



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 727**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/55** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/55** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97913798 .1**

86 Fecha de presentación : **24.10.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0954333**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.1999**

54 Título: **Receptores solubles de linfotoxina- $\beta$ , anticuerpos anti-receptor de linfotoxina y anticuerpos anti-ligandos de linfotoxina como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunológicas.**

30 Prioridad: **25.10.1996 US 29060 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Biogen Idec MA Inc.**  
**14 Cambridge Center**  
**Cambridge, Massachusetts 02142, US**

72 Inventor/es: **Browning, Jeffrey;**  
**Hochman, Paula, Susan;**  
**Rennert, Paul, D. y**  
**MacKay, Fabienne**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 268 727 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Receptores solubles de linfoxina  $\beta$ , anticuerpos anti-receptor de linfoxina y anticuerpos anti-ligandos de linfoxina como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunológicas.

5 **Campo técnico del invento**

10 El presente invento se refiere a los usos de los agentes bloqueantes del receptor de la linfoxina- $\beta$  que bloquean la señalización del receptor de la linfoxina- $\beta$ . Los agentes bloqueantes del receptor de la linfoxina- $\beta$  son útiles para tratar las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos, regular la expresión de las adreínas y el tráfico celular e influir la diferenciación de las células dendríticas foliculares. Este invento se refiere a las formas solubles del dominio extracelular del receptor de la linfoxina- $\beta$  y a los anticuerpos dirigidos contra el receptor de la linfoxina- $\beta$  o contra su ligando, la linfoxina de superficie, que actúan como agentes bloqueantes del receptor de la linfoxina- $\beta$ .

15 **Antecedentes del invento**

Hay dos brazos de inmunidad adquirida, que en tanto que capaces de colaborar para llevar a cabo el objetivo común de eliminar el antígeno, están mediados por distintos participantes del sistema inmune con efectos diferentes. Un brazo de la respuesta inmune adquirida, la inmunidad humoral, está mediada primariamente por las células B y los anticuerpos circulantes. El otro brazo, denominado inmunidad celular o mediada por células, está mediado por células T que sintetizan y elaboran citoquinas que afectan a otras células.

25 La activación y diferenciación de las células B en respuesta a la mayoría de los antígenos requiere que (1) las células B reciban una señal del antígeno vía sus receptores específicos de antígeno, Ig de membrana, y que (2) las células B reciban señales, dependientes e independientes de contacto, a partir de las células T activadas. La señal coestimuladora dependiente de contacto resulta de la unión del receptor CD40 de las células B al ligando de CD40 expresado en las células T colaboradoras activadas (Laman *et al.*, *Crit Rev Immunol.*, 16: 59-108, 1996; Van Kooten y Banchereau, *Adv Immunol.*, 61: 1-77, 1996). La señalización independiente de contacto está mediada por citoquinas sintetizadas y elaboradas por células T activadas. Juntas, estas señales dependientes e independientes de contacto, conducen a las células B a diferenciarse bien en (1) células B de memoria mantenidas en equilibrio para mediar una respuesta más rápida ante una exposición secundaria al antígeno o en (2) células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Las células plasmáticas, que son la etapa terminal de la diferenciación de las células B, sintetizan y segregan anticuerpos.

35 Las células T colaboradoras ("Th") juegan varios papeles significativos en el sistema inmune. Las citoquinas elaboradas por las células Th al inicio de una provocación inmunológica han mostrado afectar qué vías inmunológicas efectoras se activan subsecuentemente. Las células se activan por la interacción de su receptor específico de antígeno con las células presentadoras de antígeno (APCs) que exhiben en sus superficies fragmentos de péptidos de antígenos exógenos procesados en asociación con moléculas MHC de clase II. Las células Th activadas, a su vez, secretan citoquinas (infoquinas) que activan los mecanismos inmunes efectores apropiados.

