamente.
18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el vehículo es una solución acuosa estéril.
19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el vehículo es una formulación de liberación sostenida.
20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el vehículo es un liposoma.
21. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las cadenas pesadas de inmunoglobulina retienen toda la región constante de cadena pesada.
22. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde las cadenas pesadas de inmunoglobulina retienen la región constante de cadena pesada carente del dominio CH1.

Fig. 1

[illegible]

Fig. 3



T H K M K F K V V I L K
 1 10 20 30
 <TYHYSEKPMNWENARKFXKQNYTDLVAIQNKXXIEYL

Fig. 4A

 A A C A C
 5' GAG AAG CCC ATG AAT TGG GAG AAT GC 3'

Fig. 4B

Fig. 5



Fig. 6A

[illegible]

Fig. 6B

MLHR	100	C	Q	P	G	S	C	N	G	R	G	S	E	C	V	E	T	I	N	N	H	T	C	I	C	D	A	G	Y	Y	G	P	Q	C	Q	Y
Notch	1001	C	T	E	S	S	C	L	N	G	G	S	C	I	D	G	I	N	G	Y	N	C	S	C	L	A	G	Y	S	G	A	N	C	Q	Y	
S.purp.	61	C	A	S	A	P	C	C	O	N	G	G	V	C	I	D	G	V	N	G	Y	M	C	D	C	Q	P	T	G	T	H	C	E	T		
Pro.Z	1	C	A	S	Q	P	C	L	N	G	S	C	G	Q	D	S	I	R	G	Y	A	C	T	C	A	P	G	Y	E	G	P	N	C	A	F	
Fact.X	61	C	E	G	H	P	C	L	N	Q	G	H	C	K	D	G	I	G	D	Y	T	C	T	C	A	E	G	F	E	G	K	N	C	E	F	
Fact.VII	61	C	E	T	S	P	C	Q	N	Q	G	K	C	K	D	G	L	G	E	Y	T	C	T	C	L	E	G	F	E	G	K	N	C	E	L	
Fact.IX	1	C	E	S	N	P	C	L	N	G	G	M	C	K	D	D	I	N	S	Y	E	C	W	C	O	A	G	F	E	G	T	N	C	E	L	
Lin-12	101	C	L	E	N	P	C	S	N	G	G	V	C	H	Q	H	R	E	S	F	S	C	D	C	P	P	G	F	Y	G	N	G	C	E	Q	
Fact.XII	101	C	R	T	N	P	C	L	H	G	G	R	C	L	E	V	E	G	H	R	L	C	H	C	P	V	G	Y	T	G	P	F	C	D	V	
Mu.egf	101	C	G	P	G	Q	C	Q	S	H	A	R	C	V	S	D	G	E	T	A	E	C	Q	C	L	K	G	F	A	R	D	O	N	L	C	

