



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 392**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)	C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)	A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **95907739 .7**

96 Fecha de presentación : **06.02.1995**

97 Número de publicación de la solicitud: **0741784**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.1996**

54 Título: **Ligando (ACT-4-L) para un receptor situado sobre la superficie de las células T CD4⁺ activadas.**

30 Prioridad: **10.02.1994 US 195967**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.07.2009

73 Titular/es: **THE BOARD OF TRUSTEES OF THE
LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
900 Welch Road, Suite 350
Palo Alto, California 94304-1850, US**

72 Inventor/es: **Godfrey, Wayne y
Engleman, Edgar, George**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Ligando (ACT-4-L) para un receptor situado sobre la superficie de las células T CD4⁺ activadas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de manera general al aislamiento y caracterización de un ligando (ACT-4-L) para un receptor situado sobre la superficie de las células T CD4⁺ activadas. Asimismo, la presente invención proporciona anticuerpos contra el ligando y procedimientos para utilizar el ligando y los anticuerpos en el seguimiento y/o modulación de las respuestas inmunológicas.

Antecedentes de la invención

Las respuestas inmunológicas se encuentran mayoritariamente mediadas por una colección diversa de células sanguíneas periféricas denominadas leucocitos. Entre los leucocitos se incluyen linfocitos, granulocitos y monocitos. Los granulocitos se subdividen adicionalmente en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los linfocitos se subdividen adicionalmente en linfocitos T y B. Los linfocitos T se originan en las células madre del embrión asignadas a linfocitos. La diferenciación se produce en el timo y sigue las etapas intermedias protimocítica, timocítica cortical y timocítica medular, produciendo diversos tipos de células T maduras. Entre estos subtipos se incluyen las células T CD8⁺ (también conocidas como células T citotóxicas/supresoras) que, al activarse, presentan la capacidad de lisar células diana, y las células T CD4⁺ (también conocidas como células T ayudantes y células T inductoras) que, al activarse, presentan la capacidad de estimular otros tipos celulares del sistema inmunológico.

Las respuestas del sistema inmunológico se inducen en varias situaciones diferentes. La respuesta más frecuente es una protección deseable frente a microorganismos infecciosos. Sin embargo, puede producirse una respuesta inmunológica no deseada tras el trasplante de tejido foráneo o en una enfermedad autoinmunológica, en la que uno de los propios antígenos del cuerpo es la diana para la respuesta inmunológica. Las respuestas inmunológicas también pueden ser iniciadas *in vitro* por mitógenos o anticuerpos contra determinados receptores. En cada una de estas situaciones, se transduce una respuesta inmunológica a partir de un suceso de estimulación mediante una interacción compleja de tipos celulares leucocíticos. Sin embargo, los tipos celulares participantes y la naturaleza de la interacción entre los tipos celulares puede variar para diferentes sucesos de estimulación. Por ejemplo, las respuestas inmunológicas contra las bacterias invasoras con frecuencia se transducen mediante la formación de complejos entre un receptor del MHC de clase II y un antígeno bacteriano, que después activan células T CD4⁺. En contraste, las respuestas inmunológicas contra infecciones víricas son transducidas principalmente por la formación de complejos de MHC de clase I/antígenos víricos y la posterior activación de las células CD8⁺.

En años recientes se han identificado muchos antígenos de superficie celular de leucocitos, algunos de los cuales se ha demostrado que presentan un papel en la transducción de señales. Se ha descubierto que pueden transducirse señales entre un receptor de superficie celular y un ligando soluble o un ligando unido a la superficie celular. Las secuencias de aminoácidos de las moléculas de superficie de los leucocitos comprenden varias secuencias o motivos recurrentes característicos. Estos motivos se ha predicho que se encuentran relacionados evolutivamente, presentan patrones de plegamiento similares y median en tipos similares de interacciones. Se han descrito varias superfamilias, incluyendo las superfamilias de receptor de inmunoglobulina y de receptor del factor de crecimiento nervioso. Entre los miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento nervioso se incluyen NGFR, presente sobre las células neurales, el antígeno CD40 de las células B, el antígeno OX-40 de rata, presente sobre las células CD4⁺ activadas (Mallet *et al.*, EMBO J. 9:1063-1068, 1990) (incorporado en la presente invención como referencia a todos los fines), dos receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), LTNR-1 y TNFR-II, presente en una diversidad de tipos celulares; 4-1BB presente sobre las células T, SFV-T2, un marco de lectura abierta en el virus del fibroma de Shope, y posiblemente *fas*, CD27 y CD30 (ver de manera general Mallet y Barclay, Immunology Today 12:220-222, 1990) (incorporado en la presente invención como referencia a todos los fines).

La identificación de receptores de superficie celular ha sugerido nuevos agentes para suprimir respuestas inmunológicas no deseables, tales como el rechazo del trasplante, la enfermedad autoinmunológica y la inflamación. Algunos agentes, particularmente los anticuerpos, que bloquean la unión de las células inmunológicas a moléculas solubles o receptores unidos a células puede afectar negativamente a las respuestas inmunológicas. Idealmente, un agente debería bloquear únicamente las respuestas inmunológicas no deseadas (por ejemplo el rechazo del trasplante), dejando una capacidad residual de producir respuestas deseables (por ejemplo la respuesta frente a microorganismos patogénicos). La acción inmunosupresora de algunos agentes, por ejemplo los anticuerpos contra el receptor CD3 y el receptor IL-2, ya han sido probados en ensayo clínico. Aunque algunos ensayos han mostrado resultados positivos, siguen existiendo problemas significativos. En primer lugar, un paciente puede desarrollar una respuesta inmunológica contra el agente de bloqueo, interrumpiendo los efectos inmunosupresores a menos que se encuentren disponibles otros agentes diferentes. En segundo lugar, las células que expresan el antígeno diana podrían ser capaces de adaptarse a la presencia del agente de bloqueo cesando la expresión del antígeno aunque conservando funciones inmunológicas. En esta situación, resulta ineficaz el tratamiento continuo con un único agente inmunosupresor. En tercer lugar, muchas dianas para agentes terapéuticos se encuentran situadas sobre más de un subtipo de leucocito, con el resultado de que generalmente no resulta posible bloquear o eliminar selectivamente la respuesta de únicamente subtipos celulares específicos, y de esta manera se conserva una capacidad inmunológica residual para combatir microorganismos infecciosos. Basándose en lo anteriormente expuesto, resulta evidente que existe una necesidad de agentes adicionales y mejorados capaces

de suprimir respuestas inmunológicas, particularmente agentes capaces de supresión selectiva. La presente invención satisface ésta y otras necesidades, en parte, al proporcionar un ligando (ACT-4-L) para un receptor localizado sobre linfocitos T CD4⁺ activados.

- 5 Godfrey *et al.*, Tissue Antigens 42(4):253, describen un homólogo humano del antígeno OX-0 de rata. La secuencia de aminoácidos completa tal como se muestra en la fig. 10 se da a conocer en Muira *et al.*, Mol. Cell Biol. 11:1313-1325, 1991, como comprendiendo una proteína gp34, aunque no se asigna ninguna utilidad a la misma. Se cultivaron anticuerpos contra esta proteína.

10 Sumario de la invención

La invención proporciona una pareja de unión específica para un polipéptido receptor ACT-4 que es un polipéptido según las reivindicaciones.

- 15 En particular la invención se refiere a polipéptidos ligandos ACT-4L purificados según las reivindicaciones.

- Asimismo, la invención proporciona dominios extracelulares purificados de ligandos ACT-4L según se define en las reivindicaciones. Estos dominios comprenden por lo menos cinco aminoácidos contiguos del dominio extracelular ACT-4-L-h-1 de longitud completa. El dominio extracelular se encuentra localizado en la región C-terminal, corriente abajo del sitio SmaI de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la figura 10. Algunos de estos dominios extracelulares son de longitud completa.

- Algunas parejas de unión específica, tales como los dominios extracelulares, inhiben la activación *in vitro* de las células T CD4⁺ que expresan el receptor ACT-4-h-1 sobre la superficie de las mismas. Otras parejas de unión específica, tales como los dominios extracelulares, estimulan la activación *in vitro* de dichas células T. En el caso de que la pareja de unión específica sea un fragmento de ligando, puede competir con la pareja de unión específica mostrada en la figura 10 para la unión a un anticuerpo.

- Cualquiera de las parejas de unión específica anteriormente indicadas, incluyendo los dominios extracelulares, puede comprender además un segundo polipéptido unido que puede conjugarse covalentemente o formar parte de una proteína de fusión. Entre los ejemplos de polipéptidos unidos adecuados se incluyen la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina, así como toxinas o marcajes.

- Las parejas de unión específica de la invención convenientemente se encuentran en forma soluble y pueden marcarse. En particular, la invención proporciona un polipéptido soluble que es un agente de unión específica capaz de unión específica a ACT-4. Este polipéptido presentará la secuencia de aminoácidos de la figura 10, excepto por la subsecuencia transmembranal de la misma.

- Asimismo, la invención se refiere a grupos de unión, tales como anticuerpos según se definen en las reivindicaciones, que se unen específicamente a ACT-4-L-h-1, preferentemente a un dominio extracelular del mismo.

La invención también proporciona un grupo de unión según se define en las reivindicaciones.

- Un aspecto adicional de la invención comprende un ácido nucleico según se define en las reivindicaciones. Estos segmentos de ácidos nucleicos pueden utilizarse en la preparación de las proteínas respectivas mediante la incorporación en un vector de expresión replicable apropiado y la incorporación en una célula huésped que sea una célula procariótica o eucariótica, que seguidamente se cultiva. Las líneas celulares y vectores implicados en este procedimiento forman aspectos adicionales de la invención definida en las reivindicaciones.

- En otro aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas según se define en las reivindicaciones.

- La invención resulta útil en procedimientos para modificar una respuesta inmunológica en un paciente, por ejemplo suprimir la respuesta inmunológica, comprendiendo los procedimientos administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, tal como aquéllas indicadas anteriormente. La administración puede llevarse a cabo *ex vivo*. Los agentes preferentes son anticuerpos monoclonales, polipéptidos ligandos ACT-4-L y polipéptidos receptores ACT-4. La invención también resulta útil en procedimientos para suprimir una respuesta inmunológica en la que el agente compite con el ligando ACT-4-L-H1 para la unión específica al receptor ACT-4-h-1. Los procedimientos resultan útiles en el tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad o condición inmunológica. Entre los ejemplos de condiciones en las que estos procedimientos pueden resultar útiles se incluyen el rechazo del trasplante, GVHD, una enfermedad autoinmunitaria, inflamación, agentes infecciosos, células infectadas por HTLV o por VIH, así como enfermedad o trastorno intestinal inflamatorio.

La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* de cribado según se define en las reivindicaciones.

- Los procedimientos pueden utilizarse para el cribado de agentes inmunosupresores, en cuyo caso los procedimientos comprenden poner en contacto una pareja de unión específica, en particular un polipéptido ligando ACT-4-L-h-1, con un potencial agente inmunosupresor. Se detecta la unión específica entre el polipéptido ligando ACT-4-L-h-1 y el agente. La unión específica es indicativa de actividad inmunosupresora.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Tinción de dos colores de linfocitos sanguíneos periféricos para analizar la expresión de ACT-4h-1 en diferentes tipos celulares.

Fig. 2: cinética de la expresión de ACT-4h-1 sobre células T CD4⁺ activadas por aloantígeno. MCF=fluorescencia media por canal.

Fig. 3: cinética de la expresión de ACT-4-h-1 sobre células T CD4⁺ activadas por el toxoide del tétanos.

Fig. 4: cinética de la expresión de ACT-4h-1 sobre células T CD4⁺ activadas por PHA.

Fig. 5: secuencia de ADNc (parte superior) y deducida de aminoácidos (parte inferior) de ACT-4-h-1. La figura indica las localizaciones de una secuencia de señal N-terminal, dos posibles sitios de corte de señal (flechas verticales), dos sitios de glucosilación (gly), un dominio transmembranal (TM), un codón de parada y una secuencia de señal poli-A.

Fig. 6: construcción de vector de expresión para la producción de transfectantes estables que expresan ACT-4h-1.

Fig. 7: análisis FACSTM que muestra la expresión de ACT-4-h-1 sobre transfectantes estables de las líneas celulares COS-7, Jurkat y SP2/O.

Fig. 8: fusión de un dominio extracelular de ACT-4-h-1 con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina para formar una globulina recombinante.

Fig. 9: representación topográfica esquemática de una globulina recombinante formada a partir de una fusión de un dominio extracelular de ACT-4-h-1 con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina para formar una globulina recombinante.

Fig. 10: secuencia de ADNc y secuencia de aminoácidos predicha de ACT-4-L-h-1. Las regiones en cajas se refieren a un dominio transmembranal, cuatros sitios de glucosilación y una señal poli-A.

Definiciones

Las abreviaturas para los veinte aminoácidos naturales siguen el uso convencional (Immunology - A Synthesis, E.S. Golub y D.R. Gren, editores, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2a edición, 1991) (incorporada en la presente invención como referencia a todos los fines). Los estereoisómeros (por ejemplos los D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos α,α -disustituidos, los N-alquil aminoácidos, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales, también puede ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Entre los ejemplos de aminoácidos no convencionales se incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo 4-hidroxiprolina). En la notación de los polipéptidos utilizada en la presente invención, la dirección izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso y convención estándares. De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias polinucleótidas monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias polinucleótidas bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de adición 5' a 3' de los transcritos nacientes de ARN se denomina dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que presentan la misma secuencia en la cadena de ADN y que se encuentran en el lado 5' del extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias cadena arriba"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que presentan la misma secuencia que el ARN y que se encuentran situadas en el lado 3' del extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias cadena abajo".

La expresión "secuencia polinucleótida" se refiere a un polímero de una o dos cadenas de bases desoxiribonucleótidas o ribonucleótidas leído desde el extremo 5' hasta el extremo 3'. Incluye plásmidos autoreplicantes, polímeros infecciosos de ADN o ARN y ADN o ARN no funcional.

Las expresiones siguientes se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias: una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo un segmento de un ADNc de longitud completa o una secuencia génica dada en un listado de secuencias, tal como una secuencia polinucleótida mostrada en la fig. 5 o en la fig. 10, o puede comprender una secuencia completa de ADNc o génica. Generalmente, una secuencia de referencia presenta una longitud mínima de 20 nucleótidos, frecuentemente de por lo menos 25 nucleótidos, y con frecuencia de por lo menos 50 nucleótidos. Debido a que dos polinucleótidos pueden, cada uno, (1) comprender una secuencia (es decir, una parte de la secuencia polinucleótida completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y puede comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones entre secuencias de dos (o más) polinucleótidos típicamente se llevan a cabo mediante la comparación de secuencias de los dos polinucleótidos a lo largo de una "ventana de comparación"

para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una “ventana de comparación”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un segmento conceptual de por lo menos 20 posiciones nucleótidas contiguas, en el que puede compararse una secuencia polinucleótida con una secuencia de referencia de por lo menos 20 nucleótidos contiguos y en la que la parte de la secuencia polinucleótida en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para la alineación de una ventana de comparación puede llevarse a cabo con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information), o GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que resulte en el porcentaje más elevado de similitud de secuencias a lo largo de la ventana de comparación) generada mediante los diversos procedimientos. La expresión “identidad de secuencia” se refiere a que las dos secuencias polinucleótidas son idénticas (es decir, nucleótido a nucleótido) a lo largo de la ventana de comparación. La expresión “porcentaje de identidad de secuencias” se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se encuentra la base ácido nucleico idéntica (por ejemplo A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias, de manera que se obtiene el número de posiciones correspondientes, y dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Las expresiones “identidad sustancial” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una característica de una secuencia polinucleótida, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que presenta un porcentaje de identidad de secuencias de 70, 80 ó 85, preferentemente de por lo menos 90 a 95 por ciento, más habitualmente de por lo menos 99 por ciento, comparado con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de por lo menos 20 posiciones nucleótidas, frecuentemente a lo largo de una ventana de por lo menos 25 a 50 nucleótidos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia polinucleótida, que puede incluir deleciones o adicionales que en total constituyen 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo un segmento de la secuencia de longitud completa de ACT-4-h-1 mostrada en la fig. 5 o un segmento de la secuencia de longitud completa de ACT-4-L-h-1 mostrada en la fig. 10.

Aplicada a polipéptidos la expresión “identidad sustancial” se refiere a que dos secuencias peptídicas, tras alinearlas óptimamente, tal como mediante los programas BLAZE (Intelligenetics), GAP o BESTFIT utilizando pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de por lo menos 70 por ciento u 80 por ciento, preferentemente por lo menos 90 por ciento, más preferentemente por lo menos 95 por ciento o más (por ejemplo una identidad de secuencia de 99 por ciento). Preferentemente las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de los residuos que presentan cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que presenta cadenas laterales alifáticas es: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que presenta cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es: serina y treonina; un grupo de aminoácidos que presenta cadenas laterales que contienen amida es: asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que presenta cadenas laterales aromáticas es: fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que presenta cadenas laterales básicas es: lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que presenta cadenas laterales que contienen azufre es: cisteína y metionina. Los grupos preferentes de sustitución conservativa de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

La expresión “sustancialmente puro” se refiere a que una especie es la especie presente predominante (es decir, sobre una base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición) y preferentemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie comprende por lo menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80 a 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Más preferentemente, la especie se purifica hasta esencialmente la homogeneidad (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante procedimientos de detección convencionales), donde la composición consiste esencialmente de una única especie macromolecular.

La expresión “natural” tal como se utiliza en la presente invención aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleótida presente en un organismo (incluyendo los virus) que puede aislarse a partir de una fuente natural y que no ha sido deliberadamente modificada por el hombre en el laboratorio es natural.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un receptor de inmunoglobulina o de células T. Los determinantes epitópicos habitualmente consisten de agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como cadenas laterales de aminoácidos o sacáridas y habitualmente presentan características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Se produce la unión específica cuando la constante de disociación para un complejo dimérico es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 100 \text{ nM}$, y más preferentemente $\leq 1 \text{ nM}$.

La expresión “variantes afines superiores” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una secuencia génica que se encuentra evolutiva y funcionalmente relacionada entre seres humanos y especies de mamífero superior, tales como primates, porcinos y bovinos. La expresión no incluye secuencias génicas procedentes de roedores, tales como ratas. De esta manera, el gen afín de primate del gen ACT-4-h-1 es el gen de primate que codifica una proteína expresada que presenta el grado más alto de identidad de secuencia con la proteína receptora ACT-4-h-1 y que muestra un patrón de expresión similar al de la proteína ACT-4-h-1 (es decir, expresada sobre las células CD4⁺ activadas). De manera similar, el gen afín de primate del gen ACT-4-L-h-1 es el gen cuya proteína expresada muestra la máxima identidad de secuencia con la proteína ligando ACT-4-L-h-1 y que muestra un patrón de expresión similar (es decir, expresado sobre las células B activadas).

Una población celular se encuentra sustancialmente enriquecida en un tipo celular seleccionado cuando ese tipo celular constituye por lo menos 30, 50 ó 70% de la población.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios.

Una sustancia de ensayo compite con una referencia para la unión específica a un antígeno cuando un exceso de la sustancia de ensayo inhibe sustancialmente la unión de la referencia en un ensayo de competición. Se encuentran disponibles numerosos tipos de ensayo de competición, incluyendo el radioinmunoensayo y ELISA (ver Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1988). La inhibición sustancial se refiere a que la sustancia de ensayo reduce la unión específica de la referencia habitualmente en por lo menos 10%, 25%, 50%, 75% o 90%. Entre las sustancias de ensayo identificadas por un ensayo de competición se incluyen aquellas que se unen al mismo epítipo que la referencia y aquellas que se unen a un epítipo contiguo suficientemente próximo al epítipo unido al anticuerpo de referencia para que se produzcan impedimentos estéricos.

Descripción detallada

I. Polipéptidos receptores ACT-4

En la presente invención se describen receptores sobre la superficie de células T CD4⁺ activadas (denominadas receptores ACT-4) y fragmentos de los mismos. La expresión polipéptido receptor ACT-4 se utiliza genéricamente para incluir proteínas de longitud completa y fragmentos de las mismas. El término receptor ACT-4 habitualmente se reserva para proteínas de longitud completa. La secuencia de aminoácidos del primer receptor ACT-4 que se ha caracterizado [en lo sucesivo en la presente invención denominado ACT-4-h-1] se muestra en la fig. 5. El sufijo -h designa el origen humano y el sufijo -1 indica que ACT-4-h-1 es el primer receptor ACT-4 que se ha caracterizado. La expresión receptor ACT-4 se refiere no sólo a la proteína que presenta la secuencia mostrada en la fig. 5, sino también otras proteínas que representan variantes alélicas, no alélicas y afines superiores de ACT-4-h-1 y mutantes naturales o inducidas de cualquiera de ellas. Habitualmente los polipéptidos receptores ACT-4 también muestran identidad de secuencia sustancial con la secuencia de ACT-4-h-1. Típicamente un polipéptido receptor ACT-4 contendrá por lo menos 4, y más comúnmente 5, 6, 7, 10 ó 20, 50 o más aminoácidos contiguos a la secuencia de ACT-4-h-1. Es bien conocido de la técnica que los dominios funcionales, tales como los dominios de unión o epítopos pueden formarse a partir de tan sólo cuatro residuos aminoácidos.