40 Las células Th pueden dividirse en tres subgrupos, Th0, Th1 y Th2, de acuerdo con sus patrones de secreción de citoquinas (Fitch *et al.*, *Ann Rev Immunol.*, 11: 29-48, 1993). En ratones, las células colaboradoras Th sin tratamiento previo no estimuladas producen IL-2. La estimulación a corto plazo de las células Th conduce a células precursoras Th0, las cuales producen un amplio intervalo de citoquinas, incluyendo INF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10. Las células Th0 estimuladas de forma crónica pueden diferenciarse bien en los tipos celulares Th1 o Th2, después de lo cual cambia el patrón de expresión de citoquinas. Ciertas citoquinas, por ejemplo, IL-3, CM-CSF y TNF, se liberan por ambas células Th1 y Th2. Otras citoquinas son producidas exclusivamente por un único subgrupo de células Th (Romagnani *et al.*, *Ann Rev Immunol.*, 12: 227-57, 1994). Las células Th1 producen LT $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$  que activan los macrófagos y las respuestas inflamatorias asociadas con la inmunidad celular y la resistencia a infecciones intracelulares.

50 Las células Th2 producen las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que aumentan la producción de células eosinófilas y mastocitos y promueven la expansión y maduración completas de las células B (Howard *et al.*, "T cell-derived cytokines and their receptors". *Fundamental Immunology*, 3.<sup>a</sup> ed., Raven Press, New York, 1993). Las células Th2 también participan en generar memoria, mutación somática y, por tanto, maduración de la afinidad de células B, y en regular de novo el cambio en el isotipo de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, la citoquina IL-4 de Th2 cambia las células B activadas al isotipo IgG1, mientras que suprime otros isotipos. IL-4 también estimula la superproducción de IgE en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I. La citoquina IL-5 de Th2 induce el isotipo IgA, importante en la inmunidad de las mucosas.

60 Los tejidos linfoides secundarios, tales como los nódulos linfáticos (LN), el bazo y los tejidos linfoides asociados a mucosas, son altamente eficaces en atrapar y concentrar sustancias foráneas y son los principales lugares de activación y diferenciación de los linfocitos T y B dirigidos por antígeno. Estos procedimientos dependen de la diversidad y organización de las células en estos tejidos, proporcionando un marco para muchos aspectos de las respuestas inmunes humorales, tales como las interacciones de las células T/B, la formación del centro germinal (GC), la maduración de la afinidad, el cambio de la clase de inmunoglobulina y el tráfico celular (Klein J., *Immunology*, John Wiley e hijos, 1982). Los mecanismos moleculares responsables del desarrollo, mantenimiento de la estructura y función de los tejidos linfoides periféricos no se entienden en su totalidad.

Aunque la estructura general de los tejidos linfoides secundarios difiere marcadamente y muestra variaciones entre especies de mamíferos, la estructura fina de estos tejidos linfoides secundarios comparte ciertas características, tales como, por ejemplo: (1) accesibilidad al antígeno, (2) características estructurales que aseguran el contacto continuo del antígeno con los linfocitos, (3) áreas ricas en células T rodeadas de células B, (4) folículos ricos en células B, (5) lugares del tipo de zonas marginales, (6) células endoteliales especializadas y (7) lugares de producción de anticuerpos, según se discute abajo en más detalle.

Los tejidos linfoides secundarios son accesibles a los antígenos en el sistema. Por ejemplo, el antígeno accede al bazo vía el suministro de sangre sinusoidal, a los LN vía los vasos linfáticos aferentes y es transportado a través del epitelio especializado hacia el tejido linfoide asociado a mucosas.

Los tejidos linfoides secundarios de varias especies también comparten ciertas características estructurales, como células dendríticas foliculares (FDC) y células interdigitales (IDC), lo que asegura la presencia continua de antígenos en las áreas de los tejidos ricas en linfocitos.

Otra característica común es la presencia de áreas ricas en células T rodeadas por células B. Las áreas ricas en células T incluyen, por ejemplo, las vainas linfoides periarteriolas en la pulpa blanca del bazo y la región paracortical de los LN, las cuales contienen un gran número de células T recirculantes e IDC, que a su vez funcionan como células accesorias para las células T y B.