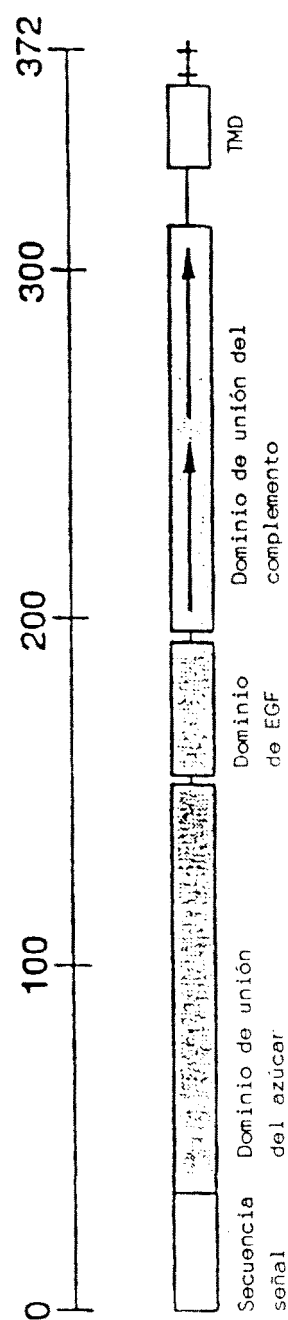
HUC1R
 HUC0M1
 HUC0M2
 HUC0M3
 HUC0M4
 HUC0M5
 HUC0M6
 HUC0M7
 HUC0M8
 HUC0M9
 HUC0M10
 HUC0M11
 HUC0M12
 HUC0M13
 HUC0M14
 HUC0M15
 HUC0M16
 HUC0M17
 HUC0M18
 HUC0M19
 HUC0M20
 HUC0M21
 HUC0M22
 HUC0M23
 HUC0M24
 HUC0M25
 HUC0M26
 HUC0M27
 HUC0M28
 HUC0M29
 HUC0M30
 HUC0M31
 HUC0M32
 HUC0M33
 HUC0M34
 HUC0M35
 HUC0M36
 HUC0M37
 HUC0M38
 HUC0M39
 HUC0M40
 HUC0M41
 HUC0M42
 HUC0M43
 HUC0M44
 HUC0M45
 HUC0M46
 HUC0M47
 HUC0M48
 HUC0M49
 HUC0M50
 HUC0M51
 HUC0M52
 HUC0M53
 HUC0M54
 HUC0M55
 HUC0M56
 HUC0M57
 HUC0M58
 HUC0M59
 HUC0M60
 HUC0M61
 HUC0M62
 HUC0M63
 HUC0M64
 HUC0M65
 HUC0M66
 HUC0M67
 HUC0M68
 HUC0M69
 HUC0M70
 HUC0M71
 HUC0M72
 HUC0M73
 HUC0M74
 HUC0M75
 HUC0M76
 HUC0M77
 HUC0M78
 HUC0M79
 HUC0M80
 HUC0M81
 HUC0M82
 HUC0M83
 HUC0M84
 HUC0M85
 HUC0M86
 HUC0M87
 HUC0M88
 HUC0M89
 HUC0M90
 HUC0M91
 HUC0M92
 HUC0M93
 HUC0M94
 HUC0M95
 HUC0M96
 HUC0M97
 HUC0M98
 HUC0M99
 HUC0M100
 HUC0M101
 HUC0M102
 HUC0M103
 HUC0M104
 HUC0M105
 HUC0M106
 HUC0M107
 HUC0M108
 HUC0M109
 HUC0M110
 HUC0M111
 HUC0M112
 HUC0M113
 HUC0M114
 HUC0M115
 HUC0M116
 HUC0M117
 HUC0M118
 HUC0M119
 HUC0M120
 HUC0M121
 HUC0M122
 HUC0M123
 HUC0M124
 HUC0M125
 HUC0M126
 HUC0M127
 HUC0M128
 HUC0M129
 HUC0M130
 HUC0M131
 HUC0M132
 HUC0M133
 HUC0M134
 HUC0M135
 HUC0M136
 HUC0M137
 HUC0M138
 HUC0M139
 HUC0M140
 HUC0M141
 HUC0M142
 HUC0M143
 HUC0M144
 HUC0M145
 HUC0M146
 HUC0M147
 HUC0M148
 HUC0M149
 HUC0M150
 HUC0M151
 HUC0M152
 HUC0M153
 HUC0M154
 HUC0M155
 HUC0M156
 HUC0M157
 HUC0M158
 HUC0M159
 HUC0M160
 HUC0M161
 HUC0M162
 HUC0M163
 HUC0M164
 HUC0M165
 HUC0M166
 HUC0M167
 HUC0M168
 HUC0M169
 HUC0M170
 HUC0M171
 HUC0M172
 HUC0M173
 HUC0M174
 HUC0M175
 HUC0M176
 HUC0M177
 HUC0M178
 HUC0M179
 HUC0M180
 HUC0M181
 HUC0M182
 HUC0M183
 HUC0M184
 HUC0M185
 HUC0M186
 HUC0M187
 HUC0M188
 HUC0M189
 HUC0M190
 HUC0M191
 HUC0M192
 HUC0M193
 HUC0M194