Los polipéptidos receptores ACT-4 típicamente muestran una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial con la secuencia de aminoácidos de ACT-4-h-1 y pueden encontrarse codificados por secuencias de nucleótidos que muestran identidad de secuencia sustancial con la secuencia de nucleótidos codificante de ACT-4-h-1 mostrada en la fig. 5. Los nucleótidos codificantes de las proteínas receptores ACT-4 también se hibridan típicamente a la secuencia de ACT-4-h-1 bajo condiciones restrictivas. Sin embargo, estos nucleótidos habitualmente no se hibridan bajo condiciones restrictivas al ácido nucleico codificante del receptor OX-40, tal como describen Mallet *et al.*, EMBO J. 9:1063-68, 1990 (incorporada en la presente invención como referencia a todos los fines) (ver particularmente la fig. 2A de la referencia Mallet *et al.*). Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo circunstancias diferentes. Generalmente se seleccionan las condiciones restrictivas para que sean aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente correspondiente. Típicamente las condiciones restrictivas son aquellas en las que la concentración de sales es por lo menos aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es por lo menos aproximadamente 60°C. Debido a que otros factores pueden afectar significativamente a la astringencia de la hibridación, incluyendo, entre otros, la composición de bases y el tamaño de las cadenas complementarias, la presencia de solventes orgánicos y el grado de desapareamiento de las bases, la combinación de parámetros es más importante que la magnitud absoluta de cualquiera de los mismos.

Habitualmente los polipéptidos receptores ACT-4 comparten por lo menos un determinante antigénico con ACT-4-h-1 pero no son específicamente reactivos con anticuerpos anti-polipéptido OX-40 de rata. La existencia de un determinante antigénico común se pone de manifiesto en la reactividad cruzada de la proteína variante con cualquier anticuerpo preparado contra ACT-4-h-1 (ver la sección IV). La reactividad cruzada con frecuencia se somete a ensayo utilizando sueros policlonales contra ACT-4-h-1, aunque también puede someterse a ensayo utilizando uno o más anticuerpos monoclonales contra ACT-4-h-1, tal como el anticuerpo denominado L106.

Con frecuencia los polipéptidos receptores ACT-4 contienen esqueletos polipéptidos modificados. Entre las modificaciones se incluyen derivatizaciones químicas de los polipéptidos, tales como acetilaciones, carboxilaciones y similares. También se incluyen modificaciones por glucosilación (N-ligada u O-ligada) y variantes de procesamiento de un polipéptido típico. Entre estas etapas de procesamiento se incluyen específicamente modificaciones enzimáticas, tales como la ubiquitinización y la fosforilación (ver, por ejemplo, Hershko y Ciechanover, *Ann. Rev. Bioch.* 51:335-364, 1982). La proteína ACT-4-h-1, por ejemplo, se encuentra fuertemente modificada, en el aspecto de que el peso molecular observado es aproximadamente 50 kDa, mientras que el peso molecular predicho basándose en la secuencia de aminoácidos es de sólo 27 kDa. Se han identificado dos sitios de glucosilación putativa en el dominio extracelular del mismo.

Los receptores ACT-4 probablemente comparten algunas o todas las características topológicas que se han observado en ACT-4-h-1. La secuencia de aminoácidos de ACT-4-h-1 contiene una secuencia putativa de señal N-terminal de 22 ó 24 aminoácidos. La longitud de 24 aminoácidos de la secuencia más probablemente se basa en los criterios de von Heijne, *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690, 1986 (incorporada como referencia a todos los fines). El receptor ACT-4-h-1 contiene un único tramo hidrofóbico adicional de 27 aminoácidos que comprende los residuos 213 a 240. El tramo hidrofóbico probablemente corresponde a un dominio transmembranal y su existencia es consistente con que ACT-4-h-1 sea una proteína membranal integral de tipo I (es decir, que presenta un único dominio transmembranal en el que el dominio N-terminal comprende la región extracelular y el extremo C-terminal comprende la región intracelular). Los 189 ó 191 aminoácidos (dependiendo de la localización exacta del sitio de corte de señal) de ACT-4-h-1 situados en el lado amino del segmento transmembranal se denominan "dominio extracelular", mientras que los 37 aminoácidos en el lado carboxi del segmento transmembranal se denominan "dominio intracelular". Desde el extremo amino-terminal, el dominio extracelular presenta una secuencia putativa de señal hidrofóbica NH₂-terminal y tres bucles intracadena formados mediante enlaces disulfuro entre residuos de cisteína apareados.

La organización topológica de los polipéptidos receptores ACT-4 resulta similar a la de otros miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento nervioso, particularmente a la del receptor OX-40 de rata. Sin embargo, los demás miembros muestran algunas divergencias en el número de bucles disulfuro extracelulares y de sitios de glucosilación, y en el tamaño del dominio intracelular (ver Mallet y Barclay, *supra*).

Aunque no todos los dominios comentados anteriormente se encuentran necesariamente presentes en todos los polipéptidos receptores ACT-4, se espera la presencia de un dominio extracelular en la mayoría. En efecto, en algunos polipéptidos receptores ACT-4, resulta posible la presencia de únicamente un dominio extracelular, y el estado natural de estas proteínas no es como proteínas unidas a la superficie celular sino como proteínas solubles, por ejemplo dispersadas en un líquido corporal extracelular. La existencia de formas variantes solubles ha sido observada en otros receptores de superficie celular, incluyendo un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento nervioso, SFV-T2 (ver Mallet y Barclay, *supra*).

Aparte de polipéptidos de sustancialmente longitud completa, se describen en la presente invención fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos. Entre las actividades biológicas significativas se incluyen la unión de receptores, la unión de anticuerpos (por ejemplo el fragmento compete con un receptor ACT-4 intacto para la unión específica a un anticuerpo), la inmunogenicidad (es decir, la posesión de epítopos que estimulan las respuestas de células B o T contra el fragmento) y el agonismo o antagonismo de la unión de un polipéptido receptor ACT-4 a los ligandos del mismo. Un segmento de una proteína receptor ACT-4 o un dominio de la misma habitualmente comprende por lo menos 5, 7, 9, 11, 13, 16, 20, 40 ó 100 aminoácidos contiguos.

Con frecuencia se terminan segmentos de polipéptidos receptores ACT-4 cerca de límites de dominios funcionales o estructurales. Estos segmentos consisten esencialmente de los aminoácidos responsables de una propiedad funcional o estructural particular. Los dominios estructurales y funcionales se identifican comparando los datos de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos, tal como se muestra en la fig. 5, con bases de datos públicas o propietarias de secuencias. Preferentemente se utilizan procedimientos computerizados de comparación para identificar los motivos de secuencia o los dominios predichos de conformación de proteína presentes en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Entre los dominios estructurales se incluyen un dominio intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular, que a su vez contiene tres bucles unidos por enlaces disulfuro. Entre los dominios funcionales se incluyen un dominio de unión extracelular a través de que interacciona el polipéptido receptor ACT-4 con moléculas solubles externas u otros ligandos unidos a células y un dominio transductor de señales intracelulares.

Algunos fragmentos contienen únicamente dominios extracelulares, tales como uno o más bucles unidos por enlace disulfuro. Estos fragmentos con frecuencia conservan la especificidad de unión de un polipéptido receptor ACT-4, pero son solubles; no se encuentran unidos a membrana. Estos fragmentos resultan útiles como inhibidores competitivos de la unión del receptor ACT-4.

Los receptores ACT-4 se identifican adicionalmente por su condición de miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento nervioso. La secuencia de aminoácidos de ACT-4-h-1 es por lo menos 20% idéntica a NGF-R, TNF-R, CD40, 4-1BB y *fas*/APO1. ACT-4-h-1 muestra una identidad de secuencia de aminoácidos de 62% con el gen OX-40 de rata, que también se ha caracterizado mediante expresión selectiva sobre células CD4⁺ activadas.

Los receptores ACT-4 también se identifican por una distribución celular característica. Más notablemente, los receptores ACT-4 habitualmente se detectan con facilidad sobre células T CD4⁺ activadas (el porcentaje de células

que los expresan habitualmente es superior a aproximadamente 25% o 50%, y con frecuencia aproximadamente 80%; la fluorescencia media por canal habitualmente es superior a aproximadamente 10, y con frecuencia aproximadamente de 20 a 25, en un citómetro de flujo Coulter-Profile tras tinción de inmunofluorescencia). Los receptores ACT-4 habitualmente están sustancialmente ausentes de las células en reposo T, B (a menos que hayan sido activadas con PMA), NK y monocitos (a menos que hayan sido activadas con PMA). La expresión “sustancialmente ausente” se refiere a que el porcentaje de células que expresa ACT-4 es habitualmente inferior a aproximadamente 5% y más habitualmente inferior a aproximadamente 2%, y que el canal promedio es habitualmente inferior a aproximadamente 4, y más habitualmente inferior a aproximadamente 2, medido en un citómetro de flujo Coulter-Profile tras tinción de inmunofluorescencia de las células (ver el Ejemplo 2). Los receptores ACT-4 habitualmente se expresan a niveles reducidos sobre las células CD8⁺ activadas (el porcentaje de células expresantes es aproximadamente 4% a 10%; fluorescencia media por canal de aproximadamente 2 a 4 en un citómetro de flujo Coulter-Profile tras tinción de inmunofluorescencia). El reducido nivel de expresión observado en las células CD8⁺ sugiere que la expresión se limita a una subpoblación de las células CD8⁺. Se ha observado expresión de receptores ACT-4 sobre la superficie de las células CD4⁺ activadas mediante varios mecanismos diferentes, incluyendo con estímulos aloantigénicos, un toxoide de tetánico o un mitogénico (por ejemplo PHA). La expresión alcanza un máximo tras aproximadamente 78 días de estimulación aloantigénica o con toxoide de tetánico y tras aproximadamente tres días de estimulación con PHA. Estos datos indican que los receptores ACT-4 deberían clasificarse como antígenos de activación temprana sustancialmente ausentes en las células en reposo. La observación de que los receptores ACT-4 se expresan preferentemente sobre células CD4⁺ activadas y que se expresan en un grado muy inferior sobre células CD8⁺ activadas, pero que se encuentran sustancialmente ausentes de la mayoría o de todos los demás subtipos de células linfoides (excepto en respuesta a estímulos altamente no fisiológicos, tales como PMA) contrasta con la especificidad de tipo celular de otros antígenos activadores presentes en los leucocitos humanos.

La expresión de los receptores ACT-4 sobre la superficie de las células T CD4⁺ activadas sugiere que el receptor presenta un papel en la activación de estas células. Este papel es consistente con el de algunos otros miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento nervioso. Por ejemplo, CD40 estimula la transición entre las fases G1 y S en los linfocitos B, y el receptor del factor de crecimiento nervioso transduce una señal de la citoquina factor de crecimiento nervioso, resultando en la diferenciación y supervivencia neuronales (Barde, *Neuron* 2:1525-1534, 1989) (incorporada como referencia a todos los fines). Sin embargo, también pueden contemplarse otros papeles para los receptores ACT-4, por ejemplo la interacción con otros tipos celulares linfoides. La existencia de estos papeles es consistente con las diversas funciones de otros miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento nervioso, tales como el factor de necrosis tumoral, la interacción de los cuales con el receptor del factor de necrosis tumoral puede resultar en inflamación o en la muerte de las células tumorales.

Pueden fusionarse fragmentos o análogos que comprenden sustancialmente uno o más dominios funcionales (por ejemplo un dominio extracelular) de receptores ACT-4 con secuencias polipeptídicas heterólogas, de manera que la proteína de fusión resultante muestra la propiedad o propiedades funcionales proporcionadas por el fragmento del receptor ACT-4 y/o por la pareja de fusión. La orientación del fragmento de receptor ACT-4 respecto a la pareja de fusión dependerá de consideraciones experimentales, tales como la facilidad de construcción, la estabilidad frente a la proteólisis, la estabilidad térmica, la reactividad inmunológica, la modificación de residuos amino-terminales o carboxi-terminales, etc. Entre las potenciales parejas de fusión se incluyen enzimas cromogénicas, tales como la β -galactosidasa, la proteína A o G, una proteína FLAG, tal como la descrita por Blancar y Rutter, *Science* 256:1014-1018, 1992, toxinas (por ejemplo la toxina diftérica, la exotoxina A de *Pseudomonas*, la toxina ricina o la fosfolipasa C) y componentes de inmunoglobulina.

Las globulinas recombinantes (Rg) formadas mediante fusión de fragmentos de receptor ACT-4 y componentes de inmunoglobulina con frecuencia presentan la mayoría o todas las propiedades fisiológicas asociadas a la región constante de la clase particular de inmunoglobulina utilizada. Por ejemplo, las globulinas recombinantes pueden ser capaces de fijar el complemento, mediar en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos, estimular las células B o atravesar paredes de vasos sanguíneos y entrar en el espacio intersticial. Las globulinas recombinantes habitualmente se forman fusionando el extremo C-terminal de un dominio extracelular de receptor ACT-4 al extremo N-terminal del dominio de región constante de una inmunoglobulina de cadena pesada. La cadena de inmunoglobulina preferentemente es de origen humano, particularmente si la globulina recombinante está destinada al uso terapéutico. Las globulinas recombinantes habitualmente son solubles y presentan varias propiedades ventajosas respecto a los receptores ACT-4 no modificados. Entre estas propiedades se incluyen una vida media en suero prolongada, la capacidad de lisar células diana para las que presenta afinidad un receptor ACT-4, funciones efectoras y la capacidad de unirse a moléculas tales como las proteínas A y G, que pueden utilizarse para inmovilizar la globulina recombinante en los análisis de ligamiento.

60 II. Ligandos para ACT-4

La invención también proporciona ligandos según se define en las reivindicaciones, que se unen específicamente a un polipéptido receptor ACT-4 y que son capaces de formar un complejo con dicho polipéptido, por lo menos en parte, mediante enlace no covalente. La expresión “polipéptido ligando ACT-4-L” se utiliza genéricamente para incluir proteínas de longitud completa y fragmentos de las mismas. Esta expresión habitualmente no incluye anticuerpos contra los polipéptidos receptores ACT-4. La expresión “ligando de ACT-4” habitualmente se utiliza para referirse a una proteína de longitud completa. Los ligandos pueden ser moléculas naturales o sintéticas, y pueden encontrarse en forma soluble o ancladas a la superficie de una célula. Múltiples ligandos diferentes pueden unirse al mismo receptor

ACT-4. A la inversa, un ligando puede unirse a más de un receptor ACT-4. Habitualmente la unión de un ligando a un receptor ACT-4 iniciará una señal que altere el fenotipo físico y/o funcional de una célula que porta el receptor ACT-4 y/o una célula que porta el ligando para ACT-4. Los anticuerpos contra ACT-4 o sus ligandos pueden presentar la capacidad de bloquear o estimular la transducción de señales. Evidentemente se reconocerá que la designación de ACT-4 como receptor y la pareja o parejas de unión específica del mismo como ligando o ligandos es algo arbitraria y podría, bajo determinadas circunstancias, invertirse.

Se identifican los materiales que suministran los polipéptidos ligandos ACT-4-L mediante el cribado de diferentes tipos celulares, particularmente de células linfoides y hematopoyéticas, líquidos corporales y extractos de tejidos, con polipéptidos receptores ACT-4 marcados, preferentemente en forma soluble en solución acuosa, a modo de sonda. Las células B activadas o las líneas de células B pueden resultar adecuadas (ver el Ejemplo 8). También resultan adecuadas las células T infectadas por HTLV-I. Con frecuencia, el receptor ACT-4 o un fragmento ligante del mismo se fusiona, o se une de otra manera, a una segunda proteína con fines de cribado. Resultan particularmente adecuadas las globulinas recombinantes formadas mediante la fusión de la parte extracelular de ACT-4-h-1 con la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Los polipéptidos ligandos ACT-4-L se purifican a partir de células u otros materiales biológicos identificados mediante este procedimiento de cribado utilizando técnicas de química clásica de proteínas. Entre estas técnicas se incluyen la precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato amónico, cromatografía de columna, procedimientos de inmunopurificación y otros (ver, por ejemplo, R. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer-Verlag, NY, 1982) (incorporada como referencia a todos los fines). Habitualmente entre los procedimientos de purificación se incluyen una etapa de cromatografía de afinidad en la que se utiliza un polipéptido receptor ACT-4 o un fragmento ligante del mismo como el reactivo inmovilizado. Las regiones constantes de ACT-4 pueden inmovilizarse convenientemente mediante la unión del grupo de región constante a la proteína A o G. Los polipéptidos ligandos ACT-4-L también pueden purificarse utilizando anticuerpos antiidiotípicos contra receptores ACT-4 como el reactivo de afinidad.

Para determinar la secuencia de aminoácidos o para obtener fragmentos polipeptídicos de un ligando, éste puede digerirse con tripsina. Pueden separarse fragmentos peptídicos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase reversa y analizarse mediante secuenciación de la fase gaseosa. También pueden utilizarse otros procedimientos de secuenciación conocidos de la técnica. Los datos de secuencias pueden utilizarse para diseñar sondas degeneradas para el aislamiento de ADNc o clones genómicos codificantes de polipéptidos ligandos ACT-4-L.

Alternativamente, pueden obtenerse clones de ADNc codificantes de polipéptidos ligandos ACT-4-L mediante clonación de expresión. En este enfoque, se prepara una biblioteca de ADNc a partir de células que expresan un polipéptido ligando ACT-4-L (identificado tal como se ha comentado *supra*). La biblioteca se expresa en células apropiadas (por ejemplo COS-7) y los clones que portan el polipéptido ligando ACT-4-L se identifican mediante cribado con ACT-4 marcado o con un fragmento ligante del mismo, opcionalmente fusionado a un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina.

La secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos predicha del primer ligando para un polipéptido receptor ACT-4 que debe caracterizarse se muestran en la fig. 10. Este ligando se denomina ACT-4-L-h-1, haciendo referencia el sufijo "h" al origen humano, e indicando el sufijo "1" que éste es el primer ligando que se caracteriza. La parte codificante de la secuencia de ADNc de ACT-4-L-h-1 es idéntica o prácticamente idéntica a la de un polipéptido denominado gp34 o TA34 (ver Miura *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11:1313-1325, 1991) (incorporada como referencia en su totalidad a todos los fines). La invención también incluye ligandos según se define en las reivindicaciones; las variantes indicadas en la presente invención típicamente muestran una identidad de secuencia sustancial con la secuencia de ACT-4-L-h-1 y contienen por lo menos 4, y más comúnmente 5, 6, 7, 10 ó 20, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de ACT-4-L-h-1. Estas variantes típicamente también se encontrarán codificadas por las secuencias de nucleótidos que muestran una identidad de secuencia sustancial con la secuencia de nucleótidos codificante de ACT-4-L-h-1 mostrada en la fig. 10. Los nucleótidos codificantes de dichas variantes típicamente también se hibridarán a una secuencia de ADN de ACT-4-L-h-1 bajo condiciones restrictivas. Sin embargo, algunos de dichos nucleótidos no se hibridan bajo condiciones restrictivas a secuencias de ADN codificantes de variantes afines inferiores (por ejemplo de rata) de ACT-4-L-1. Muchas variantes de ACT-4-L-h-1 comparten por lo menos un determinante antigénico con un polipéptido ligando ACT-4-L-h-1, según se pone de manifiesto por la reactividad cruzada con anticuerpos monoclonales o policlonales contra el mismo. Sin embargo, algunas de estas variantes no reaccionan cruzadamente con sueros contra las variantes afines inferiores de ACT-4-L-h-1.

Aunque muchos polipéptidos ligandos ACT-4-L muestran similitudes a ACT-4-L-h-1 en por lo menos uno de los aspectos comentados anteriormente, resulta enteramente posible que existan otras familias de ligandos para el receptor ACT-4 que no muestran nada en común con ACT-4-L-h-1 excepto por la capacidad de unirse específicamente a un receptor ACT-4.

Con frecuencia los polipéptidos ligandos ACT-4-L contienen modificaciones de sus esqueletos, de los tipos comentados en la Sección I, *supra*. El polipéptido ACT-4-L-h-1, por ejemplo, se encuentra fuertemente modificado en el aspecto de que el peso molecular observado es aproximadamente 34 kDa, mientras que el peso molecular predicho basándose en la secuencia de aminoácidos es de sólo 21 kDa. Se han identificado cuatro sitios putativos de glucosilación N-ligada en el dominio extracelular.

Muchos polipéptidos ligandos ACT-4-L probablemente comparten algunas o todas las características topológicas observadas en ACT-4-L-h-1. La secuencia de aminoácidos de ACT-4-L-h-1 contiene un dominio intracelular N-terminal putativo (aminoácidos 1 a 23), un dominio transmembranal hidrofóbico putativo (aminoácidos 24 a 50) y un dominio C-terminal extracelular putativo (aminoácidos 51 a 183). Esta organización estructural es consistente con que ACT-4-L-h-1 sea una proteína membranal integral de tipo II (es decir, que presente un único dominio transmembranal, comprendiendo el dominio C-terminal la región extracelular y comprendiendo el extremo N-terminal la región intracelular).