Adicionalmente, los tejidos linfoides típicamente tienen folículos primarios y secundarios ricos en células B en la pulpa blanca del bazo y en el córtex de los LN. Los folículos secundarios en tales tejidos linfáticos también se denominan centros germinales (GC) y tiene una red densa de FDC para capturar y presentar antígenos.

Las áreas del tipo de la zona marginal también destacan como áreas histológicas definidas en el bazo murino y como sitios más difusos en los órganos linfoides secundarios humanos. Estas áreas comprenden primariamente macrófagos de la zona marginal (MZM), macrófagos metalófilos (MM), células B y células reticulares de la zona marginal, pero también pueden incluir células T y células dendríticas (Kraal, *Int Rev Cytol.* 132: 31-74, 1992). La apertura del flujo sanguíneo arterial en las áreas de la zona marginal da acceso directo a los antígenos a estas células y promueve reacciones celulares a los antígenos en este lugar (Kraal, *Int Rev Cytol.* 132: 31-74, 1992). Se requiere también la presencia de MZM para el tráfico óptimo de las células B en la pulpa blanca esplénica (Kraal, 1992; Kraal *et al.*, *Immunology*, 68: 227-232, 1989).

Típicamente, los linfocitos de la sangre entran en los tejidos linfoides secundarios al cruzar el endotelio especializado, por ejemplo, el endotelio que reviste el interior de las vénulas de los LN (vénulas de endotelio alto, HEV) y el endotelio que reviste el interior de los sinusoides sanguíneos esplénicos en las estructuras similares a la zona marginal. Este endotelio expresa moléculas de adhesión y adresinas que funcionan en el tráfico de células hasta los tejidos linfoides secundarios. Por ejemplo, las adresinas de los LN periféricos (PNAd) son distintas de la adresina de los LN asociados a mucosas, MADCAM-1, la cual está implicada en el tráfico de linfocitos hasta los tejidos linfoides asociados a mucosas, incluyendo tejidos como los LN mesentéricos, las placas de Peyer y la lámina propia.

No están definidas claramente todas las adresinas, por ejemplo, las adresinas para los linfocitos que regresan al bazo permanecen sin definir. Los papeles fisiológicos de esta adresinas incluyen intensificar el reclutamiento de los grupos apropiados de linfocitos específicos de antígeno en una respuesta inmune, y la subsiguiente diseminación de la respuesta inmune a través del cuerpo.

Finalmente, las células plasmáticas, que son las células del plasma productoras de anticuerpos, se detectan en lugares diferentes de en los que las células B progenitoras son activadas por los antígenos. Por ejemplo, los anticuerpos producidos por células plasmáticas en la pulpa roja esplénica resultan principalmente de la activación de células B en las zonas de células T, y las células plasmáticas en la médula de los LN se derivan de las células B activadas en las zonas T del mismo nódulo. De forma similar, los anticuerpos producidos por células plasmáticas en la médula ósea son derivados de células B activadas en los LN mesentéricos o en el tejido linfoide asociado a los intestinos.

Véase, p. ej., ICM MacLennan, "The Structure and Function of Secondary Lymphoid Tissues" en *Clinical Aspects of Immunology*, 5.<sup>a</sup> ed., editores P.J. Lachman, Sir D.K. Peters, F.S. Rosen, M.J. Walport. Blackwell Scientific Publications, págs. 13-30, 1993.