 HUC0M195
 HUC0M196
 HUC0M197
 HUC0M198
 HUC0M199
 HUC0M200
 HUC0M201
 HUC0M202
 HUC0M203
 HUC0M204
 HUC0M205
 HUC0M206
 HUC0M207
 HUC0M208
 HUC0M209
 HUC0M210
 HUC0M211
 HUC0M212
 HUC0M213
 HUC0M214
 HUC0M215
 HUC0M216
 HUC0M217
 HUC0M218
 HUC0M219
 HUC0M220
 HUC0M221
 HUC0M222
 HUC0M223
 HUC0M224
 HUC0M225
 HUC0M226
 HUC0M227
 HUC0M228
 HUC0M229
 HUC0M230
 HUC0M231
 HUC0M232
 HUC0M233
 HUC0M234
 HUC0M235
 HUC0M236
 HUC0M237
 HUC0M238
 HUC0M239
 HUC0M240
 HUC0M241
 HUC0M242
 HUC0M243
 HUC0M244
 HUC0M245
 HUC0M246
 HUC0M247
 HUC0M248
 HUC0M249
 HUC0M250
 HUC0M251
 HUC0M252
 HUC0M253
 HUC0M254
 HUC0M255
 HUC0M256
 HUC0M257
 HUC0M258
 HUC0M259
 HUC0M260
 HUC0M261
 HUC0M262
 HUC0M263
 HUC0M264
 HUC0M265
 HUC0M266
 HUC0M267
 HUC0M268
 HUC0M269
 HUC0M270
 HUC0M271
 HUC0M272
 HUC0M273
 HUC0M274
 HUC0M275
 HUC0M276
 HUC0M277
 HUC0M278
 HUC0M279
 HUC0M280
 HUC0M281
 HUC0M282
 HUC0M283
 HUC0M284
 HUC0M285
 HUC0M286
 HUC0M287
 HUC0M288
 HUC0M289
 HUC0M290
 HUC0M291
 HUC0M292
 HUC0M293
 HUC0M294
 HUC0M295
 HUC0M296
 HUC0M297
 HUC0M298
 HUC0M299
 HUC0M300
 HUC0M301
 HUC0M302
 HUC0M303
 HUC0M304
 HUC0M305
 HUC0M306
 HUC0M307
 HUC0M308
 HUC0M309
 HUC0M310
 HUC0M311
 HUC0M312
 HUC0M313
 HUC0M314
 HUC0M315
 HUC0M316
 HUC0M317
 HUC0M318
 HUC0M319
 HUC0M320
 HUC0M321
 HUC0M322
 HUC0M323
 HUC0M324
 HUC0M325
 HUC0M326
 HUC0M327
 HUC0M328
 HUC0M329
 HUC0M330
 HUC0M331
 HUC0M332
 HUC0M333
 HUC0M334
 HUC0M335
 HUC0M336
 HUC0M337
 HUC0M338
 HUC0M339
 HUC0M340
 HUC0M341
 HUC0M342
 HUC0M343
 HUC0M344
 HUC0M345
 HUC0M346
 HUC0M347
 HUC0M348
 HUC0M349
 HUC0M350
 HUC0M351
 HUC0M352
 HUC0M353
 HUC0M354
 HUC0M355
 HUC0M356
 HUC0M357
 HUC0M358
 HUC0M359
 HUC0M360
 HUC0M361
 HUC0M362
 HUC0M363
 HUC0M364
 HUC0M365
 HUC0M366
 HUC0M367
 HUC0M368
 HUC0M369
 HUC0M370
 HUC0M371
 HUC0M372
 HUC0M373
 HUC0M374
 HUC0M375
 HUC0M376
 HUC0M377
 HUC0M378
 HUC0M379
 HUC0M380
 HUC0M381
 H