Los polipéptidos ligandos ACT-4-L también pueden compartir algunas de las características estructurales y/o funcionales de ligandos que se unen a otros miembros de la superfamilia del receptor del factor de crecimiento nervioso. Entre estos ligandos se incluyen TNF- α , TNF- β , C040-L, CD27-L, CD30-L. Aunque ACT-4-L-h-1 muestra únicamente una identidad débil de secuencia primaria de aminoácidos con TNF- α e incluso un grado menor de similitud con otros ligandos de la superfamilia, resulta evidente una mayor similitud entre todos dichos ligandos en su capacidad teórica de formar estructuras de orden superior. Los dominios extracelulares de los ligandos conocidos de la superfamilia consisten de aproximadamente 150 aminoácidos y forman varias láminas β plegadas, que se ensamblan en una estructura cilíndrica ranurada (denominada “rollo de gelatina” por Bazan *et al.*, Current Biology 3:603-606, 1993) (incorporada como referencia a todos los fines). El dominio extracelular de ACT-4-L-h-1 consiste de 133 aminoácidos, y el patrón de plegamiento predicho es consistente con la formación de láminas β plegadas y un “rollo de gelatina”. Notablemente, todos los ligandos de la superfamilia excepto TNF- β también existen, en parte, en forma de proteínas membranales integrales de superficie celular de tipo II. Los ligandos de la superfamilia también existen en forma de proteínas solubles, sugiriendo que existen dichas formas para los polipéptidos ligandos ACT-4-L. El dominio extracelular C-terminal de ACT-4-L-h-1 muestra cierta similitud de secuencia con diversas deshidrogenasas. De esta manera, algunos polipéptidos ligandos ACT-4-L pueden presentar una actividad de deshidrogenasa, que podría desempeñar un papel en la señalización intercelular.

Aparte de los polipéptidos de sustancialmente longitud completa, la presente invención proporciona fragmentos biológicamente activos de polipéptidos ligandos ACT-4-L de longitud completa según se define en las reivindicaciones. Entre las actividades biológicas significativas se incluyen la unión a un receptor ACT-4, tal como ACT-4-h-1, la unión a un segundo polipéptido ligando ACT-4-L, la unión a anticuerpos (por ejemplo el fragmento compete con un polipéptido ligando ACT-4-L-h-1 intacto para la unión específica a un anticuerpo), la inmunogenicidad (es decir, la posesión de epítomos que estimulan las respuestas de células B o T contra el fragmento) y el agonismo o antagonismo de la unión de un segundo polipéptido ligando ACT-4-L a un polipéptido receptor ACT-4, tal como ACT-4-h-1. Un segmento de un polipéptido ligando ACT-4-L de longitud completa habitualmente comprende por lo menos 5 aminoácidos contiguos, aunque no más de 160 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la fig. 10. Con frecuencia los segmentos contienen aproximadamente 10, 20, 50, 75, 100 ó 133 aminoácidos, y no más de 150 aminoácidos contiguos, de la secuencia mostrada en la fig. 10.

Algunos fragmentos contienen únicamente dominios extracelulares. Estos fragmentos contienen los dominios de longitud completa de polipéptidos ligandos ACT-4-L de origen natural. Otros fragmentos contienen componentes de los mismos. Estos fragmentos con frecuencia conservan la especificidad de unión de un polipéptido ligando ACT-4-L intacto, pero son solubles y no se encuentran unidos a membrana. Estos fragmentos resultan útiles como inhibidores competitivos de la unión de polipéptido ligando ACT-4-L a un receptor.

Los fragmentos de los polipéptidos ligandos ACT-4-L de longitud completa con frecuencia terminan, en un extremo o en ambos, cerca (es decir, a menos de aproximadamente 5, 10 ó 20 aminoácidos) de los límites de dominios funcionales o estructurales. Los fragmentos terminados en ambos extremos en límites estructurales o funcionales consisten esencialmente de un segmento (o dominio) particular de los aminoácidos de ACT-4-L responsables de una propiedad funcional o estructural. Los dominios estructurales y funcionales se identifican mediante comparación de los datos de secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos, tal como se muestra en la fig. 10, con bases de datos públicas o propietarias de secuencias. Preferentemente se utilizan procedimientos computerizados de comparación para identificar los motivos de secuencia o los dominios de conformación de proteína predichos, presentes en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Pueden identificarse dominios de unión mediante mapeo de epítomos (ver la Sección VI, *infra*). Entre los dominios estructurales se incluyen un dominio intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular. Entre los dominios funcionales se incluyen un dominio de unión extracelular a través del cual los polipéptidos ligandos ACT-4-L interaccionan con moléculas solubles externas o con receptores unidos a células y un dominio transductor de señal intracelular.

La expresión de ACT-4-L-h-1 y ligandos relacionados depende del tipo celular y del estatus de activación (ver el Ejemplo 8). Más notablemente, ACT-4-L-h-1 se detecta con facilidad en algunas líneas de células B activadas por PMA/ionomicina. ACT-4-L-h-1 se encuentra sustancialmente ausente en células B en reposo frescas. ACT-4-L-h-1 también se expresa sobre las células T infectadas por HLTV-1 y puede infectarse en otros tipos de célula T bajo algunas circunstancias (ver el Ejemplo 8).

La afinidad de un ligando ACT-4-L (expresado sobre células B activadas) para un receptor ACT-4 (expresado predominantemente en células CD4⁺ activadas) sugiere que la interacción entre el ligando y el receptor podría desempeñar un papel en la activación/diferenciación de las células T CD4⁺ y/o de las células B. La activación tanto de las células T CD4⁺ como de las células B es conocida que es un proceso multietapa que requiere estímulos específicos de antígeno y no específicos. La interacción entre ACT-4 y ACT-4-L probablemente constituye un estímulo no específico

de antígeno eficaz en uno cualquiera o en ambos tipos celulares que porten estos antígenos. El estímulo podría ser directo, por ejemplo en el caso de la unión de ligando-receptor que desencadena una actividad enzimática en el dominio intracelular de ligando y/o de receptor; actividad que a su vez inicia una cascada de sucesos metabólicos en uno o ambos tipos celulares. Alternativamente, el estímulo podría ser indirecto, por ejemplo la interacción entre ACT-4 y ACT-4-L podría incrementar la avidéz de las interacciones celulares entre otras parejas de ligando-receptor o controlar la localización y migración de los leucocitos. La interacción de ACT-4 y ACT-4-L podría actuar conjuntamente con la unión de otras parejas receptor de células T_H-B/ligando, tales como CD2/LFA-3 (Moingeon *et al.*, Nature 339:314, 1988), CD4/MHC de clase II (Doyle y Stominger, Nature 330:256-259, 1987), LFA-1/ICAM-1/ICAM-2 (Makgoba *et al.*, Nature 331:86-88, 1988) y Staunton *et al.*, Nature 339:61-64, 1989) y B7/CD28 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 173:721-730, 1991). Las interacciones ACT-4-/ACT-4-L también pueden incrementarse o reducirse debido a la unión de moléculas solubles a células T CD4⁺ y/o a células B. Las moléculas solubles probables son citoquinas, incluyendo, por ejemplo, las interleuquinas IL-1 a IL-13, los factores α y β de necrosis tumoral, los interferones α , β y γ , el factor beta de crecimiento tumoral (TGF- β), el factor estimulante de colonias (CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF).

La expresión del ligando ACT-4-L en determinados subtipos de células T en algunas circunstancias podría proporcionar papeles adicionales o alternativos para las interacciones ACT-4/ACT-4-L. Por ejemplo, la eficiencia de infección de las células T por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) u otros virus y patógenos podría resultar afectada por ACT-4 o ACT-4-L o por interacciones entre ambos. Además resulta posible que ACT-4 o ACT-4-L sean expresados por las mismas células (por ejemplo células T CD4⁺ activadas). En estas circunstancias, las interacciones entre receptor y ligando podrían afectar al crecimiento y estado de activación de sus células respectivas.

Los fragmentos o análogos que comprenden sustancialmente uno o más dominios funcionales (por ejemplo un dominio extracelular) de los polipéptidos ligandos ACT-4-L pueden fusionarse, o unirse de otra manera, a secuencias polipeptídicas heterólogas, de manera que la proteína de fusión resultante muestre la propiedad o propiedades funcionales proporcionadas por el polipéptido ligando ACT-4-L y/o la pareja de fusión. Las parejas de fusión adecuadas se han comentado en la Sección I, *supra*.

Los polipéptidos ligandos ACT-4-L pueden utilizarse para purificar por afinidad los receptores de ACT-4 respectivos. Los polipéptidos ligandos ACT-4-L también resultan útiles como agonistas o antagonistas de un segundo ligando ACXT-4-L o un receptor ACT-4, y pueden utilizarse en los procedimientos terapéuticos comentados en la Sección VII, *infra*. Los polipéptidos ligandos ACT-4 también resultan útiles en ensayos de cribado para identificar agonistas y antagonistas de ACT-4 y/o de ACT-4-L.

III. Procedimientos de producción de polipéptidos

A. Tecnologías recombinantes

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de ACT-4-h-1 mostradas en la fig. 5, y las secuencias correspondientes para otras variantes de receptor ACT-4 permiten la producción de polipéptidos de longitud completa, secuencias de polipéptidos receptores de ACT-4 y fragmentos de los mismos. De manera similar, la secuencia de aminoácidos de ACT-4-L-h-1 y las secuencias correspondientes para otras variantes de polipéptidos ligandos ACT-4-L permiten la producción de polipéptidos ligandos de longitud completa y fragmentos de los mismos. Estos polipéptidos pueden producirse en células huésped procarióticas o eucarióticas mediante la expresión de polinucleótidos codificantes de ACT-4 o ACT-4-L, o fragmentos y análogos de cualquiera de los mismos. Las secuencias de ADN clonadas se expresan en huéspedes tras ligar operablemente las secuencias a (es decir, situadas para garantizar el funcionamiento de) una secuencia de control de expresión en un vector de expresión. Los vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped, en forma de episomas o como parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente los vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo resistencia a tetraciclina o a higromicina, para permitir la detección y/o la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (ver, por ejemplo, la patente US n° 4.704.362).

E. coli es un huésped procariótico útil para clonar las secuencias de ADN de la presente invención. entre otros huéspedes microbianos adecuados para la utilización se incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procarióticos, también pueden prepararse vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo un origen de replicación). Además, se encuentra presente cualquiera de entre una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema de promotor lactosa, un sistema de promotor triptófano (trp), un sistema de promotor beta-lactamasa, o un sistema promotor procedente del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y presentan secuencias de sitio de unión ribosómica y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

También pueden utilizarse otros microbios, tales como levaduras, para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped preferente, presentando los vectores adecuados secuencias de control de la expresión, tales como promotores, incluyendo la 3-fosfoglicerato quinasa u otros enzimas glucolíticos, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. También resultan adecuadas las células de insecto (por ejemplo SF9) con vectores apropiados.

dos, habitualmente derivados de baculovirus, para expresar un receptor ACT-4 o polipéptidos ligados (ver Luckow *et al.*, Bio/Technology 6:47-55, 1988, incorporada como referencia a todos los fines).

También puede utilizarse un cultivo celular de tejido eucariótico superior de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (ver Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, NY, NY, 1987) (incorporada como referencia a todos los fines). Las células eucarióticas de hecho resultan preferentes, debido a que se han desarrollado en la técnica varias líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar y modificar realmente las proteínas humanas, y entre ellas se incluyen las líneas de células CHO, diversas líneas de células COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células de Jurkat, etc. Entre los vectores de expresión para estas células pueden incluirse secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor (por ejemplo un promotor *tk* o un promotor *pgk* (fosfoglicerato quinasa) de HSV), un intensificador (Queen *et al.*, Immunol. Rev. 89:49, 1986) y sitios necesarios de procesamiento de la información, tales como sitios de unión ribosómica, sitios de procesamiento del ARN, sitios de poliadenilación (por ejemplo un sitio de adición de antígeno T grande de SV40-poliA) y secuencias terminadoras de transcripción. Las secuencias de control de expresión preferentes son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino y similares. Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés (por ejemplo polipéptidos codificantes de un receptor ACT-4) pueden transferirse al interior de la célula huésped mediante procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo la transfección con CaCl_2 se utiliza comúnmente para las células procarióticas, mientras que el tratamiento con CaPO_4 o la electroporación pueden utilizarse para otros huéspedes celulares. Los vectores pueden encontrarse presentes en forma de episomas o integrados en el cromosoma del huésped.

B. Polipéptidos ACT-4 o ACT-4-L naturales

Se aíslan polipéptidos receptores de ACT-4 naturales mediante técnicas convencionales, tales como la cromatografía de afinidad. Por ejemplo, se cultivan anticuerpos policlonales o monoclonales contra ACT-4-h-1 anteriormente purificado y unido a una columna de afinidad adecuada mediante técnicas bien conocidas (ver, por ejemplo, Hudson y Hay, Practical Immunology (Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1980), capítulo 8, incorporada como referencia a todos los fines). Por ejemplo, puede inmovilizarse anti-ACT-4-h-1 en una columna de proteína A-sefaraosa mediante entrecruzamiento del dominio Fc con un agente de entrecruzamiento homobifuncional, tal como pimelimidato de dimetilo. A continuación, se pasan los extractos celulares a través de la columna y la proteína receptora ACT-4 unida específicamente a la columna se eluye con, por ejemplo, ácido pirogénico 0,5 M, pH 2,5. Habitualmente, se obtiene una forma intacta de receptor de ACT-R mediante dichas técnicas de aislamiento. Se generan fragmentos peptídicos a partir de receptores de ACT-4 intactos mediante corte químico (por ejemplo bromuro de cianógeno) o enzimático (por ejemplo proteasa V8 o tripsina) de la molécula intacta. Pueden purificarse polipéptidos ligados ACT-4-L naturales utilizando un enfoque análogo, excepto en que el reactivo de afinidad es un anticuerpo específico para ACT-4-L-h-1.

C. Otros procedimientos

Alternativamente, pueden sintetizarse polipéptidos ACT-4 o ACT-4-L mediante procedimientos químicos o producirse mediante sistemas de traducción *in vitro* utilizando un molde polinucleótido para dirigir la traducción. Los procedimientos para la síntesis química de polipéptidos y la traducción *in vitro* son bien conocidos de la técnica y se describen adicionalmente en Berger y Kimmel, Methods in Enzymology, volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987).

IV. Ácidos nucleicos

A. Clonación de ácidos nucleicos de ACT-4 o ACT-4-L

El Ejemplo 5 presenta datos de secuencias de ácidos nucleicos para un clon de ADNc de un receptor ACT-4 denominado ACT-4-h-1. La secuencia incluye una región traducida y regiones 3' y 5' flanqueantes. Estos datos de secuencia pueden utilizarse para diseñar sondas con las que aislar otros genes de receptor ACT-4. Entre estos genes se incluyen el gen genómico humano codificante de ACT-4-h-1 y ADNcs y clones genómicos de especies de mamífero superior, y variantes alélicas y no alélicas, y mutantes naturales e inducidas de la totalidad de estos genes. Específicamente se proporcionan todos los fragmentos de ácidos nucleicos codificantes de todos los polipéptidos receptores de ACT-4 dados a conocer en la presente solicitud. Se encuentran disponibles comercialmente bibliotecas genómicas de muchas especies (por ejemplo, Clontech, Palo Alto, CA) o pueden aislarse *de novo* mediante procedimientos convencionales. Las bibliotecas de ADNc se preparan mejor a partir de células CD4^+ activadas, que expresan ACT-4-h-1 en grandes cantidades.

Las sondas utilizadas para aislar clones típicamente comprenden una secuencia de aproximadamente por lo menos 24 nucleótidos contiguos (o el complemento de los mismos) de la secuencia de ADNc mostrada en la fig. 5. Por ejemplo, puede marcarse un polinucleótido de longitud completa correspondiente a la secuencia mostrada en la fig. 5 y utilizarse como sonda de hibridación para aislar clones genómicos a partir de una biblioteca de clones genómicos humanos en, por ejemplo, λ EMBL4 o λ GEM11 (Promega Corporation, Madison, WI); las condiciones de hibridación típicas para el cribado de transferencias de placa (Benton y Davis, Science 196:180, 1978) pueden ser: 50% de formamida, 5 x SSC o SSPE, 1-5 x solución de Denhardt, SDS al 0,1-1%, 100 a 200 μg de ADN heterólogo cor-

tado, dextrán sulfato al 0-10%, 1×10^5 a 1×10^7 cpm/ml de sonda desnaturalizada con una actividad específica de aproximadamente 1×10^8 cpm/ μ g e incubación a 42°C durante aproximadamente 6 a 36 horas. Las condiciones de prehibridación son esencialmente idénticas excepto en que no se incluye sonda y típicamente se reduce el tiempo de incubación. Las condiciones de lavado típicamente son: 1 a 3 x SSC, SDS al 0,1-1%, 50°C a 70°C con un cambio de la solución de lavado tras aproximadamente 5 a 30 minutos. Las condiciones de hibridación y de lavado típicamente son menos restrictivas para el aislamiento de variantes afines superiores o de variantes no alélicas que para, por ejemplo, el clon genómico humano de ACT-4-h-1.

Alternativamente pueden utilizarse sondas para clonar genes del receptor ACT-4 mediante procedimientos que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los procedimientos de amplificación por PCR se describen en, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (editor H.A. Erlich, Freeman Press, NY, NY, 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (editores Innis *et al.*, Academic Press, San Diego, CA, 1990); Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:4967, 1991; Eckert, K.A. y Kunkel, T.A., PCR Methods and Applications 1:17, 1991; PCR (editores McPherson *et al.*, IRL Press, Oxford) y patente US nº 4.683.202 (cada una de las cuales se incorpora como referencia a todos los fines).

Alternativamente, pueden construirse secuencias polinucleótidas sintéticas correspondientes a la totalidad o parte de las secuencias mostradas en la fig. 5 mediante síntesis química de oligonucleótidos. Pueden incorporarse sustituciones, deleciones y adiciones de nucleótidos en los polinucleótidos de la invención. La variación de la secuencia de nucleótidos puede resultar de la degeneración del código genético, de los polimorfismos de secuencia de diversos alelos del receptor ACT-4, de errores menores de secuenciación o puede introducirse mediante mutagénesis aleatoria de los ácidos nucleicos codificantes utilizando irradiación o exposición a EMS, o mediante cambios introducidos mediante mutagénesis sitio-específica u otras técnicas de la biología molecular moderna (ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, C.S.H.P. Press, NY, 2a edición, 1989) (incorporada como referencia a todos los fines). Para las secuencias de nucleótidos que son capaces de transcribirse y traducirse para producir un polipéptido funcional, la degeneración del código genético resulta en varias secuencias de nucleótidos que codifican el mismo polipéptido. La invención incluye todas dichas secuencias. Generalmente las sustituciones, deleciones y adiciones de nucleótidos no deberían alterar sustancialmente la capacidad de un polinucleótido de receptor ACT-4 de hibridarse a la secuencia de ACT-4-h-1 mostrada en la fig. 5 bajo condiciones restrictivas. Típicamente los polinucleótidos del receptor ACT-4 comprenden por lo menos 25 nucleótidos consecutivos que son sustancialmente idénticos a una secuencia de receptor ACT-4 natural (por ejemplo, fig. 5), más habitualmente los polinucleótidos de receptor ACT-4 comprenden por lo menos 50 a 100 nucleótidos consecutivos, que son sustancialmente idénticos a una secuencia de receptor ACT-4 natural.

Los polinucleótidos de receptor ACT-4 pueden ser oligonucleótidos cortos (por ejemplo aproximadamente 10, 15, 25, 50 ó 100 bases contiguas de la secuencia de ACT-h-1 mostrada en la fig. 5), tal como para la utilización como sondas de hibridación y cebadores de PCR (o LCR). Las secuencias polinucleótidas de receptor ACT-4 también pueden comprender parte de un polinucleótido mayor que incluye secuencias que facilitan la transcripción (secuencias de expresión) y la traducción de las secuencias codificantes, de manera que se produce el producto polipéptido codificado. La construcción de dichos polinucleótidos es bien conocida de la técnica y se describe adicionalmente en Sambrook *et al.*, *supra* (C.S.H.P. Press, NY, 2a edición, 1989). El polinucleótido del receptor ACT-4 puede fusionarse en el mismo marco de lectura con otra secuencia polinucleótida codificante de una proteína diferente (por ejemplo glutatión S-transferasa, β -galactosidasa o un dominio Fc de inmunoglobulina) para codificar la expresión de una proteína de fusión (ver, por ejemplo, Bym *et al.*, Nature 344:667-670, 1990) (incorporada como referencia a todos los fines).

Los ácidos nucleicos codificantes de los genes de ACT-4-L pueden producirse mediante un enfoque análogo, utilizando la secuencia de ADNc de ACT-4-L-h-1 mostrada en la fig. 10 como material de partida para el diseño de la sonda. Entre los genes de ACT-4-L se incluyen el gen genómico humano codificante de ACT-4-L-h-1, variantes alélicas y no alélicas, variantes afines superiores y mutantes naturales e inducidos de la totalidad de dichos genes. Específicamente, se proporcionan todos los fragmentos de ácidos nucleicos (genómicos, ADNc o sintéticos) codificantes de todos los polipéptidos ACT-4-L dados a conocer en la presente solicitud. En los fragmentos de ácidos nucleicos que presentan mutaciones de secuencias naturales, generalmente la mutación no altera sustancialmente la capacidad de un polinucleótido de ACT-4-L de hibridarse con la secuencia de nucleótidos de ACT-4-L-h-1 bajo condiciones restrictivas. Los polinucleótidos del ligando ACT-4-L pueden ser oligonucleótidos cortos (por ejemplo 10, 15, 25, 50 ó 100 bases contiguas de la secuencia de ACT-4-L-h-1 mostrada en la fig. 10), tal como para la utilización como sondas de hibridación y cebadores de PCR (o de LCR). Las secuencias polinucleótidas del ligando ACT-4-L también pueden comprender parte de un polinucleótido mayor, tal como se ha comentado en referencia a las secuencias polinucleótidas de ACT-4.