En general, los eventos celulares/histológicos que subyacen en una respuesta inmune humoral a antígenos T-dependientes son como sigue (Toellner *et al.*, *J Exp Med.*, 183: 2303-2312, 1996):

En la fase *inductiva*, las células B y T sin tratamiento previo son activadas y reclutadas en la respuesta inmune en los días inmediatamente posteriores a la entrada del antígeno en el cuerpo. En el bazo, por ejemplo, dentro de las 12 horas de la inmunización para una respuesta secundaria, las células B de memoria encuentran al antígeno de transmisión sanguínea en la zona marginal y dejan la zona marginal para ir a las zonas de células T. Las células B pueden detectarse en las zonas de células T dentro de las 24 horas. Los transcritos cambiados de las inmunoglobulinas pueden detectarse dentro de las 12 horas de la exposición secundaria al antígeno, lo que indica que la interacción célula T-B ya ha ocurrido. Las células B migran entonces hacia las zonas de salida y hacia la pulpa roja donde proliferan para formar los focos de linfoblastos B y se diferencian en células plasmáticas. Las células B también continúan

## ES 2 268 727 T3

proliferando en la zona IDC rica en células T. Dentro de los 4 días tras la inmunización, y después de la proliferación en los GC, empezará la producción de células B de memoria. En una respuesta primaria, para el día 10 son aparentes GC bien desarrollados y alcanzan el tamaño máximo para el día 14 posterior a la inmunización.

5 La proliferación de células T en las zonas de células T se hace evidente a las 48-72 horas y alcanza el máximo en el día 7 después de la inmunización. Esta proliferación de células T contribuye a la activación de células B dependiente de células T. Los niveles proliferativos en la zona de células T disminuyen a medida que se forma el GC. La proliferación de células T también ocurre en el GC donde los centrocitos (células B) en la zona oscura recogen antígenos de las IDC y presentan los antígenos a las células T en la zona clara.

10 El antígeno dependiente de células T puede activar las células B de la zona marginal, las células B sin tratamiento previo de nueva producción y los linfocitos recirculantes atraídos hasta, y retenidos en, los órganos linfoides secundarios por las adreínas y moléculas de adhesión. Las células B sin tratamiento previo muestran las mismas cinéticas para ir a la zona de células T, etc, que las células B activadas.

### 15 *Fase establecida de respuestas dependientes de células T*

20 La fase establecida de respuestas dependientes de células T se mantiene mediante la activación continua de las células B de memoria en los folículos de los órganos linfoides secundarios. En este estadio hay muy poco reclutamiento de células B sin tratamiento previo y la respuesta se conduce primariamente por antígenos retenidos en FDC. Se requieren GC para la generación de memoria óptima, cambio de isotipo, mutación somática y, por tanto, maduración de la afinidad de las inmunoglobulinas.

25 El montaje de tales respuestas de los linfocitos da como resultado la producción de anticuerpos capaces de circular a través del cuerpo por varias rutas, por ejemplo, los anticuerpos abandonan el bazo vía sanguínea y salen de los NL vía linfático eferente. Los anticuerpos, de este modo, se encuentran y se unen directamente al patógeno invasor. Este evento de reconocimiento induce una cascada de mecanismos inmunes efectores, incluida la activación de la cascada del complemento y las reacciones celulares para mediar la protección del hospedante a causa del patógeno.

30 Los anticuerpos también juegan un papel en algunas respuestas patológicas, tales como las respuestas de hipersensibilidad -respuestas inmunes inapropiadas o desproporcionadas evocadas por el contacto con un antígeno encontrado previamente. Hay cuatro tipos reconocidos de hipersensibilidad.

35 La “hipersensibilidad inmediata” tipo I implica la activación de células Th2 inducidas por alérgeno y la liberación de citoquinas de Th2. La citoquina IL-4 de Th2 estimula las células B a cambiar de isotipo para producir IgE, que a su vez activa los mastocitos para producir reacciones inflamatorias agudas, como las que conducen a eccemas, asma y rinitis.

40 Las hipersensibilidades tipos II y III están causadas por anticuerpos IgG e IgM dirigidos contra antígenos de la superficie celular o antígenos de tejidos específicos (Tipo II) o antígenos solubles en suero para formar inmunocomplejos circulantes (Tipo III).