HUC1B
 HUC1C
 HUC1D
 HUC1E
 HUC1F
 HUC1G
 HUC1H
 HUC1I
 HUC1J
 HUC1K
 HUC1L
 HUC1M
 HUC1N
 HUC1O
 HUC1P
 HUC1Q
 HUC1R
 HUC1S
 HUC1T
 HUC1U
 HUC1V
 HUC1W
 HUC1X
 HUC1Y
 HUC1Z
 HUC2A
 HUC2B
 HUC2C
 HUC2D
 HUC2E
 HUC2F
 HUC2G
 HUC2H
 HUC2I
 HUC2J
 HUC2K
 HUC2L
 HUC2M
 HUC2N
 HUC2O
 HUC2P
 HUC2Q
 HUC2R
 HUC2S
 HUC2T
 HUC2U
 HUC2V
 HUC2W
 HUC2X
 HUC2Y
 HUC2Z
 HUC3A
 HUC3B
 HUC3C
 HUC3D
 HUC3E
 HUC3F
 HUC3G
 HUC3H
 HUC3I
 HUC3J
 HUC3K
 HUC3L
 HUC3M
 HUC3N
 HUC3O
 HUC3P
 HUC3Q
 HUC3R
 HUC3S
 HUC3T
 HUC3U
 HUC3V
 HUC3W
 HUC3X
 HUC3Y
 HUC3Z
 HUC4A
 HUC4B
 HUC4C
 HUC4D
 HUC4E
 HUC4F
 HUC4G
 HUC4H
 HUC4I
 HUC4J
 HUC4K
 HUC4L
 HUC4M
 HUC4N
 HUC4O
 HUC4P
 HUC4Q
 HUC4R
 HUC4S
 HUC4T
 HUC4U
 HUC4V
 HUC4W
 HUC4X
 HUC4Y
 HUC4Z
 HUC5A
 HUC5B
 HUC5C
 HUC5D
 HUC5E
 HUC5F
 HUC5G
 HUC5H
 HUC5I
 HUC5J
 HUC5K
 HUC5L
 HUC5M
 HUC5N
 HUC5O
 HUC5P
 HUC5Q
 HUC5R
 HUC5S
 HUC5T
 HUC5U
 HUC5V
 HUC5W
 HUC5X
 HUC5Y
 HUC5Z
 HUC6A
 HUC6B
 HUC6C
 HUC6D
 HUC6E
 HUC6F
 HUC6G
 HUC6H
 HUC6I
 HUC6J
 HUC6K
 HUC6L
 HUC6M
 HUC6N
 HUC6O
 HUC6P
 HUC6Q
 HUC6R
 HUC6S
 HUC6T
 HUC6U
 HUC6V
 HUC6W
 HUC6X
 HUC6Y
 HUC6Z
 HUC7A
 HUC7B
 HUC7C
 HUC7D
 HUC7E
 HUC7F
 HUC7G
 HUC7H
 HUC7I
 HUC7J
 HUC7K
 HUC7L
 HUC7M
 HUC7N
 HUC7O
 HUC7P
 HUC7Q
 HUC7R
 HUC7S
 HUC7T
 HUC7U
 HUC7V
 HUC7W
 HUC7X
 HUC7Y
 HUC7Z
 HUC8A
 HUC8B
 HUC8C
 HUC8D
 HUC8E
 HUC8F
 HUC8G
 HUC8H
 HUC8I
 HUC8J
 HUC8K
 HUC8L
 HUC8M
 HUC8N
 HUC8O
 HUC8P
 HUC8Q
 HUC8R
 HUC8S
 HUC8T
 HUC8U
 HUC8V
 HUC8W
 HUC8X
 HUC8Y
 HUC8Z
 HUC9A
 HUC9B
 HUC9C
 HUC9D
 HUC9E
 HUC9F
 HUC9G
 HUC9H
 HUC9I
 HUC9J
 HUC9K
 HUC9L
 HUC9M
 HUC9N
 HUC9O
 HUC9P
 HUC9Q
 HUC9R
 HUC9S
 HUC9T
 HUC9U
 HUC9V
 HUC9W
 HUC9X
 HUC9Y
 HUC9Z
 HUC10A
 HUC10B
 HUC10C
 HUC10D
 HUC10E
 HUC10F
 HUC10G
 HUC10H
 HUC10I
 HUC10J
 HUC10K
 HUC10L
 HUC10M
 HUC10N
 HUC10O
 HUC10P
 HUC10Q
 HUC10R
 HUC10S
 HUC10T
 HUC10U
 HUC10V