V. Anticuerpos e hibridomas

En otra realización de la invención, se proporcionan anticuerpos contra los polipéptidos AT-4-L según se define en las reivindicaciones.

A. Características generales de los anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas típicamente están compuestas de cuatro cadenas peptídicas unidas covalentemente. Por ejemplo, un anticuerpo IgG presenta dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera se

encuentra covalentemente unida a una cadena pesada. A su vez, cada cadena pesada se encuentra unida covalentemente a la otra, formando una configuración de “Y”, también conocida como conformación de inmunoglobulina. Los fragmentos de estas moléculas, o incluso cadenas pesadas o ligeras solas, pueden unirse a antígenos. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y las cadenas individuales también se denominan en la presente invención inmunoglobulinas.

Una cadena pesada o ligera de anticuerpo normal presenta una región variable (V) N-terminal (NH_2) y una región constante (C) C-terminal ($-\text{COOH}$). La región variable de cadena pesada se denomina V_H (incluyendo, por ejemplo, V_{γ}) y la región variable de cadena ligera se denomina V_L (incluyendo V_{κ} o V_{λ}). La región variable es la parte de la molécula que se une al antígeno afín del anticuerpo, mientras que la región Fc (el segundo y tercer dominios de la región C) determina la función efectora del anticuerpo (por ejemplo la fijación del complemento, la opsonización). La inmunoglobulina de longitud completa o las “cadenas ligeras” del anticuerpo (generalmente de aproximadamente 25 kDa, aproximadamente 214 aminoácidos) se encuentran codificadas por un gen de región variable en el extremo N-terminal (generalmente de aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante κ (kappa) o λ (lambda) en el extremo COOH. La inmunoglobulina de longitud completa o las “cadenas pesadas” de anticuerpo (generalmente de aproximadamente 50 kD, aproximadamente 446 aminoácidos) se encuentran codificadas de manera similar por un gen de región variable (generalmente codificante de aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los genes de la región constante, por ejemplo gamma (codificante de aproximadamente 330 aminoácidos). Típicamente “ V_L ” incluye la parte de la cadena ligera codificada por los segmentos génicos V_L y/o J_L (J, región de unión) y “ V_H ” incluye la parte de la cadena pesada codificada por los segmentos génicos V_H y/o D_H (D, región de diversidad) y J_H (ver, de manera general, Roitt *et al.*, Immunology (2a edición, 1989), capítulo 6, y Paul, Fundamental Immunology (Raven Press, 2a edición, 1989) (cada una de las cuales se incorpora como referencia a todos los fines).

Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste de una “región marco” interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDRs. Se ha definido la amplitud de la región marco y de las CDRs (ver Kabat *et al.*, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Department of Health and Human Services, 1987; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987) (cada una de las cuales se incorpora como referencia a todos los fines). Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se encuentran relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para situar y alinear las CDRs en el espacio tridimensional. Las CDRs son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDRs típicamente se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente partiendo del extremo N-terminal.

La región constante de la molécula de cadena pesada, también conocida como C_H , determina el isotipo del anticuerpo. Los anticuerpos se denominan IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, dependiendo del isotipo de la cadena pesada. Los isotipos se encuentran codificados en los segmentos mu (μ), delta (Δ), gamma (γ), alfa (α) y epsilon (ϵ) de la región constante de la cadena pesada, respectivamente. Además, existen varios subtipos de γ . Existen dos tipos de cadena ligera: κ y λ . Los determinantes de estos subtipos típicamente residen en la región constante de la cadena ligera, también denominada C_L en general, y C_{κ} o C_{λ} , en particular.

Los isotipos de cadena pesada determinan diferentes funciones efectoras del anticuerpo, tales como la opsonización o la fijación del complemento. Además, el isotipo de la cadena pesada determina la forma secretada del anticuerpo. Los isotipos IgG, IgD e IgE secretados se encuentran típicamente en forma de única unidad o monomérica. El isotipo IgM secretado se encuentra en forma pentamérica; puede encontrarse IgA secretado en forma tanto monomérica como dimérica.

B. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos que se unen a un receptor ACT-4, a un ligando ACT-4-L o a fragmentos ligantes de cualquiera de los mismos, pueden producirse mediante una diversidad de medios. La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo murinos, de rata, etc., es bien conocida y puede conseguirse, por ejemplo, inmunizando el animal con una preparación que contiene un receptor ACT-4 o los ligandos del mismo, o un fragmento inmunogénico de cualquiera de los mismos. Particularmente, resultan útiles como inmunógenos las células establemente transfectadas con un gen de ACT-4 o ACT-4-L recombinante y expresando un receptor ACT-4 o ligando para el mismo sobre la superficie de dichas células. Las células productoras de anticuerpos obtenidas a partir de los animales inmunizados se immortalizan y se criban para la producción de un anticuerpo que se une a los receptores de ACT-4 o los ligandos de los mismos (ver Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, C.S.H.P. NY, 1988) (incorporada como referencia a todos los fines). Varios anticuerpos murinos contra una proteína que presentan una secuencia de aminoácidos primaria idéntica o sustancialmente similar a ACT-4-L-h-1 han sido comentados por Tozawa *et al.*, Int. J. Cancer 41:231-238, 1988; Tanaka *et al.*, Int. J. Cancer 36:549-555, 1985 (incorporada como referencia en su totalidad a todos los fines).

También se han descrito varias técnicas para generar anticuerpos monoclonales humanos, aunque generalmente resultan más onerosas que las técnicas murinas y no aplicables a todos los antígenos (ver, por ejemplo, Larrick *et al.*, patente US n° 5.001.065, para una revisión (incorporada como referencia a todos los fines)). Una técnica que ha sido utilizada con éxito para generar anticuerpos monoclonales humanos contra una diversidad de antígenos es la metodología del trioma de Ostberg *et al.*, Hybridoma 2:361-367, 1983; Ostberg, patente US n° 4.634.664, y Engleman *et al.*, patente US n° 4.634.666 (incorporada como referencia a todos los fines). Las líneas celulares productoras de anticuerpos obtenidas mediante el presente procedimiento se denominan triomas, debido a que descenden de tres

células: dos humanas y una de ratón. Se ha encontrado que los triomas producen anticuerpos más establemente que los hibridomas ordinarios preparados a partir de células humanas.

Un enfoque alternativo es la generación de inmunoglobulinas humanizadas mediante la unión de las regiones CDR de anticuerpos no humanos a regiones constantes humanas mediante técnicas de ADN recombinante (ver Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989, y patente WO n° 90/07861 (incorporada como referencia a todos los fines). Las inmunoglobulinas humanizadas presentan residuos de marco de región variable sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina humana (denominada inmunoglobulina aceptora) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina de ratón, por ejemplo el anticuerpo L106 (ver el Ejemplo 1) (denominada inmunoglobulina donante). La región o regiones constantes, en caso de hallarse presentes, también proceden sustancialmente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos habitualmente se seleccionan de entre los anticuerpos humanos cuyas secuencias de marco muestran un grado elevado de identidad de secuencia con los dominios de región variable murina a partir de los que se derivan las CDRs. Los residuos de marco de región variable de cadena pesada y de cadena ligera pueden derivarse a partir de secuencias de anticuerpo humano iguales o diferentes. Las secuencias de anticuerpo humanas pueden ser secuencias de anticuerpos humanos naturales o pueden ser secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos (ver Carter *et al.*, patente WO n° 92/22653). Se seleccionan determinados aminoácidos de entre los residuos de marco de la región variable humana para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación y/o unión al antígeno de la CDR. La investigación de estas posibles influencias se realiza mediante modelado, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido es diferente en un residuo de marco de región variable de L106 murino y en un residuo de marco de región variable humana seleccionada, el aminoácido de marco humano habitualmente debería sustituirse por el aminoácido de marco equivalente procedente del anticuerpo de ratón cuando se espere razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de manera no covalente al antígeno directamente,
- (2) sea contiguo a una región CDR,
- (3) interaccione de otra manera con una región CDR (por ejemplo se encuentre a menos de aproximadamente 3 Å de una región CDR), o
- (4) participe en la interfaz V_L - V_H .

Otros candidatos para la sustitución con aminoácidos de marco humanos aceptores que son poco habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse por aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo L106 o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas.

Un enfoque adicional para aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento ligante del mismo es mediante cribado de una biblioteca de ADN procedente de células B humanas según el protocolo general descrito de manera general por Huse *et al.*, Science 246:1275-1281, 1989, y después clonar y amplificar las secuencias que codifican el anticuerpo (o fragmento ligante) de la especificidad deseada. El protocolo descrito por Huse resulta más eficiente en combinación con tecnología de expresión fágica (ver, por ejemplo, Dower *et al.*, patente WO n° 91/17271 y McCafferty *et al.*, patente WO n° 92/01047). La tecnología de expresión fágica también puede utilizarse para mutagenizar regiones CDR de anticuerpos que se ha mostrado previamente que presentan afinidad para los receptores de ACT-4 o los ligandos de los mismos. Se seleccionan los anticuerpos que presentan afinidad de unión mejorada.

Los anticuerpos anti-receptor ACT-4 que se unen específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo L106 habitualmente se identifican mediante un ensayo de unión competitiva. El ensayo presenta tres componentes: un polipéptido ACT-4 (por ejemplo ACT-4-h-1), anticuerpo L106, que habitualmente se encuentra marcado, y el anticuerpo bajo ensayo. Con frecuencia el polipéptido receptor ACT-4 se inmoviliza en un soporte sólido. El anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo que el anticuerpo L106 si reduce la cantidad de anticuerpo L106 que se une específicamente al polipéptido receptor ACT-4. El grado de cribado necesario para obtener dichos anticuerpos puede reducirse generando anticuerpos mediante un protocolo en el que el epítipo específico unido por L106 se utiliza como inmunógeno. Los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que L106 pueden mostrar una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica, aunque no completamente, a la del anticuerpo L106, o pueden presentar una estructura primaria no relacionada con el anticuerpo L106.

Se identifican anticuerpos anti-ACT-4 que presentan una especificidad de unión diferente que L106 (es decir, que se unen a un epítipo diferente) mediante un enfoque complementario. Los anticuerpos de ensayo se criban para su incapacidad de competir con el anticuerpo L106 para la unión a un polipéptido receptor ACT-4. El grado de cribado puede reducirse mediante la generación de anticuerpos mediante un protocolo en el que se utiliza como inmunógeno un fragmento sin un epítipo específico unido por L106.

Los anticuerpos que presentan la misma o diferente especificidad de unión para un anticuerpo seleccionado contra un polipéptido ligando ACT-4-L pueden identificarse mediante procedimientos análogos.

Los anticuerpos que presentan la capacidad de estimular o inhibir la activación de las células CD4⁺ o B pueden identificarse mediante los procedimientos de cribado comentados en la Sección VI, *infra*. Algunos anticuerpos pueden inhibir selectivamente la activación en respuesta a algunos estímulos (por ejemplo aloantigénicos pero no mitogénicos, o viceversa) y no a otros. La capacidad inhibidora de algunos anticuerpos podría depender del momento tras la activación en el que se añade el anticuerpo. Algunos anticuerpos podrían presentar la capacidad de activar células CD4⁺ o B independientemente de otros estímulos, mientras que otros anticuerpos podrían presentar únicamente la capacidad de incrementar la eficacia de otro estímulo, tal como el proporcionado por PHA o PMA/yonomicina.

Los anticuerpos aislados mediante los procedimientos anteriores pueden utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotípicos mediante, por ejemplo, la inmunización de un animal con el anticuerpo primario. Para los anticuerpos anti-receptor ACT-4, se seleccionan los anticuerpos anti-idiotípicos cuya unión al anticuerpo primario resulta inhibida por los receptores de ACT-4 o fragmentos de los mismos. Debido a que tanto el anticuerpo anti-idiotípico y los receptores de ACT-4 o fragmentos de los mismos se unen a la inmunoglobulina primaria, la inmunoglobulina anti-idiotípica podría representar la "imagen interna" de un epítipo y de esta manera podría sustituir el polipéptido ligando ACT-4-L. Los anticuerpos anti-idiotípicos contra un polipéptido ligando ACT-4-L que pueden sustituir a un receptor ACT-4 pueden producirse mediante un enfoque análogo.

C. Mapado de epítipos

El epítipo unido al anticuerpo L106 o cualquier otro anticuerpo seleccionado contra un receptor ACT-4 se determina proporcionando una familia de fragmentos que contiene diferentes segmentos de aminoácidos que un polipéptido receptor ACT-4, tal como ACT-4-h-1. Cada fragmento típicamente comprende por lo menos 4, 6, 8, 10, 20, 50 ó 100 aminoácidos contiguos. Colectivamente la familia de polipéptidos cubre una gran parte o la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido receptor ACT-4 de longitud completa. Los miembros de la familia se someten a ensayo individualmente para la unión a, por ejemplo, el anticuerpo L106. El fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo bajo ensayo delimita la secuencia de aminoácidos del epítipo reconocido por el anticuerpo. Se utiliza un enfoque análogo para localizar los epítipos ligados por anticuerpos contra los polipéptidos ligandos de ACT-4.

D. Fragmentos de anticuerpos e inmunotoxinas

También se describen en la presente invención fragmentos de anticuerpos contra receptores de ACT-4 o los ligandos de los mismos. Típicamente estos fragmentos muestran unión específica al receptor o ligando de ACT-4 con una afinidad de por lo menos 10⁷ M, y más típicamente de 10⁹ ó 10⁹ M. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen cadenas pesadas separadas, Fab de cadenas ligeras, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv. Se producen fragmentos mediante técnicas de ADN recombinante o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

También se describen en la presente invención inmunotoxinas.

Una inmunotoxina es un compuesto quimérico que consiste de una toxina unida a un anticuerpo con una especificidad deseada. El anticuerpo sirve como agente de reconocimiento para la toxina (ver, de manera general, Pastan *et al.*, Cell 47:641-648, 1986). Un grupo toxina se acopla a un anticuerpo intacto o a un fragmento del mismo mediante técnicas químicas o de ADN recombinante. Preferentemente la toxina se une a una cadena de inmunoglobulina en forma de una proteína contigua (ver, por ejemplo, Chovnick *et al.*, Cancer Res. 51:465; Chaudhary *et al.*, Nature 339:394, 1989) (incorporada como referencia a todos los fines). Se proporcionan ejemplos de componentes toxinas adecuados en la Sección I, *supra*, y se revisan en, por ejemplo, The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins (editor P. Cuatrecasas, Chapman Hall, London, 1976) (incorporada como referencia a todos los fines).

E. Hibridomas y otras líneas celulares

Se describen en la presente invención hibridomas, triomas y otras líneas celulares productoras de los anticuerpos y fragmentos de los mismos comentados *supra*. Entre estos se incluyen la línea de hibridoma HBL106, depositada bajo el Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection, Rockville, MD 20852 como ATCC n° HB11483, que produce el anticuerpo de ratón L106.

F. Usos de anticuerpos

Los anticuerpos contra los polipéptidos ACT-4 y ACT-4-L y los fragmentos de unión de los mismos resultan útiles para cribar las bibliotecas de expresión de ADNc, que contienen preferentemente ADNc humano o de primate derivado de diversos tejidos y para identificar clones que contienen inserciones de ADNc, que codifican proteínas estructuralmente relacionadas con reactividad inmunológica cruzada (ver Aruffo y Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8573-8577, 1987). Los anticuerpos también resultan útiles para identificar y/o purificar proteínas con reactividad inmunológica cruzada relacionados con los polipéptidos nativos receptor ACT-4 o ligando ACT-4-L o a fragmentos de los mismos utilizados para generar el anticuerpo. Los usos diagnósticos y terapéuticos de los anticuerpos, fragmentos ligantes de los mismos, inmunotoxinas y anticuerpos idiotípicos se describen en la Sección VII, *infra*.

VI. Cribado para agonistas y antagonistas

Los polipéptidos ACT-4 y ACT-4-L, fragmentos, análogos de los mismos, anticuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos de los mismos, así como otros agentes químicos o biológicos, se criban para su capacidad de bloquear o incrementar la unión de un ACT-4 a su ligando. Además, se someten a ensayo para su capacidad de estimular o inhibir los procesos metabólicos, tales como la síntesis de ADN o la fosforilación de proteínas en células que portan un receptor ACT-4 o un polipéptido ligando ACT-4-L anclado a las superficies de las mismas.

En algunos procedimientos, el compuesto bajo ensayo se criba para su capacidad de bloquear o incrementar la unión de un fragmento purificado ligante de un receptor ACT-4 (o proteína de fusión del mismo) a un fragmento purificado ligante de un polipéptido ligando ACT-4-L (o proteína de fusión del mismo). En estos experimentos, el receptor o fragmento de ligando habitualmente se inmovilizan en un soporte sólido. A continuación, el compuesto de ensayo compite con un fragmento de ACT-4 o de ACT-4-L (el que no se encuentre unido a un soporte sólido) para la unión al soporte. Habitualmente, el compuesto de ensayo o el ligando o receptor se encuentra marcado.

En otros procedimientos, el polipéptido receptor ACT-4 y el ligando ACT-4-L o fragmentos ligantes de estas moléculas, se expresan sobre una superficie celular. Por ejemplo, un polipéptido ligando ACT-4-L puede expresarse sobre células B activadas y/o un polipéptido receptor ACT-4 expresado sobre células T CD4⁺ activadas. Alternativamente, el ligando o el receptor pueden expresarse a partir de ADN recombinante en, por ejemplo, las células COS-7 (ver el Ejemplo 6). En estos procedimientos, la existencia de agonismo o antagonismo se determina a partir del grado de unión entre un receptor ACT-4 y el ligando del mismo que se observa en presencia del compuesto de ensayo. Alternativamente, la actividad del compuesto de ensayo se somete a ensayo mediante la medición de la incorporación de ³H-timidina en ADN o la incorporación de ³²P en proteínas en células que portan un receptor ACT-4 y/o células que portan un polipéptido ligando ACT-4-L.

Los compuestos que bloquean la síntesis de ADN inducida por el polipéptido ACT-4 o ACT-4-L o la desfosforilación de proteínas son antagonistas. Los compuestos que activan la síntesis o la fosforilación del ADN mediante la interacción con un receptor ACT-4 o los ligandos del mismo son agonistas. La actividad agonista o antagonista también puede determinarse a partir de otros criterios de valoración funcionales o físicos de activación de los leucocitos, o a partir de resultados clínicamente deseables o no deseables, tales como la actividad citolítica o la extravasación de leucocitos hacia tejidos procedentes de vasos sanguíneos.

La capacidad de los agentes de agonizar o antagonizar la proliferación de las células T *in vitro* puede correlacionarse con la capacidad de afectar a la respuesta inmunológica *in vivo*. La actividad *in vivo* típicamente se somete a ensayo utilizando modelos animales adecuados, tales como ratones o ratos. Para someter a ensayo el efecto de los agentes sobre el rechazo del aloinjerto, por ejemplo, pueden administrarse potenciales agentes terapéuticos en los animales en diversos tiempos antes de la introducción del tejido alogénico, y puede realizarse el seguimiento de los animales para el rechazo del trasplante. Se han descrito procedimientos adecuados para llevar a cabo el trasplante y el seguimiento del rechazo del trasplante (ver, por ejemplo, Hislop *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. 100:360-370, 1990) (incorporada como referencia a todos los fines).

VII. Procedimientos y composiciones terapéuticas y diagnósticas

A. Procedimientos diagnósticos

Las enfermedades y condiciones del sistema inmunológico asociadas a alteraciones de la abundancia, o a la mutación funcional, de un receptor ACT-4 o el ARNm del mismo, o de un ligando ACT-4-L o el ARNm del mismo pueden diagnosticarse utilizando las sondas y/o anticuerpos de la presente invención. La detección de un receptor ACT-4 o ARNm permite distinguir las células T CD4⁺ activadas de otros subtipos de leucocito. Por ejemplo, puede detectarse un receptor ACT-4 utilizando un anticuerpo o un polipéptido ACT-4-L que se una específicamente al receptor ACT-4. La presencia de células T CD4⁺ activadas es indicativa de una respuesta inmunológica inducida por MHC de clase II contra, por ejemplo, bacterias invasoras. La comparación del número de células CD4⁺ y CD8⁺ activadas podría permitir el diagnóstico diferencial entre infección bacteriana y vírica, inducidas predominantemente por estos tipos celulares activados respectivos. La presencia de células CD4⁺ activadas también es indicativa de enfermedades y condiciones no deseables del sistema inmunológico, tales como el rechazo del aloinjerto, la enfermedad del injerto contra el huésped, enfermedades autoinmunitarias, alergias e inflamación. Puede realizarse el seguimiento de la eficacia de los agentes terapéuticos en el tratamiento de dichas enfermedades y condiciones.

La detección del ligando ACT-4-L o el ARNm del mismo podría indicar la presencia de células B activadas y/o señalar que es inminente la aparición de células T CD4⁺ activadas. El ligando ACT-4-L puede detectarse, por ejemplo, utilizando un anticuerpo o un polipéptido receptor ACT-4 que se una específicamente al ligando ACT-4-L. La detección sucesiva del ligando ACT-4-L seguida del receptor ACT-4 (o viceversa) podría permitir el seguimiento de la progresión a través de diferentes estadios temporales de la activación en una respuesta inmunológica.