 HUC10W
 HUC10X
 HUC10Y
 HUC10Z
 HUC11A
 HUC11B
 HUC11C
 HUC11D
 HUC11E
 HUC11F
 HUC11G
 HUC11H
 HUC11I
 HUC11J
 HUC11K
 HUC11L
 HUC11M
 HUC11N
 HUC11O
 HUC11P
 HUC11Q
 HUC11R
 HUC11S
 HUC11T
 HUC11U
 HUC11V
 HUC11W
 HUC11X
 HUC11Y
 HUC11Z
 HUC12A
 HUC12B
 HUC12C
 HUC12D
 HUC12E
 HUC12F
 HUC12G
 HUC12H
 HUC12I
 HUC12J
 HUC12K
 HUC12L
 HUC12M
 HUC12N
 HUC12O
 HUC12P
 HUC12Q
 HUC12R
 HUC12S
 HUC12T
 HUC12U
 HUC12V
 HUC12W
 HUC12X
 HUC12Y
 HUC12Z
 HUC13A
 HUC13B
 HUC13C
 HUC13D
 HUC13E
 HUC13F
 HUC13G
 HUC13H
 HUC13I
 HUC13J
 HUC13K
 HUC13L
 HUC13M
 HUC13N
 HUC13O
 HUC13P
 HUC13Q
 HUC13R
 HUC13S
 HUC13T
 HUC13U
 HUC13V
 HUC13W
 HUC13X
 HUC13Y
 HUC13Z
 HUC14A
 HUC14B
 HUC14C
 HUC14D
 HUC14E
 HUC14F
 HUC14G
 HUC14H
 HUC14I
 HUC14J
 HUC14K
 HUC14L
 HUC14M
 HUC14N
 HUC14O
 HUC14P
 HUC14Q
 HUC14R
 HUC14S
 HUC14T
 HUC14U
 HUC14V
 HUC14W
 HUC14X
 HUC14Y
 HUC14Z
 HUC15A
 HUC15B
 HUC15C
 HUC15D
 HUC15E
 HUC15F
 HUC15G
 HUC15H
 HUC15I
 HUC15J
 HUC15K
 HUC15L
 HUC15M
 HUC15N
 HUC15O
 HUC15P
 HUC15Q
 HUC15R
 HUC15S
 HUC15T
 HUC15U
 HUC15V
 HUC15W
 HUC15X
 HUC15Y
 HUC15Z
 HUC16A
 HUC16B
 HUC16C
 HUC16D
 HUC16E
 HUC16F
 HUC16G
 HUC16H
 HUC16I
 HUC16J
 HUC16K
 HUC16L
 HUC16M
 HUC16N
 HUC16O
 HUC16P
 HUC16Q
 HUC16R
 HUC16S
 HUC16T
 HUC16U
 HUC16V
 HUC16W
 HUC16X
 HUC16Y
 HUC16Z
 HUC17A
 HUC17B
 HUC17C
 HUC17D
 HUC17E
 HUC17F
 HUC17G
 HUC17H
 HUC17I
 HUC17J
 HUC17K
 HUC17L
 HUC17M
 HUC17N
 HUC17O
 HUC17P
 HUC17Q
 HUC17R
 HUC17S
 HUC17T
 HUC17U
 HUC17V
 HUC17W
 HUC17X
 HUC17Y
 HUC17Z
 HUC18A
 HUC18B
 HUC18C
 HUC18D
 HUC18E
 HUC18F
 HUC18G
 HUC18H
 HUC18I
 HUC18J
 HUC18K
 HUC18L
 HUC18M
 HUC18N
 HUC18O
 HUC18P
 HUC18Q
 HUC18R
 HUC18S
 HUC18T
 HUC18U
 HUC18V
 HUC18W
 HUC18X
 HUC18Y
 HUC18Z
 HUC19A
 HUC19B
 HUC19C
 HUC19D
 HUC19E
 HUC19F
 HUC19G
 HUC19H
 HUC19I
 HUC19J
 HUC19K
 HUC19L
 HUC19M
 HUC19N

CLIR
 tuComH
 tuComH
 tuBotA
 tuCR1
 tuV/CD
 tuCZ
 tuB
 tuC4b
 tuC1b
 tuC4b
 tuDAP
 tuSecP

Fig. 7

MOTIVOS PROTEICOS EN ESTE RECEPTOR DE LOCALIZACION DE LINFOCITOS



QUIMERAS DE IgG - RECEPTOR DE LOCALIZACION DE PLN MORINÓS

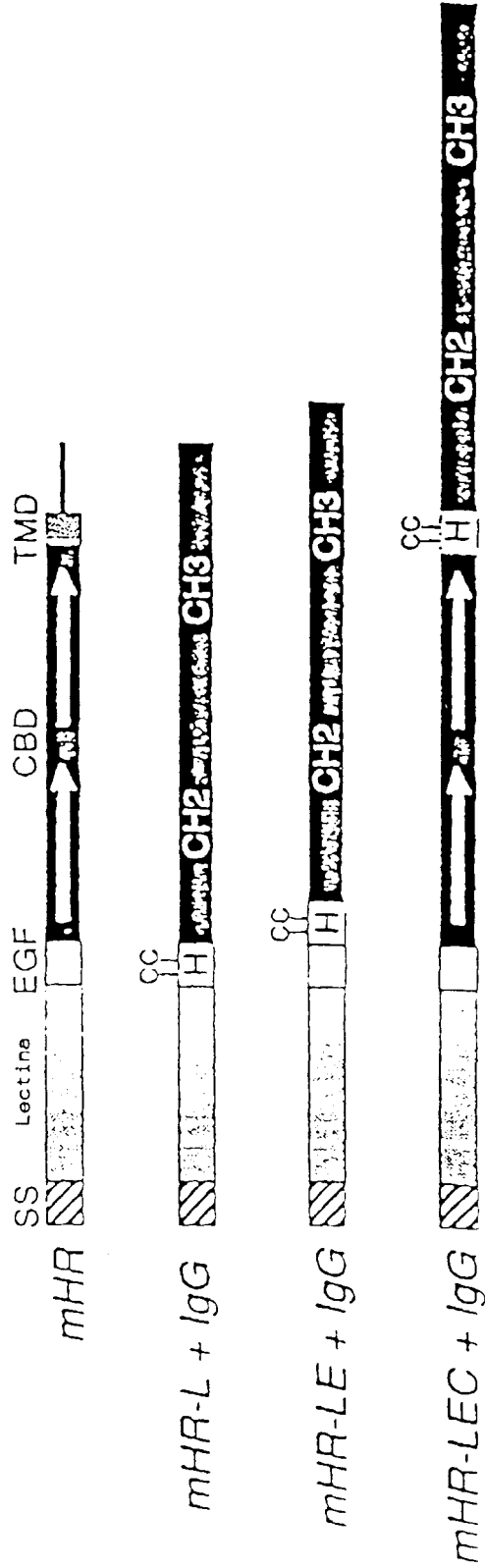