El diagnóstico puede llevarse a cabo extrayendo una muestra celular (por ejemplo una muestra de sangre, una biopsia o tejido de nódulo linfático) de un paciente. A continuación, la muestra se somete a análisis para determinar: (1) la cantidad de receptor ACT-4 o ligando ACT-4-L expresado en células individuales de la muestra (por ejemplo mediante tinción inmunohistoquímica de células fijadas con un anticuerpo, o mediante análisis FACSTM), (2) la canti-

dad de ARNm de receptor ACT-4 o de ligando ACT-4-L en células individuales (mediante hibridación *in situ* con una sonda polinucleótida complementaria marcada), (3) la cantidad de ARNm de receptor ACT-4 o de ligando ACT-4-L en la muestra celular mediante extracción del ARN seguido de hibridación a una sonda polinucleótida complementaria marcada (por ejemplo mediante transferencia northern, transferencia por puntos, hibridación en solución o PCR cuantitativa), o (4) la cantidad de receptor ACT-4 o ligando ACT-4-L en la muestra celular (por ejemplo mediante rotura celular seguida de inmunoensayo o de transferencia western del extracto celular resultante).

El diagnóstico también puede llevarse a cabo mediante la administración *in vivo* de un reactivo diagnóstico (por ejemplo un anticuerpo anti-ACT-4 o anti-ACT-4-L marcado para el seguimiento de las células T CD4⁺ o de las células B, respectivamente) y la detección mediante imágenes *in vivo*. La concentración de agente diagnóstico administrado debería resultar suficiente para que la unión a aquellas células con el antígeno diana resulte detectable comparado con la señal de fondo. Además, resulta deseable que el reactivo diagnóstico pueda ser rápidamente eliminado del sistema circulatorio con el fin de proporcionar la mejor proporción de señal diana-fondo. El reactivo diagnóstico puede marcarse con un radioisótopo para la obtención de imágenes fotográficas, o con un isótopo paramagnético para la resonancia magnética o la obtención de imágenes de resonancia de espín electrónico.

Un cambio (típicamente un incremento) del nivel de proteína o de ARNm de un receptor ACT-4 o de ligando ACT-4-L en una muestra celular de un individuo que se encuentre fuera del rango de niveles clínicamente establecidos como normales, podría indicar la presencia de una reacción inmunológica no deseable en el individuo del que se obtuvo la muestra y/o indicar una predisposición del individuo a desarrollar (o progresar a través) de dicha reacción. Los niveles de proteína o de ARNm pueden utilizarse como marcador de diferenciación para identificar y tipar células de determinados linajes (por ejemplo células CD4⁺ activadas para el receptor ACT-4) y orígenes del desarrollo. Esta detección específica de tipo celular puede utilizarse para el diagnóstico histopatológico de respuestas inmunológicas no deseadas.

B. Kits diagnósticos

También se describen en la presente invención kits diagnósticos para los procedimientos diagnósticos descritos *supra*. Los kits comprenden uno o más recipientes que alojan los reactivos diagnósticos, tales como anticuerpos marcados contra receptores de ACT-4 y ligandos ACT-4-L, y reactivos y/o aparato para detectar el marcaje. También pueden incluirse otros componentes presentes rutinariamente en estos kits, conjuntamente con instrucciones para llevar a cabo el ensayo diagnóstico.

C. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas utilizadas para el tratamiento profiláctico o terapéutico comprenden un agente terapéutico activo, por ejemplo un receptor ACT-4, un ligando ACT-4-L, fragmentos de los mismos, y anticuerpos y anticuerpos idiotípicos de los mismos, y una diversidad de otros componentes. La forma preferente depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos utilizados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de estos diluyentes, agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros portadores, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

D. Procedimientos terapéuticos

Los procedimientos terapéuticos utilizan los agentes terapéuticos comentados anteriormente para el tratamiento de diversas enfermedades en seres humanos o animales, particularmente en mamíferos vertebrados. Entre los agentes terapéuticos se incluyen receptores de ACT-4, fragmentos ligantes de los mismos, ligandos ACT-4-L, fragmentos ligantes de los mismos, receptor anti-ACT-4 y anticuerpos anti-ligando ACT-4-L y anticuerpos anti-idiotípicos de los mismos, fragmentos ligantes de estos anticuerpos, versiones humanizadas de estos anticuerpos, inmunotoxinas y otros agentes comentados *supra*. Algunos agentes terapéuticos funcionan bloqueando o antagonizando la acción de un receptor ACT-4 con su ligando. Los agentes terapéuticos preferentes compiten con el ligando para la unión al receptor o compiten con el receptor para la unión al ligando. Otros agentes terapéuticos funcionan eliminando células que portan un polipéptido contra el que se dirige el agente. Por ejemplo, los anticuerpos anti-receptor ACT-4 con funciones efectoras o que se encuentran conjugadas a toxinas, radioisótopos o fármacos, son capaces de eliminar selectivamente células T CD4⁺ activadas. De manera similar, los anticuerpos anti-ligando ACT-4-L son capaces de eliminar células B activadas bajo circunstancias análogas. La eliminación selectiva de células activadas resulta particularmente ventajosa debido a que puede reducirse o eliminarse una respuesta inmunológica no deseable, conservando simultáneamente una capacidad inmunológica residual en la forma de células B inactivadas, células CD4⁺ y células CD8⁺ para combatir microorganismos invasores contra los que pueden exponerse posteriormente un paciente. Otros agentes terapéuticos funcionan como agonistas de la interacción entre un receptor ACT-4 y ligando ACT-4-L.

1. Dosis y procedimientos de administración

En las aplicaciones terapéuticas, se administra una composición farmacéutica (por ejemplo comprendiendo un anticuerpo contra ACT-4-h-1 o ACT-4-L-h-1), *in vivo* o *ex vivo*, en un paciente que ya sufre una respuesta inmunológica no deseable (por ejemplo rechazo del trasplante) en una cantidad suficiente para curar, parcialmente detener o enlentecer detectablemente la progresión de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad suficiente para conseguir lo anterior se define como “dosis terapéuticamente eficaz” o “dosis eficaz”. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la severidad de la condición, del estado general del paciente y de la vía de administración, y la combinación con otros fármacos inmunosupresores, en caso de existir, aunque generalmente se encuentra comprendida entre aproximadamente 10 ng y aproximadamente 1 g de agente activo por dosis, utilizándose comúnmente unidades de dosis unitaria de entre 10 mg y 100 mg por paciente. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse sistémicamente mediante infusión intravenosa, o localmente mediante inyección. Esta última vía resulta particularmente útil para la respuesta inmunológica no deseada localizada, tal como el rechazo del huésped contra el injerto. Para una breve revisión de los procedimientos de administración de fármaco, ver Langer, Science 249:1527-1533, 1990) (incorporada como referencia a todos los fines).

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran en pacientes bajo riesgo, pero que todavía no sufren una reacción inmunológica no deseada (por ejemplo un paciente que inminentemente será sometido a cirugía de trasplante). La cantidad de agentes que debe administrarse es una “dosis profilácticamente eficaz”, dependiendo las cantidades exactas del estado de salud del paciente y del nivel general de inmunidad, aunque generalmente se encuentra comprendida entre 10 ng y 1 g por dosis, especialmente entre 10 mg y 100 mg por paciente.

Debido a que los agentes terapéuticos de la invención es probable que resulten más selectivos y generalmente menos tóxicos que los agentes inmunomoduladores convencionales, es menos probable que causen los efectos secundarios observados con los agentes convencionales. Además, debido a que algunos agentes terapéuticos son secuencias de proteínas humanas (por ejemplo fragmentos ligantes de un receptor ACT-4 o de ligando ACT-4-L o anticuerpos humanizados), es menos probable que causen respuestas inmunológicas tales como aquéllas observadas con los anticuerpos anti-CD3 murinos. Los agentes terapéuticos de la presente invención pueden combinarse entre sí. Por ejemplo, una combinación de anticuerpos contra un ligando ACT-4-L con anticuerpos contra un receptor ACT-4 es probable que proporcionen un bloqueo particularmente eficaz de la activación de las células T. Los agentes de la invención también pueden combinarse con terapéuticas tradicionales, y pueden utilizarse para reducir la dosis de dichos agentes hasta niveles inferiores a aquellos asociados a efectos secundarios. Por ejemplo, pueden utilizarse otros agentes inmunosupresores, tales como anticuerpos contra el dominio $\alpha 3$, antígenos de células T (por ejemplo OKT4 y OKT3, CD28) antígeno de células B (B7 o B7-2), globulina antitimocitos, así como agentes quimioterapéuticos, tales como ciclosporina, glucocorticoides, azatioprina, prednisona, conjuntamente con los agentes terapéuticos de la presente invención:

para la destrucción de una población específica de células diana, puede resultar ventajoso conjugar los agentes terapéuticos de la presente invención con otra molécula. Por ejemplo, los agentes pueden unirse a liposomas que contienen agentes inmunosupresores particulares, a un anticuerpo monoclonal específicos o a una citotoxina u otro modulador de la actividad celular, de manera que la unión del conjugado a una población celular diana resulte en la alteración de la población. Se han comentado *supra* varias proteínas toxinas. Entre los agentes quimioterapéuticos se incluyen, por ejemplo, doxorubicina, daunorubicina, metotrexato, citotoxina y ARN antisentido. También pueden utilizarse antibióticos. Además, pueden utilizarse radioisótopos, tales como itrio 90, fósforo 32, plomo 212, yodo 131 o paladio 109. La radiación emitida destruye las células diana.

2. Enfermedades y condiciones tratables

Las composiciones farmacéuticas comentadas anteriormente resultan adecuadas para tratar varias enfermedades y condiciones del sistema inmunológico.

a. Rechazo del trasplante

Durante los últimos años se ha producido una considerable mejora de la eficiencia de las técnicas quirúrgicas para el trasplante de tejidos y órganos, tales como piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea. Quizás el problema principal es la falta de agentes satisfactorios para inducir inmunotolerancia en el receptor del aloinjerto u órgano trasplantado. Al trasplantar en un huésped células u órganos alogénicos (es decir, el donante y el donado son individuos diferentes de la misma especie), el sistema inmunológico del huésped es probable que organice una respuesta inmunológica contra antígenos foráneos presentes en el trasplante (enfermedad del huésped contra el injerto), conduciendo a la destrucción del tejido trasplantado. Las células CD8⁺, CD4⁺ y los monocitos están todos implicados en el rechazo de los tejidos del trasplante. Los agentes terapéuticos de la presente invención resultan útiles para bloquear las respuestas inmunológicas inducidas por aloantígeno en el donado (por ejemplo el bloqueo o la eliminación de la activación por alógeno de células T CD4⁺ por anticuerpos contra un receptor ACT-4 o ligando ACT-4-L), evitando de esta manera que estas células participen en la destrucción del tejido u órgano trasplantado.

b. *Enfermedad del injerto contra el huésped*

Un uso relacionado de los agentes terapéuticos de la presente invención es en la modulación de la respuesta inmunológica implicada en la enfermedad “injerto contra el huésped” (GVHD). GVHD es una enfermedad potencialmente fatal que se produce al transferir células inmunológicamente competentes a un receptor alogénico. En esta situación, las células inmunocompetentes del donante podrían atacar tejidos en el receptor. Los tejidos de la piel, epitelios del tracto gastrointestinal e hígado son dianas frecuentes y pueden resultar destruidas durante el curso de la GVHD. La enfermedad presenta un problema especialmente severo al trasplantar tejido inmunológico, tal como en el trasplante de médula ósea; aunque también se ha informado de GVHD menos severa en otros casos también, incluyendo los trasplantes de corazón y de hígado. Los agentes terapéuticos de la presente invención se utilizan para bloquear la activación, o para eliminar los leucocitos del donante (particularmente las células T CD4⁺ y las células B activadas), inhibiendo de esta manera la capacidad de las mismas de lisar las células diana en el huésped.

c. *Enfermedades autoinmunitarias*

Una situación adicional en la que resulta deseable la supresión inmunológica es en el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias, tales como la diabetes mellitus insulino-dependiente, la esclerosis múltiple, el síndrome del hombre rígido, la artritis reumatoide, la miastenia gravis y el lupus eritematoso. En estas enfermedades, el cuerpo desarrolla una respuesta inmunológica celular y/o humoral contra uno de sus propios antígenos, conduciendo a la destrucción de ese antígeno, con consecuencias potencialmente incapacitantes y/o fatales. Las células T CD4⁺ activadas se cree que desempeñan un papel importante en muchas enfermedades autoinmunitarias, tales como la diabetes mellitus. Las células B activadas desempeñan un papel importante en otras enfermedades autoinmunitarias, tales como el síndrome del hombre rígido. Las enfermedades autoinmunitarias se tratan mediante la administración de uno de los agentes terapéuticos de la invención, que bloquean la activación, y/o eliminan, las células T CD4⁺ y/o las células B. Opcionalmente el autoantígeno, o un fragmento del mismo, contra el que se dirige la enfermedad autoinmunitaria, puede administrarse poco antes, o concurrentemente, o poco después, del agente inmunosupresor. De esta manera puede inducirse tolerancia frente al autoantígeno bajo la cobertura del tratamiento supresor, evitando de esta manera la necesidad de la inmunosupresión continua (ver, por ejemplo, Cobbold *et al.*, patente WO n° 90/15152, 1990).

d. *Inflamación*

La inflamación representa la consecuencia de la dilatación capilar con acumulación de líquido y migración de leucocitos fagocíticos, tales como granulocitos y monocitos. La inflamación resulta importante en la defensa de un huésped frente a una diversidad de infecciones, aunque también puede presentar consecuencias no deseables en los trastornos inflamatorios, tales como el choque anafiláctico, la artritis, la gota y la isquemia por reperusión. Las células T activadas presentan un papel modulador importante en la inflamación, liberando interferón γ y factores estimuladores de colonias que, a su vez, activan los leucocitos fagocíticos. Los leucocitos fagocíticos activados se inducen para expresar varias moléculas de superficie celular específicas denominadas receptores de localización (“homing receptors”), que sirven para unir los fagocitos a células endoteliales diana. Las respuestas inflamatorias pueden reducirse o eliminarse mediante tratamiento con los agentes terapéuticos de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos contra ACT-4 o ACT-4-L bloquean la activación de las células CD4⁺ o eliminan las células CD4⁺ activadas, evitando de esta manera que estas células liberen moléculas necesarias para la activación de los tipos celulares fagocíticos.

e. *Agentes infecciosos*

La invención también proporciona procedimientos para incrementar la eficacia de vacunas en la prevención o el tratamiento de enfermedades y condiciones resultantes de agentes infecciosos. Los agentes terapéuticos que presentan la capacidad de activar las células T CD4⁺ y/o las células B (por ejemplo determinados anticuerpos monoclonales contra un ligando ACT-4 o ACT-4-L) se administran poco antes, concurrentemente, o poco después de la vacuna que contiene un antígeno seleccionado. El agente terapéutico sirve para potenciar la respuesta inmunológica contra el antígeno seleccionado. Estos procedimientos pueden resultar particularmente ventajosos en pacientes que sufren enfermedades de inmunodeficiencia.

f. *Infecciones por HTLV-I*

Los anticuerpos contra ACT-4-h-L-1 también resultan útiles para eliminar las células infectadas por HTLV-I. Tal como se ha indicado anteriormente, dichas células expresan un antígeno gp34 que es idéntico o prácticamente idéntico a ACT-4-h-1. Estos procedimientos habitualmente se llevan a cabo *in vivo* o *ex vivo* en individuos infectados por HTLV-I. Sin embargo, los procedimientos también resultan eficaces para eliminar las células VIH infectadas por HTLV-I *in vitro*. Por ejemplo, los procedimientos resultan particularmente útiles para proteger a los trabajadores hospitalarios de la infección por el contacto con muestras de tejido sometidos a análisis. El riesgo de infección por HTLV-I puede reducirse mediante tratamiento de las muestras según los presentes procedimientos (con la condición, eviden-

temente, de que las muestras se analicen para algo que no sea la presencia de HTLV-I). Los anticuerpos contra ACT-4-h-L-1 y también los anticuerpos contra ACT-4-h-1 pueden resultar eficaces para reducir o eliminar las perturbaciones del sistema inmunológico que se han observado en individuos que sufren de infección por HTLV-I. Estas perturbaciones pueden resultar de la presencia de ACXT-4-h-L-1 como antígeno de superficie sobre células T infectadas por HTLV-I, que permitiría que las células T infectadas interaccionasen con las células T CD4⁺ mediante un receptor ACT-4.

g. Tratamiento del SIDA

El virus VIH es conocido que infecta células T CD4⁺ humanas mediante la unión al receptor CD4. Sin embargo, es probable que, para que se produzca la infección productiva, el receptor CD4 deba interaccionar con otro receptor presente sobre el receptor de las células T CD4⁺. La identificación de ACT-4 como un receptor sobre la superficie de las células T activadas sugiere que ACT-4 y/o su ligando ACT-4-L podrían interaccionar con CD4 y contribuir a la infección por VIH de las células T. En este caso, las cantidades terapéuticamente eficaces de los agentes terapéuticos dirigidos contra ACT-4 o ACT-4-L podrían resultar eficaces para abortar la infección por VIH y, de esta manera, en el tratamiento del SIDA. Estos agentes terapéuticos también podrían resultar eficaces para eliminar las células T CD4⁺ infectadas por VIH *in vivo* o *in vitro*. Los procedimientos *in vitro* presentan utilidad en, por ejemplo, la protección de los trabajadores hospitalarios frente a la infección accidental, tal como se ha comentado anteriormente.

h. Tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria

Se ha encontrado que ACT-4-L-L-I y sus análogos y parejas ligantes específicos, incluyendo ACT-4, pueden utilizarse en la enfermedad intestinal inflamatoria.

La expresión en tejidos de ACT-4 se ha investigado utilizando la técnica estándar indirecta de tinción inmunohistoquímica con fosfatasa alcalina (ver, por ejemplo, Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology, J. Polak y S. van Noorden, editores John Wright y Sons, Bristol). Las muestras de tejido de biopsia de intestino procedentes de pacientes tanto de colitis ulcerosa como de la enfermedad de Crohn se tiñeron positivamente con el anticuerpo anti-ACT-4 llamado L106. Se observaron agrupaciones de células L106+ entre las células linfoides infiltrantes en la lámina propia en los sitios de inflamación. En las muestras de tejido intestinal procedentes de pacientes normales o en muestras de tejido intestinal no implicado procedente de pacientes, únicamente se observaron células L106+ dispersas aisladas.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo, aunque no limitativo, de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Un anticuerpo monoclonal contra ACT-4-h-1

Se inmunizaron ratones con linfoblastos T transformados por PHA. Se fusionaron esplenocitos procedentes de ratones inmunizados, con células de mieloma SP2/O y se seleccionaron los hibridomas que secretaban anticuerpos específicos para el clon de células T. Los hibridomas se clonaron mediante dilución limitante. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal, denominado L106, producido por uno de los hibridomas resultantes, para la caracterización adicional. Se encontró que el anticuerpo L106 presentaba un isotipo IgG1. Un hibridoma productor del anticuerpo, denominado HBL106, ha sido depositado con el número ATCC HB11483.

Ejemplo 2

Distribución celular de polipéptido reconocido por el anticuerpo L106

Se pusieron a disposición de determinados participantes en el Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Viena, 1989) muestras que contenían el anticuerpo L106 con el fin de identificar los tipos de tejido y celulares que se unen al anticuerpo L106. Los datos del taller se presentan en Leukocyte Typing IV (editor W. Knapp, Oxford U. Press, 1989) (incorporada como referencia a todos los fines) y en una base de datos computerizada adjunta disponible de Walter R. Gilks, MRC Biostatistics Unit, Cambridge University, Inglaterra. Esta referencia informa que el anticuerpo L106 se une a un polipéptido de aproximadamente 50 kDa. Este polipéptido se ha informado que se encuentra presente sobre células HUT-102 (una línea de células T transformadas), linfocitos sanguíneos periféricos activados por PHA, una línea celular B-linfoide transformada por EBV, una línea de células T transformada por HTLV-II, células de amígdala activadas por PMA, PBLs activadas por ConA o PHA y monocitos activados por PMA. Se ha informado de que el polipéptido se encuentra sustancialmente ausente en, *inter alia*, basófilos en reposo, células endoteliales, fibroblastos, monocitos activados por interferón γ ,

células no T periféricas, granulocitos periféricos, monocitos periféricos, células mononucleares periféricas, células T periféricas y glóbulos rojos periféricos.

Los presentes inventores han encontrado datos que indican que el polipéptido de 50 kDa (en lo sucesivo denominado “receptor ACT-4-h-1”) se expresa preferentemente en la subespecie CD4⁺ de las células T activadas. En una serie de experimentos, se analizó la expresión de ACT-4-h-1 específica de células en PBLs no fraccionadas mediante un procedimiento de tinción de dos colores. Se activaron las PBL con PHA durante aproximadamente dos días (utilizando las condiciones de cultivo indicadas en el Ejemplo 3) y se analizaron para la expresión en la superficie celular de ACT-4-h-1 en diferentes subtipos celulares mediante tinción con dos anticuerpos marcados diferentemente (marcajes FITC y PE). Los marcajes se detectaron mediante análisis FACSTM, esencialmente tal como se describe en Picker *et al.*, J. Immunol. 150:1105-1121, 1993 (incorporada como referencia a todos los fines). Un anticuerpo, L106, era específico para ACT-4-h-1, el otro anticuerpo era específico para un subtipo particular de leucocito. La fig. 1 muestra tres gráficos en los que se muestra la tinción de L106 en el eje Y de cada gráfico, y la tinción anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD19 en los ejes x de los gráficos respectivos. En el gráfico de tinción con anti-CD4, muchas células aparecen como dobles positivos (es decir, expresan tanto CD4 como ACT-4-h-1). En el gráfico de tinción con anti-CD8, muchas menos células aparecen como dobles positivos. En el gráfico de tinción con anti-CD19 (un marcador de células B) las células doble positivas se encontraban sustancialmente ausentes.