Fig. 8

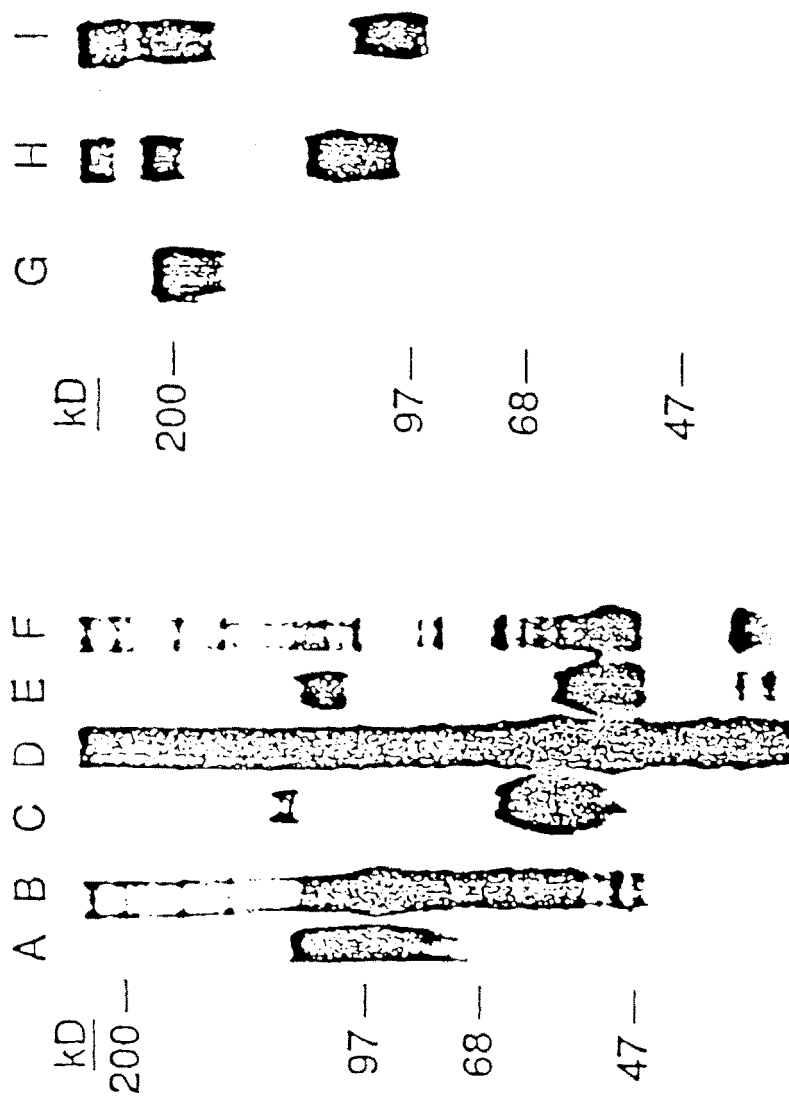
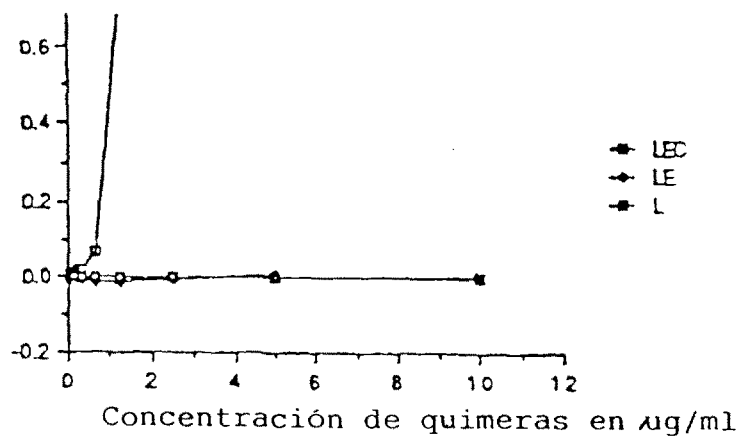


Fig. 9



Efectos del EGTA y MEL-14 sobre la unión de PPME

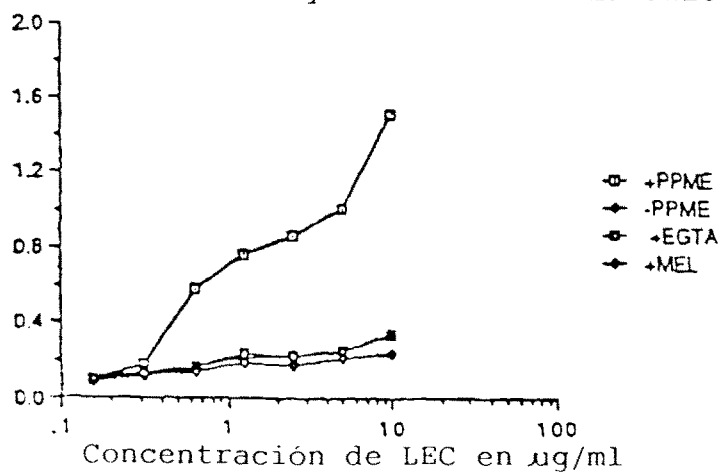


Fig 10

Competición por la unión de PPME A LEC