En otra serie de experimentos, se analizó la expresión de ACT-4-h-1 mediante la tinción monocolor de tipos celulares aislados. Las células se tiñeron con anticuerpo L106 marcado fluorescentemente y el marcaje se detectó mediante análisis FACSTM (ver Engleman *et al.*, J. Immunol. 127:2124-2129, 1981) (incorporada como referencia a todos los fines). En algunos experimentos, las células se activaron mediante estimulación con PHA durante aproximadamente dos días (nuevamente utilizando las condiciones de cultivo indicadas en el Ejemplo 3). Los resultados de este experimento, conjuntamente con aquellos procedentes del experimento de tinción de dos colores descrito *supra*, se resumen en la Tabla 1. La Tabla 1 muestra que aproximadamente 80% de las células CD4⁺ expresaron ACT-4-h-1 con una fluorescencia media por canal de >20, con independencia de si las células CD4⁺ se encontraban aisladas (tinción monocolor) o en PBLs no fraccionadas (tinción de dos colores). El nivel de expresión de ACT-4-h-1 en células CD8⁺ activadas era mucho menor que en las células T CD4⁺ activadas en el experimento de tinción de dos colores, y mucho menor en la tinción monocolor. De esta manera, el grado de expresión en células CD8⁺ activadas aparentemente depende de si las células CD8⁺ se fraccionan de otras PBLs antes de la activación. En células CD8⁺ no fraccionadas (tinción de dos colores), aproximadamente 10% de las células expresaban ACT-4-h-1, con una fluorescencia media por canal de aproximadamente 4. En las células fraccionadas, sólo aproximadamente 4% de las células expresaban ACT-4-h-1, con una fluorescencia media por canal de aproximadamente 2. Estos datos sugieren que ACT-4-h-1 se expresa únicamente en un subtipo reducido de células CD8⁺ activadas y que este subtipo es algo más prevalente en el caso de que las células CD8⁺ se activen en presencia de otras PBLs. La Tabla 1 también indica que ACT-4-h-1 se encontraba sustancialmente ausente en todos los subtipos de leucocito en reposo sometidos a ensayo (es decir, células T CD4⁺, células T CD8⁺, células B CD19⁺, monocitos CD14⁺, granulocitos y plaquetas) y también se encontraba sustancialmente ausente en células B activadas y monocitos. También se observó que ACT-4-h-1 se encontraba sustancialmente ausente en la mayoría de líneas celulares tumorales sometidas a ensayo. Sin embargo, las líneas celulares Molt3, Raji y NC37 sí mostraron un nivel de expresión reducido.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 323 392 T3

TABLA 1

Especificidad celular de la expresión de ACT-4-h-1

		Expresión de ACT-4-h-1	
		% de células	MCF ¹
5			
10	Tinción de dos colores		
	Células T CD4 ⁺ (en reposo)	<2	<2
	Células T CD4 ⁺ (activadas)	80	25
15	Células T CD8 ⁺ (en reposo)	<2	<2
	Células T CD8 ⁺ (activadas)	10	4
	Células B CD19 ⁺ (en reposo)	<2	<2
	Células B CD19 ⁺ (activadas)	<2	<2
20	Monocitos CD14 ⁺ (en reposo)	<2	<2
	Monocitos CD14 ⁺ (activados)	<2	<2
	Tinción monocolor		
25	PBLs (en reposo)	<2	3
	PBLs (activadas)	50	27
	CD4 ⁺ (en reposo)	<2	<2
	CD4 ⁺ (activadas)	80	22
30	CD8 ⁺ (en reposo)	<2	<2
	CD8 ⁺ (activadas)	4	2
	Granulocitos	<2	<2
	Plaquetas	<2	<2
35			
	Líneas tumorales		
	Molt-4, CEM, Hut 78, H9, Jurkat	<2	<2
40	HPB-ALL, Sezary, T-AU Molt-3	<2 20	<2 3
45	B-LCL, Arent, RML, JY, KHY, PGf	<2	<2
	MSAB, CESS, 9037, 9062	<2	<2
50	Dandi, Ramos, Namalwa	<2	<2
	Raji, NC37	30	4
55	U937, THP-1, HL-60	<2	<2
60	Kgla, K562, HEL	<2	<2
¹ MCF=Fluorescencia media por canal			
² Células señaladas como "activadas" han sido estimuladas con PHA durante aproximadamente tres días			

Ejemplo 3

Curso temporal de la expresión de ACT-4-h-1 sensible a la activación de las células T CD4⁺

5 Se sometieron a ensayo células T CD4⁺ para la expresión de receptores ACT-4-h-1 en respuesta a diversos estímulos de activación. Se purificaron células T CD4⁺ a partir de células mononucleares sanguíneas periféricas mediante inmunoadsorción en fase sólida ("panning"). Se cultivaron 5 x 10⁴ células T CD4⁺ con un agente activador en pocillos de microtitulación que contenían medio RPMI suplementado con suero humano al 10%. Se utilizaron tres agentes de activación diferentes: (1) 5 x 10⁴ monocitos irradiados (3.000 rads), (2) PHA (1 µg/ml) y (3) toxoide tetánico (5
10 µg/ml). Se añadió ³H-timidina a los cultivos 12 a 16 horas antes de la recolección. Tras la recolección, las células se sometieron a ensayo para la expresión de antígenos de superficie celular mediante incubación con diversos anticuerpos marcados (L106, anti-CD4 y anti-CD8), tal como describen Engleman *et al.*, J. Immunol. 127:2124-2129, 1981).

15 La figura 2 muestra la aparición de ACT-4-h-1 en respuesta a la activación con aloantígeno. Antes de la activación no se observó expresión. El porcentaje de células que expresaban el receptor ACT-4-h-1 se incrementaba en el tiempo, alcanzando un máximo en aproximadamente 30% tras aproximadamente siete días de activación con aloantígeno. Los resultados también muestran que esencialmente todas las células que expresan ACT-4-h-1 también expresaban el receptor CD4 y que esencialmente ninguna de ellas expresaba el receptor CD8. La figura 3 presenta datos similares
20 para la aparición de ACT-4-h-1 en respuesta a la activación del toxoide tetánico. Nuevamente, el porcentaje de células que expresaban ACT-4-h-1 alcanzó un máximo aproximadamente a los siete días. Sin embargo, en este momento un porcentaje más alto de células (aproximadamente 60%) expresaba el receptor. La figura 4 presenta datos similares para la aparición de ACT-4-h-1 en células T CD4⁺ en respuesta a la activación con PH4. En esta situación, el porcentaje de células T CD4⁺ que expresaban el receptor alcanzaba un máximo de aproximadamente 65% tras tres días de
25 activación.

Se concluye que ACT-4-h-1 es un antígeno activador de las células T CD4⁺, que se expresa en respuesta a diversos estímulos activadores.

30
Ejemplo 4

Clonación de ADNc de ACT-4-h-1

35 El clon de ADNc para el receptor ACT-4-h-1 se aisló utilizando un sistema de expresión de células COS ligeramente modificado, desarrollado por primera vez por Aruffo y Seed, *supra*. Se aisló ARN a partir de linfocitos sanguíneos periféricos humanos activados por PHA de 72 horas. Se extrajo el ARN total con reactivo TRI (Molecular Research Center) y se aisló ARN poli(A)+ mediante purificación con oligo-dT-perlas magnéticas (Promega). Se sintetizó ADNc mediante el procedimiento de Gubler y Hoffman, Gene 25:263-369, 1982, utilizando transcriptasa inversa de
40 Superscript (Gibco/BRL) y un cebador oligo-dT. El ADNc de extremo romo se ligó a adaptadores BstXI no auto-complementarios y se pasó por una columna spin de Sephacryl S-400 para eliminar los adaptadores no ligados y los fragmentos pequeños (<300 pares de bases). El ADNc ligado seguidamente se ligó en un vector de expresión eucariótico cortado con BstXI, pcDNA-IRL, una versión resistente a la ampicilina de pcDNA-I (Invitrogen). Los productos precipitados y lavados de la reacción de ligación se electroporaron en *E. coli* cepa WM1100 (BioRad). La siembra en
45 placa y recuento de una alícuota de las bacterias transformadas reveló un recuento total de 2 millones de clones independientes en la biblioteca no amplificada. Se determinó que el tamaño medio de inserción era 1,2 kb. Se amplificó la mayor parte de la biblioteca en cultivo líquido, 250 ml de medio LB estándar. Se recuperó plásmido mediante lisis alcalina y se purificó en una columna de intercambio iónico (Qiagen).

50 Se transfectaron células COS-7 subconfluentes mediante electroporación con el ADN de plásmido purificado. Las células se sembraron en placas de 100 mm y se dejaron crecer durante 48 horas. Las células se recuperaron de las placas con solución de PBS-EDTA, se incubaron con anticuerpo monoclonal L106 y se realizó panning según procedimientos estándares. Una segunda ronda de panning reveló enriquecimiento, debido a que se adsorbieron a las placas numerosas células COS. Se recuperó ADN episómico de las células inmunoseleccionadas mediante el procedimiento Hirt, y se
55 electroporaron en bacterias para la amplificación.

Se diluyeron bacterias transformadas con plásmido de la segunda ronda de preparación Hirt formando grupos pequeños de aproximadamente 100 colonias. Los grupos se amplificaron y el ADN de los mismos se purificó y se sometió a ensayo para la capacidad de proporcionar expresión del antígeno de L106 en células COS-7 mediante
60 inmunofluorescencia. Se utilizó anticuerpo L106 conjugado con ficoeritrina para teñir monocapas de células COS-7 y las células seguidamente se examinaron mediante microscopía de inmunofluorescencia manual. El ADN miniprep de cuatro de entre 8 grupos era positivo al someterlo a ensayo para la expresión. Tres de entre ocho subgrupos eran positivos y el subgrupo E1 se sembró en placa para permitir el análisis de colonias individuales. Se encontró que el clon E1-27 proporcionaba un nivel elevado de expresión de receptor ACT-4-h-1 sobre la superficie de las células COS
65 transfectadas.

Ejemplo 5

Análisis de secuencias de ADNc

5 La inserción procedente del clon denominado E1-27 se subclonó en pBluescript y se secuenció mediante el procedimiento de terminación de cadena dideoxi, utilizando el kit de secuenciación de autolectura de la polimerasa de T7 (Pharmacia) en un secuenciador ALE (Pharmacia). El mapado de restricción reveló varios sitios convenientes para la subclonación. Se generaron cinco subclones en pBluescript y se secuenciaron en ambas cadenas con cebadores directores y universales de M13.

10 Las secuencias de ADNc y las secuencias deducidas de aminoácidos de ACT-4-h-1 se muestran en la fig. 5. La secuencia de ADNc de ACT-4-h-1 de 1.137 pares de bases contiene una región 5' no traducida de 14 pb y una región 3' no traducida de 209 pb. Se encuentra presente una señal de poliadenilación AATAAA en la posición 1.041, seguida de una cola poliA de 80 pb a partir de la posición 1.057. El marco de lectura abierta más largo se inicia con el primer ATG en la posición 15 y finaliza con un TGA en la posición 845. La secuencia predicha de aminoácidos es la de una proteína membranal integral de tipo 1 típica. El análisis de hidrofobicidad reveló una putativa secuencia de señal tras el ATG de inicio, con un tramo corto de residuos básicos seguido de un tramo más largo de residuos hidrofóbicos. Un sitio de corte predicho de péptido de señal se encuentra presente en el residuo 22 ó 24 (siendo el último el más probable según los criterios de von Heijne, Nucleic Acids Res. 14:4683-4690, 1986) (incorporada como referencia a todos los fines), dejando una proteína madura de 253 residuos aminoácidos (o de 255 aminoácidos si se produce el corte en el sitio menos probable). El análisis de hidrofobicidad también reveló un único tramo largo de 27 residuos hidrofóbicos que se predice que es el dominio transmembranal, prediciendo un dominio extracelular de 189 (o de 191) aminoácidos y un dominio intracelular de 37 aminoácidos. El dominio extracelular es rico en cisteínas, en el que se encuentran 18 cisteínas dentro de un tramo de 135 aminoácidos. La masa molecular predicha (Mr) para la proteína madura es 27.400, y existen dos potenciales sitios de N-glucosilación en los residuos aminoácidos 146 y 160.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de ACT-4-h-1 con secuencias conocidas en la base de datos swiss-prot utilizando el programa BLAZE reveló similitud de secuencia con miembros de la superfamilia del receptor del factor de crecimiento nervioso. Las secuencias de aminoácidos eran idénticas por lo menos al 20% para NGF-R, TNF-R, CD40, 41-BB y *fas/APO-1*, y al 62% para OX-40, incluyendo huecos y deleciones. Las alineaciones de las diversas proteínas revelaron la conservación de múltiples motivos ricos en cisteínas. Tres de estos motivos se encontraban presentes en ACT-4-h-1 y OX-40, en comparación con cuatro de estos motivos en NGF-R y CD0.

35 La comparación de la secuencia de nucleótidos de ACT-4-h-1 con secuencias conocidas en las bases de datos Genbank y EMBL utilizando los programas BLAST y FASTDB reveló un grado elevado de similitud de secuencias con únicamente un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento nervioso, OX-40. Incluyendo los huecos e inserciones, la identidad de secuencia era de 66%. La comparación de las secuencias de nucleótidos de ACT-4-h-1 y OX-40 reveló que ambas contenían una región 5' no traducida de 14 pb y ambas contienen colas poli-A de aproximadamente 80 pb. Sin embargo, en ACT-4-h-1 existe un ligero alargamiento de la región 3' no traducida entre 187 pb y 209 pb, y existe un alargamiento de la región codificante entre 816 pb y 834 pb, una diferencia de 18 pb, o 6 inserciones de aminoácidos. La alineación de dos secuencias de aminoácidos reveló que cuatro de las inserciones de aminoácidos se produjo antes de la señal de corte de la secuencia de señal. De esta manera, la proteína receptora ACT-4-h-1 madura contiene uno o más residuos aminoácidos que OX-40 (es decir, 253 frente a 252 aminoácidos).
45 Notablemente, la secuencia de nucleótidos de ACT-4-h-1 era mucho más rica en GC que la secuencia de OX-40 (70% frente a 55%), indicando que las dos secuencias no se hibridarán bajo condiciones restrictivas.

Ejemplo 6

50 *Producción de transfectantes estables de ACT-4-h-1*

Se extrajo un fragmento XbaI-HindIII del constructo descrito en el Ejemplo 4 y se insertó en pcDNA-I-neo digerido con XbaI/HindIII (Invitrogen) para generar un vector de expresión denominado ACT-4-h-1-neo (fig. 6). Este vector se linearizó con SfiI y se electroporó en tres líneas celulares eucarióticas. Estas líneas celulares eran SP2/O (un mieloma de ratón derivado de la cepa Balb/c), Jurkat (una línea de células T humanas transformadas) y COS-7 (una línea celular adherente de mono). Tras un periodo de recuperación de 48 horas, se seleccionaron las células transformadas en 1 mg/ml de G418 (Gibco). Tras tres semanas de selección, se incubaron las líneas celulares resistentes a neo con una concentración saturante de anticuerpo L106, se lavaron y se utilizaron para recubrir placas de Petri de 100 mm recubiertas con IgG de cabra antiratón para seleccionar las células que expresaban ACT-4-h-1. Tras eliminar por lavado las células no unidas, se recuperaron las células adherentes y se expandieron en cultivo de tejidos. Las líneas celulares se sometieron a dos rondas adicionales de panning y expresión. Se demostró mediante tinción de inmunofluorescencia directa que las líneas celulares resultantes expresaban abundante ACT-4-h-1 (fig. 7).

65 Se utilizó la misma estrategia y principios para obtener una línea celular estable que expresase ACT-4-L-h-1 (ver el Ejemplo 10).

Ejemplo 7

Producción de una proteína de fusión ACT-4-h-1-Inmunoglobulina

Se ha construido una proteína de fusión soluble en la que el dominio extracelular de ACT-4-h-1 se une mediante el extremo C-terminal al extremo N-terminal del dominio constante de una inmunoglobulina humana. El vector codificante de ACT-4-h-1 descrito en el Ejemplo 4 se cortó con SmaI y NotI para extraer todas las secuencias de ACT-4-h-1 cadena abajo del sitio SmaI, incluyendo las regiones transmembranales, citoplasmáticas y 3' no traducidas. La región restante codifica la parte extracelular soluble de ACT-4-h-1 (fig. 8). La fuente de la región constante de inmunoglobulina que debía unirse al dominio extracelular de ACT-4-h-1 era un plásmido denominado 5K-41BB-Eg1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10360-10364) (incorporada como referencia a todos los fines). Este plásmido contenía un fragmento genómico BamHI/EagI de 1,3 kb codificante de los dominios CH2 y CH3 terminal de bisagra de Ig humana, isotipo gamma 1. El fragmento requería la modificación por inserción en los extremos SmaI/NotI del vector ACT-4-h-1, conservando simultáneamente el marco de lectura del péptido a través de la unión SmaI que debía formarse mediante ligación de extremo romo. Se cortó el vector 5k-41BB-Eg1 con BamHI, y las extensiones 5' resultantes se rellenaron con fragmento Klenow. A continuación, el vector se cortó con EagI, liberando el fragmento de 1,3 kb con extremo romo y extremo compatible con NotI. Este fragmento se ligó con vector ACT-4-h-1 digerido con SmaI/NotI. La mezcla de ligación se electroporó en *E. coli* y se cribaron múltiples clones transformantes con PCR utilizando como cebadores fragmentos nucleótidos de ACT-4-h-1 y de IgG1.

Los plásmidos que contenían la región codificante de ACT-4-h-1-IgG1 se electroporaron en células COS. Las células se dejaron crecer durante cinco días, después de lo cual se recolectaron los sobrenadantes y se filtraron a esterilidad a través de una membrana de 0,2 micrómetros. Los sobrenadantes se sometieron a ensayo para la expresión de ACT-4-h-1-IgG1 mediante transferencia por puntos. Los sobrenadantes se transfirieron a nitrocelulosa y se bloquearon con leche seca no grasa al 5%. Se sondearon réplicas de membranas con anticuerpo L106 o inmunoglobulina IgG antihumana de cabra marcada con fosfatasa alcalina (American Qualex). Se detectó el anticuerpo L106 con IgG antiratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina. Se utilizó NBT/BCIP (Pierce) como sustrato colorimétrico. Se secuenciaron en el sitio de unión los clones positivos de producción elevada para confirmar la construcción correcta del vector. El gen de la fusión resultante se ilustra en la fig. 9.

Ejemplo 8

Identificación de tipos celulares que expresan un ligando para ACT-4-h-1

Los tipos celulares que expresaban un ligando para ACT-4h-1 se identificaron mediante tinción indirecta combinada con citometría de flujo utilizando la proteína de fusión ACT-4-h-1-inmunoglobulina recombinante descrita en el Ejemplo 7 (en lo sucesivo "ACT-4-h-1-Rg") como sonda. La proteína de fusión unida se detectó utilizando Ig antihumana conjugada con ficoeritrina. Estos experimentos revelaron que se expresaba un ligando para ACT-4-h-1 a niveles reducidos en unas cuantas líneas de células B, incluyendo una línea celular de linfoma de Burkitt (Jiyoye) y las LCLs transformadas por EBV, 9037, 9059 y MSAB. Estas líneas celulares obtuvieron una puntuación de 5% positivas con una MCF de 3 (ver la Tabla 2). En la línea celular Jiyoye, resultó posible enriquecer las células con tinción positiva mediante el procedimiento de panning, rindiendo una línea celular Jo-P5, que tiñó positiva en 90% de los casos con una MCF de 10. Otras líneas celulares sometidas a ensayo, incluyendo PBMCs y subpoblaciones purificadas de células T, células B, monocitos, células dendríticas, la mayor parte de las líneas tumorales de células T y las líneas celulares de tumor mielomonocítico recién aisladas, carecían sustancialmente de un ligando para ACT-4-h-1. Sin embargo, dos líneas de células T infectadas por HTLV-1, HUT-102 y MT-2, expresaron ACT-4-L-h-1, la última a niveles extremadamente elevados.

Se repitió el experimento tras la activación de las células utilizando PHA o una combinación de PMA/yonomicina. Las PBMCs activadas con 2 µg/ml de PHA durante tres días tiñeron positivas en 2% a 10% de los casos para un ligando para ACT-4-h-1, dependiendo del donante. La activación de las células B-LCL y líneas de linfoma de Burkitt utilizando una combinación de PMA (10 ng/ml) y yonomicina (500 ng/ml) indujo una expresión sustancial de ligando en algunas líneas celulares, particularmente aquéllas, tal como MSAB, que mostraron niveles reducidos de expresión en el estado de reposo (ver la Tabla 2). Las células B no fraccionadas también mostraron la expresión preferente de ligando (15% de células positivas, MHC-5). Los estudios de curso temporal en células MSAB indicaron que la expresión de ligando se inició el día 2 tras la activación, y alcanzó un máximo el día 3 ó 5. La activación con PMA/yonomicina también indujo la expresión preferente de ligando en líneas celulares de eritroleucemia y en una de las tres líneas celulares mielomonocíticas sometidas a ensayo, THP-1. La activación con PMA/yonomicina también indujo un nivel reducido de expresión de ligando en las líneas de células T pero no en las demás líneas de células T sometidas a ensayo.

TABLA 2

Expresión de ligando para ACT-4-h-I en diferentes tipos celulares

5

CRIBADO DE LÍNEAS DE CÉLULAS TUMORALES

B-LCL		En reposo	Activadas¹	
10	MSAB	2% a 5% ² mcf ³ 4	80%	mcf 21
	CESS	<2	70%	mcf 25
	JY	<2	40%	9
15	REM	<2	40%	11
	9059	2% a 5% mcf 4	40%	6
20	SKF	<2	30%	3
	9037	2% a 5% mcf 4	25%	5
	9062	<2	10%	5
25	PGF	<2	6%	10
	ARENT	<2	4%	5
	KHY	<2	3%	5
LINFOMA DE BURKIT				
30	Jiyoye	20% mcf 4	7%	5
	Daudi	<2	10%	5
	Naralwa	<2	5%	5
35	Raji	<2	<2	
OTRAS CÉLULAS B				
	(Pre B)			
	NC-37	<2	<2	
40	SB	<2	15%	5
CÉLULAS T				
	(continuación)			
		En reposo		Activadas
45	HPB-ALL	<2	<2	
	HU+78	<2	<2	
	H9	<2	<2	
	VB	<2	<2	
50	MIELOMONOCÍTICAS			
	THP-1	<2	25%	mcf 5
	V937	<2	<2	
	HL60	<2	<2	
55	ERITROLEUCEMIA			
	HEL	<2	25%	5
	K562	2%	25%	5
60	CÉLULAS T			
	INFECTADAS POR			
	HTLV-I			
	HUT-102	30% mcf 4		
	MT-2	100% 100		

65

¹PMA/yonomicina²% de células positivas³Fluorescencia media por canal

Ejemplo 9

Clonación de ADNc codificante de un ligando ACT-4-h-1

5 El clon de ADNc para el ligando se aisló utilizando un sistema de expresión de células COS ligeramente modificado, desarrollado por primera vez por Aruffo y Seed, *supra*. Se aisló ARN a partir de células B transformadas por EBY humanas activadas por PMA/yonomicina de 72 horas (línea celular MSAB). Se extrajo el ARN total con reactivo TRI (Molecular Research Center) y se aisló ARN poli(A)+ mediante purificación con oligo-dT-perlas magnéticas (Promega), se sintetizó ADNc mediante el procedimiento de Gubler y Hoffman, Gene 25:263-369, 1982, utilizando transcriptasa inversa superscript (Gibco/BRL) y un cebador oligo-dT. El ADNc con extremo romos se ligó a adaptadores BstXI no autocomplementarios y se pasó por una columna Sephacryl S-500 para eliminar los adaptadores no unidos y los fragmentos pequeños (<300 pares de bases). A continuación, el ADN unido se ligó en un vector de expresión eucariótico cortado con BstXI, pcDNA (Invitrogen). Los productos de ligación se precipitaron, se lavaron y se electroporaron en *E. coli* cepa MC1061/P3, generando una biblioteca no amplificada de 100 millones de clones independientes. El tamaño medio de inserción en la biblioteca era de 1 kb. La mayor parte de la biblioteca se amplificó en 250 ml de medio LB estándar. Se recuperó ADN de plásmido mediante lisis alcalina y se purificó en una columna de intercambio iónico (Qiagen).

20 Se transfectaron células COS-7 subconfluentes con el ADN de plásmido purificado mediante electroporación. Las células se sembraron en placas de 100 mm y se dejaron crecer durante 48 horas. Las células se recuperaron de las placas con solución PBS-EDTA, se incubaron con anticuerpo monoclonal ACT-4-h-1-Rg y se sometieron a panning siguiendo procedimientos estándares. Una segunda ronda de panning adsorbió numerosas células COS a las placas, mostrando enriquecimiento en células que expresaban ligando. Se recuperó ADN episómico de las células inmunoseleccionadas mediante el procedimiento Hirt, y se electroporaron en bacterias para la amplificación.

25 Las bacterias transformadas con plásmido de la segunda ronda de selección se clonaron y se amplificaron. El ADN de los clones individuales se purificó y se sometió a ensayo para la capacidad de expresar un ligando para ACT-4-h-1 en las células COS-7. Se utilizó ACT-4-h-1-Rg conjugado con ficoeritrina para teñir monocapas de células COS-7 y las células seguidamente se examinaron mediante microscopía manual de inmunofluorescencia. Los clones nº 2, nº 26 y nº 30 proporcionaron un nivel elevado de expresión de actividad ligante de ACT-4-h-1-Rg.

Ejemplo 10

Análisis de secuencias de un ligando para ACT-4-h-1

La inserción procedente del clon nº 26 en el Ejemplo 9 se subclonó en pBluescript en los sitios de clonación HindIII y XbaI. El clon se secuenció mediante el procedimiento de terminación de cadena dideoxi utilizando un kit de secuenciación de autolectura basado en la polimerasa de T7 (Pharmacia) en un secuenciador ALF (Pharmacia). Se generaron tres subclones en pBluescript y se secuenciaron en ambas cadenas con cebadores directos y universales de M13. El ADNc y secuencias de aminoácidos predichas del clon nº 26 se muestran en la fig. 10. El polipéptido formado con la secuencia de aminoácidos predicha se denomina ACT-4-L-1-h-1.

45 La secuencia de ADNc de ACT-4-L-h-1 contiene 1.079 pares de bases, con una UTR 5' de 137 pb y una UTR 3' de 379 pb. Se encontraba presenta una señal de poliadenilación AATAAA en la posición 1.024, seguida de una cola poli-A de 20 bases en la posición 1.049. El análisis de la secuencia reveló un único marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de 183 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 21.000. El marco de lectura abierto se inicia con el primer ATG en la posición 149 y finaliza con un TGA en la posición 698. El ATG se encuentra flanqueado por una secuencia inicio de consenso de Kozak con una posición A en -3 y una G en +4. El análisis de hidrofobicidad reveló que la secuencia de aminoácidos predicha es la de una proteína membranal de tipo II con un único dominio transmembranal de aproximadamente 27 aminoácidos en la parte amino-terminal de la proteína. Además, existen cuatro sitios de glucosilación N-ligados en la parte C-terminal de la molécula.

55 La comparación de la secuencia de nucleótidos de ACT-4-L-h-1 con secuencias conocidas en las bases de datos Genbank y EMBL no reveló homología significativa respecto a los genes conocidos para un gen codificante de una proteína denominada gp34 por Miura *et al.*, Mol. Cell Biol. 11:1313-1325, 1991. La secuencia de ADNc de la región codificante del ligando ACT-4-L-h-1 era idéntica a la de gp34. Sin embargo, el ADNc de ACT-4-L-h-1 contenía 112 nucleótidos adicionales en el extremo 5' en comparación con la secuencia de gp34. Debido a que los nucleótidos adicionales se encuentran dentro de la región 5' no traducida, la presencia de los mismos es improbable que altere el producto de expresión. Más probablemente el clon ACT-4-L-h-1 se derivaba de un transcrito inverso más completo y es más representativo del extremo 5' *in vivo*. Posiblemente la secuencia adicional podría encontrarse implicada en la regulación de la traducción de la proteína.

65 La comparación de la secuencia de aminoácidos predicha del ligando ACT-4-L-h-1 con secuencias conocidas en la base de datos Protein Information Resource (PIR) utilizando el programa FastDB reveló una identidad con gp34, y una homología muy débil con TNF alfa. Un algoritmo predictivo de la estructura secundaria desarrollado por Chou y Fasman predice que el ligando ACT-4-L-h-1 y TNF-alfa es probable que formen cantidades significativas de estructuras beta. Esta predicción es consistente con la observación de que todos los demás miembros de la familia

TNF de proteínas se encuentran conformados o se predice que forman configuraciones beta de rollo de gelatina ricas en estructuras beta.

Para los fines de claridad y comprensión, la invención se ha descrito en los presentes ejemplos y en la exposición anterior en cierto detalle. Sin embargo, resultará evidente que pueden ponerse en práctica determinados cambios y modificaciones comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4704362 A [0065]
- US 4683202 A [0072]
- US 5001065 A [0083]
- US 4634664 A, Ostberg [0083]
- US 4634666 A, Engleman [0083]
- WO 9007861 A [0084]
- WO 9222653 A, Carter [0084]
- WO 9117271 A, Dower [0087]
- WO 9201047 A, McCafferty [0087]
- WO 9015152 A, Cobbold [0118]
- WO 1990 A [0118]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- MALLETT *et al.* *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1063-1068 [0004]
- MALLETT; BARCLAY. *Immunology Today*, 1990, vol. 12, 220-222 [0004]
- GODFREY *et al.* *Tissue Antigens*, 1993, vol. 42 (4), 253 [0006]
- MUIRA *et al.* *Mol. Cell Biol.*, 1991, vol. 11, 1313-1325 [0006]
- Immunology - ASynthesis. Sinauer Associates, 1991 [0021]
- SMITH; WATERMAN. *Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0023]
- NEEDLEMAN; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0023]
- PEARSON; LIPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1988, vol. 85, 2444 [0023]
- HARLOW; LANE. *Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor*, 1988 [0032]
- MALLETT *et al.* *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1063-68 [0034]
- HERSHKO; CIECHANOVER. *Ann. Rev. Bioch.*, 1982, vol. 51, 335-364 [0036]
- HEIJNE. *Nucleic Acids Res.*, 1986, vol. 14, 4683-4690 [0037]
- BARDE. *Neuron*, 1989, vol. 2, 1525-1534 [0045]
- BLANAR; RUTTER. *Science*, 1992, vol. 256, 1014-1018 [0046]

ES 2 323 392 T3

- **R. SCOPES.** Protein Purification: Principles and Practice. *Springer-Verlag*, 1982 [0049]
- **MIURA et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 1313-1325 [0052]
- 5 • **BAZAN et al.** *Current Biology*, 1993, vol. 3, 603-606 [0056]
- **MOINGEON et al.** *Nature*, 1988, vol. 339, 314 [0061]
- **DOYLE; STOMINGER.** *Nature*, 1987, vol. 330, 256-259 [0061]
- 10 • **MAKGOBA et al.** *Nature*, 1988, vol. 331, 86-88 [0061]
- **STAUNTON et al.** *Nature*, 1989, vol. 339, 61-64 [0061]
- 15 • **LINSLEY et al.** *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, 721-730 [0061]
- **LUCKOW et al.** *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 47-55 [0066]
- **WINNACKER.** From Genes to Clones. *VCH Publishers*, 1987 [0067]
- 20 • **QUEEN et al.** *Immunol. Rev.*, 1986, vol. 89, 49 [0067]
- **HUDSON; HAY.** Practical Immunology. *Blackwell Scientific Publications*, 1980 [0068]
- 25 • **BERGER; KIMMEL.** Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques. *Academic Press, Inc*, 1987, vol. 152 [0069]
- **BENTON; DAVIS.** *Science*, 1978, vol. 196, 180 [0071]
- 30 • **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification.** *Freeman Press*, 1992 [0072]
- **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.** *Academic Press*, 1990 [0072]
- **MATTILA et al.** *Nucleic Acids Res*, 1991, vol. 19, 4967 [0072]
- 35 • **ECKERT, K.A.; KUNKEL, T.A.** *PCR Methods and Applications*, 1991, vol. 1, 17 [0072]
- *PCR. IRL Press* [0072]
- 40 • **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. C.S.H.P. Press*, 1989 [0073]
- **BYRN et al.** *Nature*, 1990, vol. 344, 667-670 [0074]
- **ROITT et al.** *Immunology*. 1989 [0078]
- 45 • **PAUL.** Fundamental Immunology. *Raven Press*, 1989 [0078]
- **KABAT et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest* [0079]
- 50 • **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0079]
- **HARLOW; LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. C.S.H.P., 1988 [0082]
- **TOZAWA et al.** *Int. J. Cancer*, 1988, vol. 41, 231-238 [0082]
- 55 • **TANAKA et al.** *Int. J. Cancer*, 1985, vol. 36, 549-555 [0082]
- **OSTBERG et al.** *Hybridoma*, 1983, vol. 2, 361-367 [0083]
- 60 • **QUEEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 10029-10033 [0084]
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0087]
- **PASTAN et al.** *Cell*, 1986, vol. 47, 641-648 [0096]
- 65 • **CHOVNICK et al.** *Cancer Res*, vol. 51, 465 [0096]
- **CHAUDHARY et al.** *Nature*, 1989, vol. 339, 394 [0096]

ES 2 323 392 T3

- The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins. Chapman Hall, 1976 [0096]
- **ARUFFO; SEED.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 8573-8577 [0098]
- 5 • **HISLOP et al.** *J. Thorac. Cardiovasc.*, 1990, vol. 100, 360-370 [0103]
- **LANGER.** *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0112]
- Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology. John Wright and Sons, Bristol [0124]
- 10 • Leukocyte Typing IV. Oxford U. *Press*, 1989 [0127]
- **PICKER.** *J. Immunol*, 1993, vol. 150, 1105-1121 [0128]
- 15 • **ENGLEMAN et al.** *J. Immunol*, 1981, vol. 127, 2124-2129 [0129]
- **ENGLEMAN et al.** *J. Immunol*, vol. 127, 2124-2129 [0129]
- **GUBLER; HOFFMAN.** *Gene*, 1982, vol. 25, 263-369 [0133] [0146]
- 20 • **VON HEIJNE.** *Nucleic Acids Res*, 1986, vol. 14, 4683-4690 [0137]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, vol. 89, 10360-10364 [0142]
- 25 • **MIURA et al.** *Mol. Cell Biol.*, 1991, vol. 11, 1313-1325 [0151]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido soluble aislado que comprende por lo menos 5 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido ACT-4-L mostrado en la fig. 10, presentando dicho polipéptido soluble la capacidad de unirse específicamente al receptor ACT-4-h-1 mostrado en la fig. 5.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% con la secuencia de aminoácidos del polipéptido ACT-4-L mostrado en la fig. 10.
- 10 3. Polipéptido según la reivindicación 1, que consiste de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la secuencia polipeptídica mostrada en la fig. 10.
4. Polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que varía respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la fig. 10 en una sustitución de aminoácido conservadora,
15 uniéndose dicho polipéptido específicamente al receptor ACT-4-h-1 mostrado en la fig. 5 y en el que dicha secuencia de aminoácidos presenta una identidad de secuencia de por lo menos 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en la fig. 10.
- 20 5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se fusiona con un polipéptido heterólogo.
6. Polipéptido según la reivindicación 5, donde el polipéptido heterólogo comprende un dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina.
- 25 7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se encuentra marcado.
8. Utilización de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en la fig. 10, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición inmunológica en un paciente.
30
9. Ácido nucleico aislado codificante de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Vector de expresión replicable que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 9.
- 35 11. Célula huésped procariótica o eucariótica que ha sido transformada para incluir un vector de expresión según la reivindicación 10.
12. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
40
13. Procedimiento de cribado *in vitro* para agentes inmunomoduladores que afectan a la unión del polipéptido receptor ACT-4 a un polipéptido ligando ACT-4-L, comprendiendo el procedimiento: poner en contacto
45
 - (a) un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 10,
 - (b) un polipéptido receptor ACT-4 que presenta una secuencia tal como se muestra en la fig. 5, y
 - 50 (c) un agente sometido a ensayo, y
 detectar la unión entre los componentes (a) y (b).
14. Grupo de unión que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada:
55
 - (1) comprendiendo la cadena ligera humanizada tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que presentan secuencias de aminoácidos sustancialmente procedentes de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes de una cadena ligera de un anticuerpo no humano que se une específicamente a un dominio extracelular del ligando ACT-4-L-h-1, y que presenta una secuencia de marco de región variable sustancialmente idéntica a una secuencia de marco de región variable de cadena ligera humana, y
 - 60 (2) comprendiendo la cadena pesada humanizada tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que presentan secuencias de aminoácidos sustancialmente procedentes de las regiones determinantes de complementariedad correspondientes de una cadena pesada del anticuerpo no humano, y que presentan una secuencia de marco de región variable sustancialmente idéntica a una secuencia de marco de región variable de cadena pesada,
 - 65

ES 2 323 392 T3

en el que el anticuerpo humanizado se une específicamente al dominio extracelular del ligando ACT-4-L-h-1 con una constante de disociación que es inferior o igual a 1 micromolar,

y en el que el ligando ACT-4-L-h-1 es un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5

15. Grupo ligante que comprende un anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente a un dominio extracelular del ligando ACT-4-L-h-1 con una constante de disociación que es inferior o igual a 1 micromolar, en el que el ligando ACT-4-L-h-1 es un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

10

16. Composición farmacéutica que comprende el grupo de unión según la reivindicación 14 ó 15.

17. Grupo ligante según la reivindicación 14 ó 15, para la utilización en el tratamiento de una condición inmunológica en un paciente.

15

18. Utilización de un grupo ligante según la reivindicación 14 ó 15, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición inmunológica en un paciente.

19. Utilización según la reivindicación 18, en la que se suprime la respuesta inmunológica en un paciente.

20

20. Utilización según la reivindicación 18, en el tratamiento del rechazo del trasplante, de la enfermedad del huésped contra el injerto, de una enfermedad autoinmunológica, de la inflamación, de agentes infecciosos, de células infectadas por HTVL, de VIH, de la enfermedad o trastorno intestinal inflamatorio.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1.

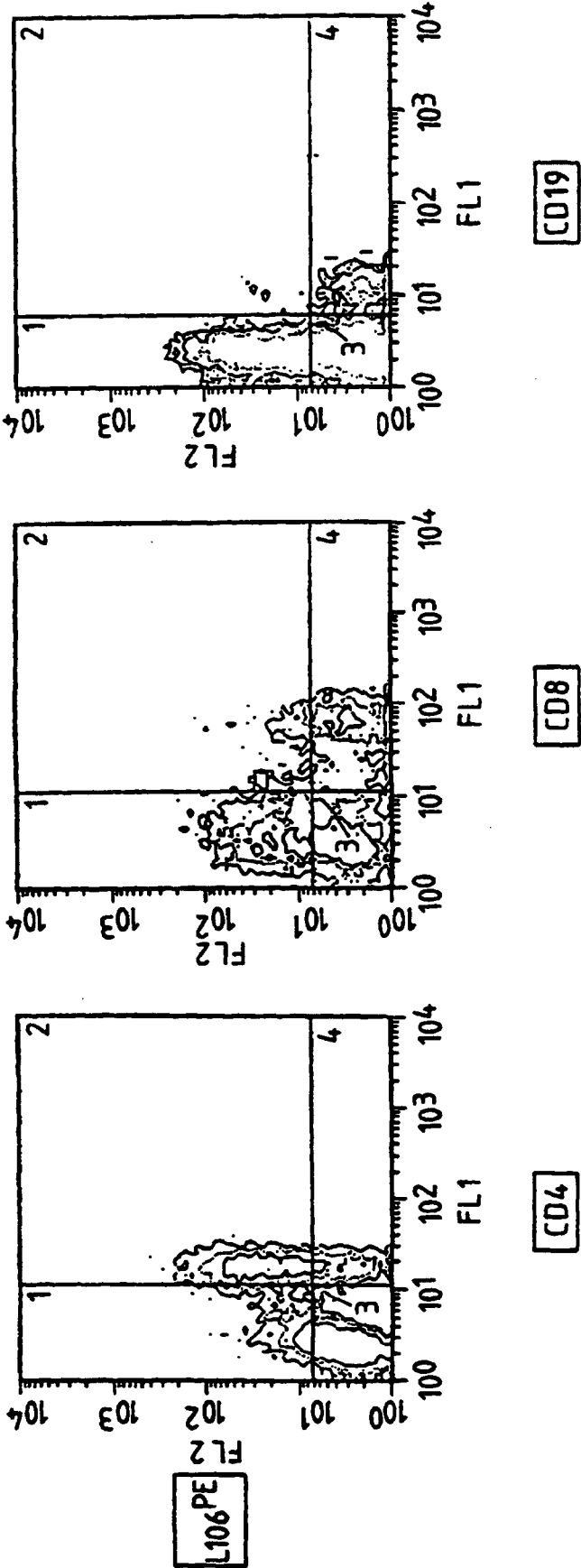


Fig.2.

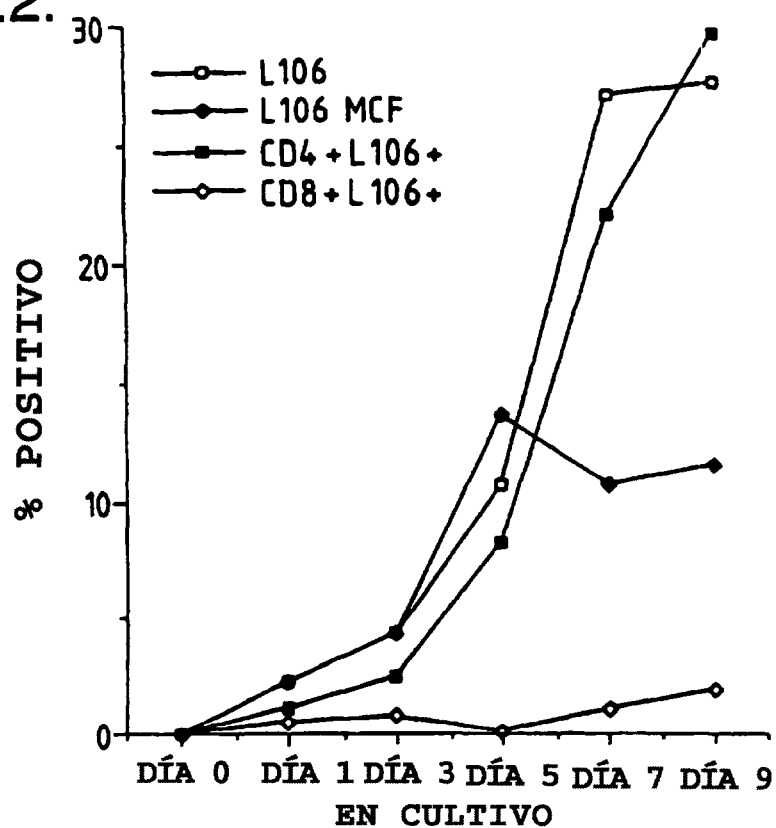


Fig.3.

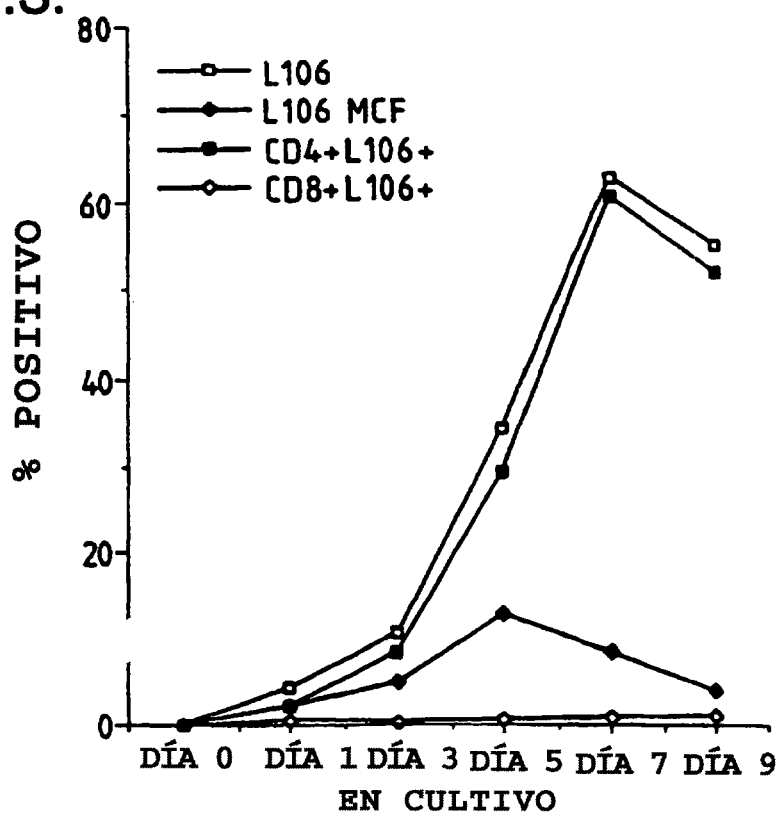


Fig.4.

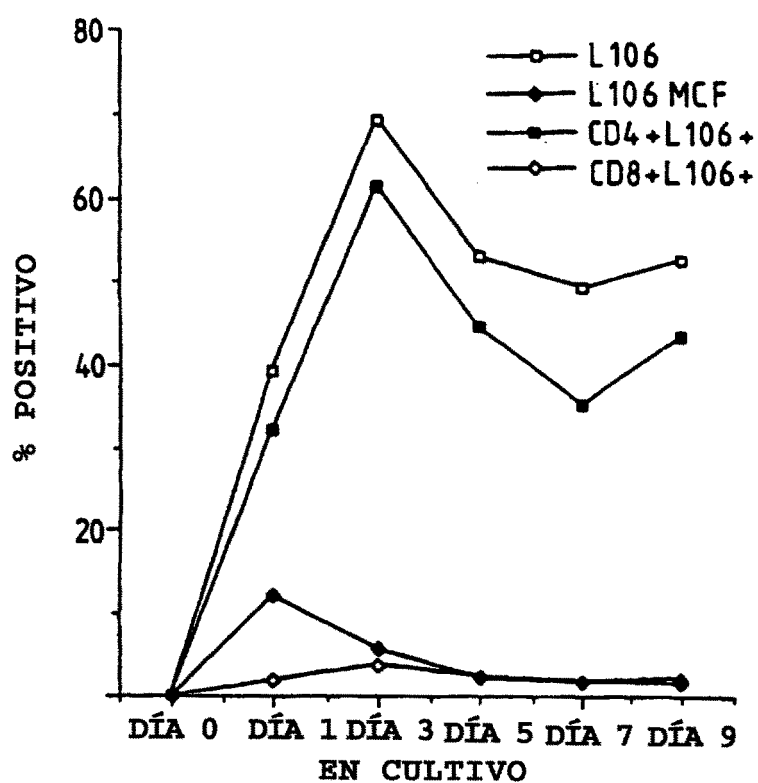


Fig.9.

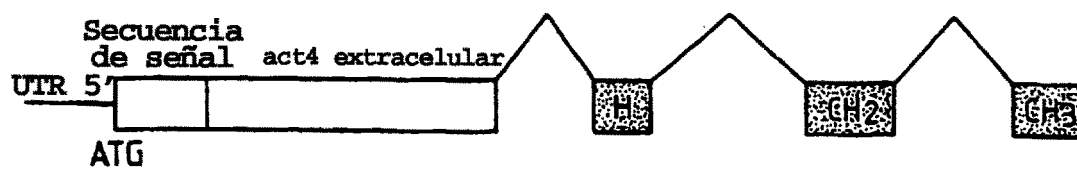


Fig.5.

[illegible]

Fig.5(Cont).

															621																648				
GCC	TGG	CCC	AGA	ACC	TCA	CAG	GGA	CCC	TCC	ACC	CGG	CCC	GTG	GAG	GTC	CCC	GGG																		
A	W	P	R	T	S	Q	G	P	S	T	R	P	V	E	V	P	G																		
															675																702				
GGC	CGT	GCG	GTT	GCC	GCC	ATC	CTG	GGC	CTG	GGC	CTG	GTG	CTG	GGG	CTG	CTG	GGC																		
G	R	A	V	A	A	I	L	G	L	G	L	V	L	G	L	L	G																		
															TM																				
															729																756				
CCC	CTG	GCC	ATC	CTG	CTG	GCC	CTG	TAC	CTG	CTC	CGG	AGG	GAC	CAG	AGG	CTG	CCC																		
P	L	A	I	L	L	A	L	Y	L	L	R	R	D	Q	R	L	P																		
															783																810				
CCC	GAT	GCC	CAC	AAG	CCC	CCT	GGG	GGA	GGC	AGT	TTC	CGG	ACC	CCC	ATC	CAA	GAG																		
P	D	A	H	K	P	P	G	G	G	S	F	R	T	P	I	Q	E																		
															837																864				
GAG	CAG	GCC	GAC	GCC	CAC	TCC	ACC	CTG	GCC	AAG	ATC	TGA	CCT	GGG	CCC	ACC	AAG																		
E	Q	A	D	A	H	S	T	L	A	K	I	*																							
															stop																				
															891																918				
GTG	GAC	GCT	GGG	CCC	CGC	CAG	GCT	GGA	GCC	CGG	AGG	GTC	TGC	TGG	GCG	AGC	AGG																		
															945																972				
GCA	GGT	GCA	GGC	CGC	CTG	CCC	CGC	CAC	GCT	CCT	GGG	CCA	ACT	CTG	CAC	CGT	TCT																		
															999																1026				
AGG	TGC	CGA	TGG	CTG	CCT	CCG	GCT	CTC	TGC	TTA	CGT	ATG	CCA	TGC	ATA	CCT	CCT																		
															1053																				
GCC	CCG	CGG	GAC	CAC	<u>AAT AAA</u>	AAC	CTT	GGC	AG																										
															Poly-A																				

Fig.6.

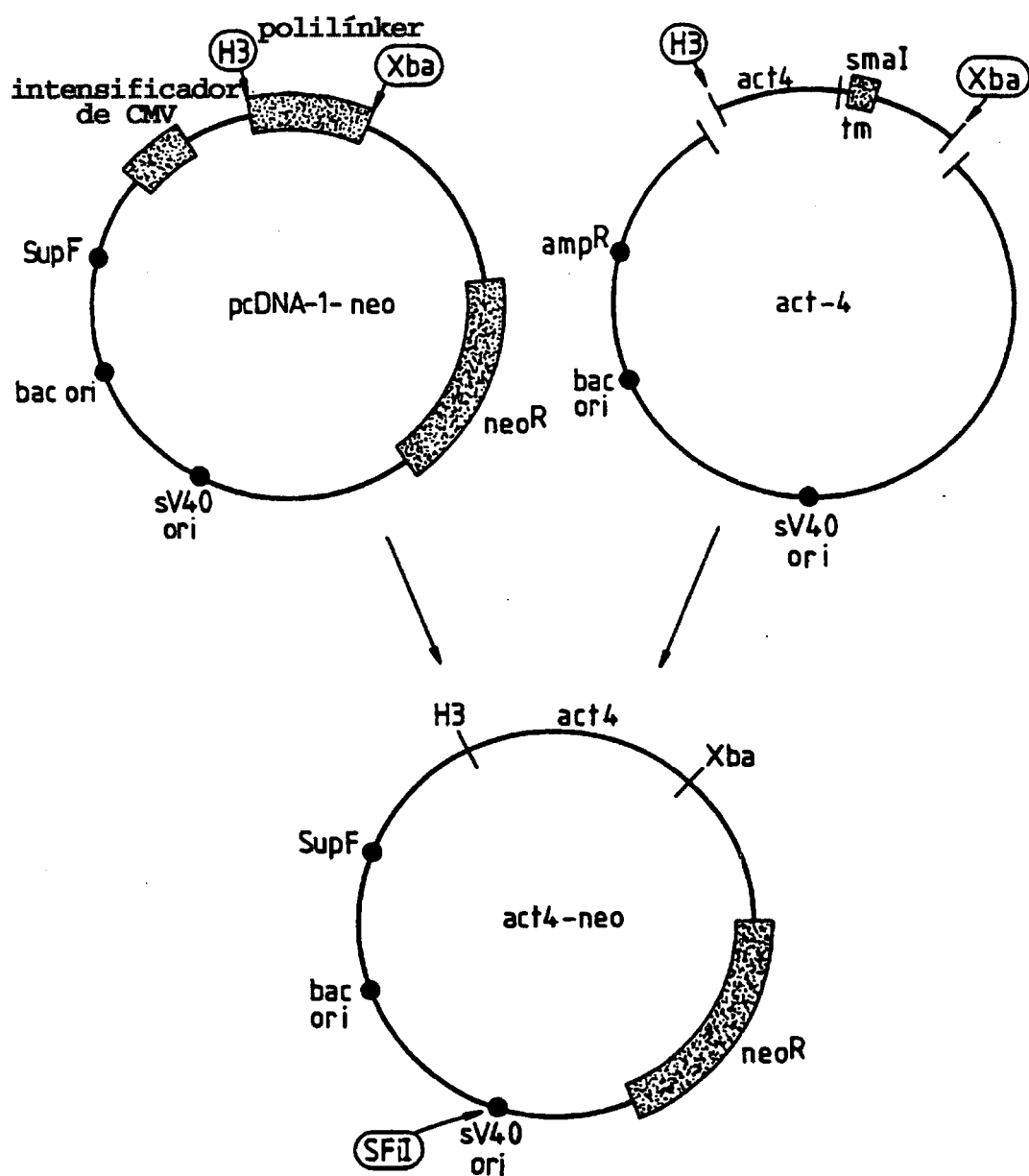


Fig.7.

Expresión de ACT-4-h-1
en líneas celulares estables

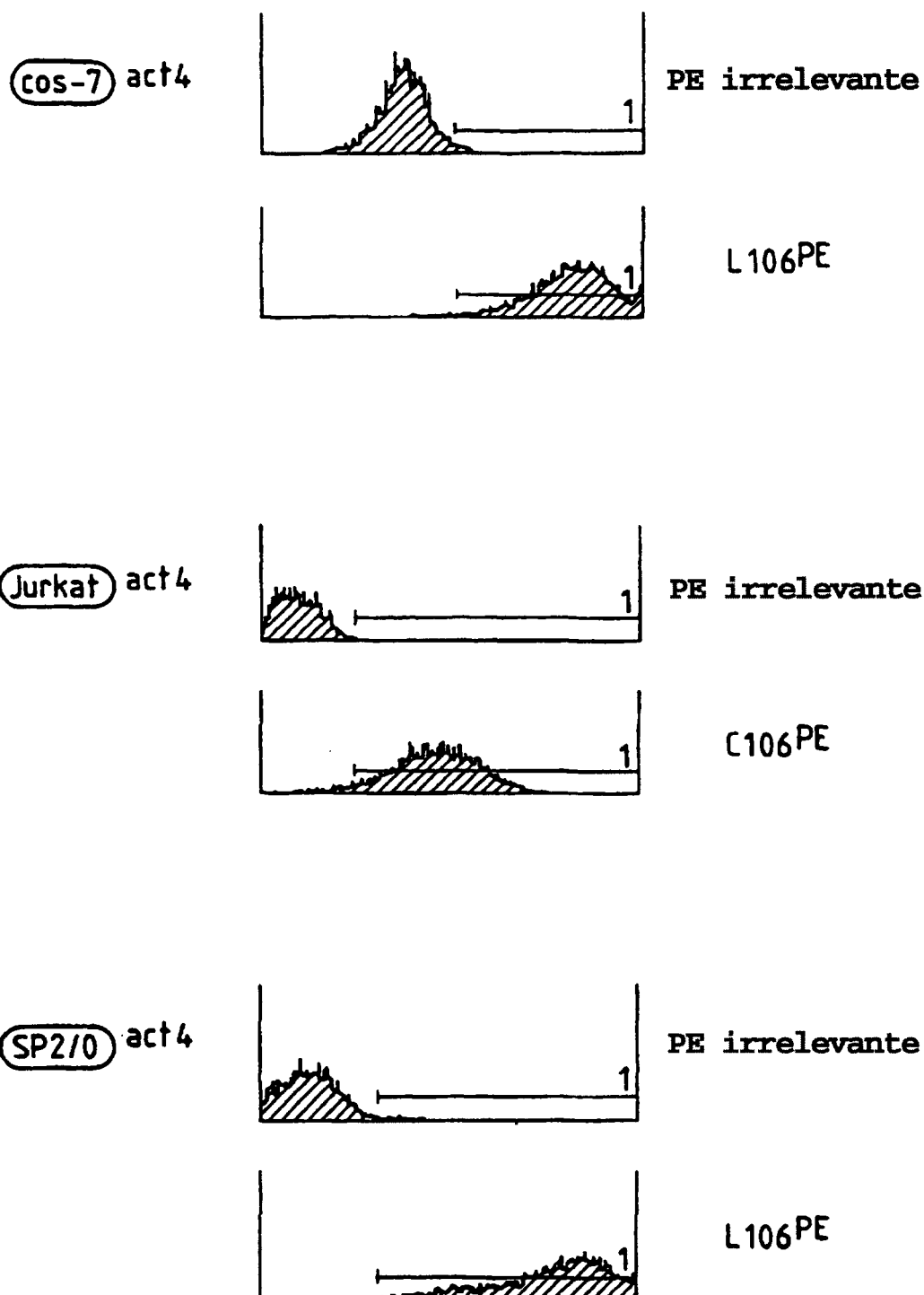


Fig.8.

ACT-4-Ig

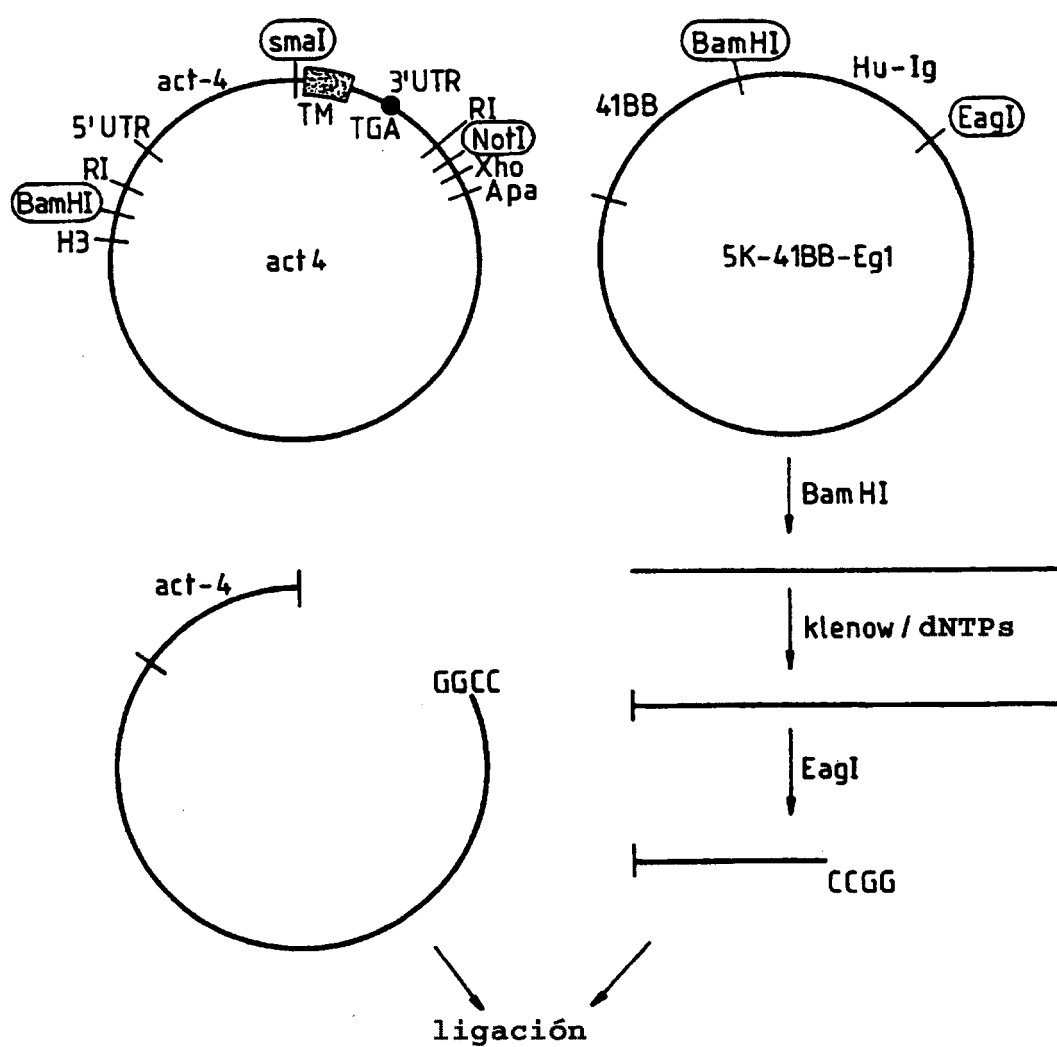


Fig.10.

78 ggccctgggacctttgcctattttctgattgataggctttgttttcttacctccttcttcttctggggaaaaacttca
 156 gttttatcgcacggttcccccttttccatatcttccatcttccctctaccagattgtgaagatggaaagggtccaacccc
 M E R V Q P L
 234 tggaagagaatgtgggaaatgcagccaggccaagattcgagaggaacaagctatttgctgggtggcctctgttaattcagg
 E E N V G N A A R P R F E R N K L L L V A S V I Q G
 312 gactggggctgctcctgtgcttcacctacatctgcctgcacttctctgtcttccagggtatcacatcggtatcctcgaa
L G L L L C F T Y I C L H F S A L Q V S M R Y P R I
 390 ttcaaagtatacaaatccgaatatagaaggagaaagggttttcatcctcacttccccaaaaaggaggatgaaa
 Q S I K V Q F T E Y K K E K G F I L T S Q K E D E I
 468 tcatgaagggtgcagaaacaacttcagtcatcatcaactgtgatgggttttatctcatctcctcctgaagggtacttctccc
 M K V Q N N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S Q
 CHO
 546 aggaagtdaacatttagccttccattaccagaaggatgaggagcccccttctccaactgaagaagggtcagggtctgtcaact
 E V N I S L H Y Q K D E E P L F Q L K K V R S V N S
 CHO

ES 2 323 392 T3

Fig.10(Cont).

ccttgatggcgccctctctgacttacaaagacaaagtctacttg	aatgtgacccactgacaaataacct	ccctggatgact	627
L M V A S L T Y K D K V Y L N V T	N T S	L D D F	
	CHO		
tccatgtgaatggcggaactgattcttatccatcaaaatcctgg	tgaattctgtgtccttttgaggggctgatggca		702
H V N G G E L I L I H Q N P G E F C V L *			
atatctaaaccaggcaccagcatgaacaccaagctggggtggacaggg	catggattcttcatgtcaagtgaaggag		780
cctcccagctcagccacgtgggatgtgacaagaagcagatcctgg	ccctccccccctcagggatatttaa		858
acttattttatataccagttaatcttattatcccttataatttct	aaattgcctagccgtcacaccccaagattgcct		936
tgagcctactaggcacctttgtgagaaagaaaaatagatgcctct	tcttcaagatgcattgttctatttggtcaggc		1014
aattgtcat	aatataa	ctttatgtcattgaaaacgg	1048
señal poli A			