45 La hipersensibilidad del “tipo retardada” tipo IV (DTH) es una respuesta mediada por células Th1 y puede transferirse entre ratones por transferencia de las células Th1, pero no por transferencia del suero solo. Esta característica distingue DTH Tipo IV de los otros tres tipos de hipersensibilidad, los cuales requieren respuestas inmunes humorales causadas primariamente por anticuerpos que pueden transferirse en el suero sin células (Roitt *et al.*, *Immunology*, págs. 19.1-22.12, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3.<sup>a</sup> ed., 1993).

50 Las respuestas inmunes humorales patológicas se asocian con numerosas enfermedades autoinmunes específicas de órgano y sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa (PAN), glomerulonefritis rápidamente progresiva y púrpura trombocitopénica idiopática, así como enfermedades inflamatorias crónicas como las enfermedades de Graves y Chagas. Las respuestas inmunes humorales también pueden contribuir al rechazo del tejido injertado y del órgano trasplantado.

55 Hasta la fecha, el tratamiento de estas múltiples enfermedades inmunológicas ha empleado generalmente fármacos inmunomoduladores e inmunosupresores. Tres fármacos inmunosupresores generales empleados en la actualidad son los esteroides, ciclofosfamida y azatioprina.

60 Los esteroides son fármacos antiinflamatorios pleiotrópicos que suprimen los macrófagos activados e inhiben la actividad de las células presentadoras de antígenos de forma que revierten muchos efectos patológicos de las células T. La ciclofosfamida, un agente alquilante, media la muerte celular al inhibir la replicación y reparación del ADN. La azatioprina es un fármaco antiproliferativo que inhibe la síntesis del ADN. Estos fármacos inmunosupresores no específicos se precisan en dosis elevadas, lo que aumenta su toxicidad (p. ej., nefro- y hepatotoxicidad) y provocan efectos secundarios adversos. Por tanto, no son apropiados para las terapias a largo plazo.

65 El documento WO 94/13808 menciona que LT- $\beta$  puede emplearse en el tratamiento de LES.

De este modo, hay una necesidad no alcanzada de fármacos y terapias adicionales que superen los problemas causados por los tratamientos convencionales.

### Compendio del invento

5

El presente invento resuelve los problemas referidos arriba al proporcionar usos como los definidos en las reivindicaciones 1-19. Las composiciones y métodos que comprenden agentes bloqueantes de LT- $\beta$ -R son útiles para inhibir las respuestas inmunes mediada por anticuerpos, para regular los niveles de expresión de adhesina y el tráfico celular, para influir en la diferenciación de las células dendríticas foliculares y para alterar la organización estructural de los tejidos linfoides secundarios y de estructuras linfoides similares que surgen en condiciones patológicas tales como, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico y púrpura trombocitopénica idiopática. Adicionalmente, los agentes bloqueantes de LT- $\beta$ -R son útiles para alterar la asociación entre los inmunocomplejos y las células B y pueden prevenir la presentación o depósito de los antígenos en las células o, alternativamente, pueden descomponer o suprimir esencialmente los antígenos que ya están presentes sobre las células.

15

El agente bloqueante de LT- $\beta$ -R se selecciona del grupo que consiste en linfotoxina- $\beta$ -R soluble, un anticuerpo dirigido contra LT- $\beta$ -R y un anticuerpo dirigido contra el ligando LT de superficie.

En una realización, se emplean formas solubles del dominio extracelular del receptor de la linfotoxina- $\beta$ , que actúan como agentes bloqueantes de LT- $\beta$ -R. Preferiblemente, comprenden una proteína recombinante de fusión del receptor de la linfotoxina- $\beta$  que tiene el dominio de unión al ligando extracelular de LT- $\beta$ -R fusionado a un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Más preferiblemente, el dominio de unión al ligando de LT- $\beta$ -R está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.

En otra realización de este invento, se emplean anticuerpos que actúan como agentes bloqueantes de LT- $\beta$ -R. Preferiblemente se emplean uno o más anticuerpos dirigidos contra el receptor de la linfotoxina- $\beta$ . Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Otras realizaciones comprenden uno o más anticuerpos dirigidos contra la linfotoxina de superficie. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la linfotoxina- $\beta$ . Los anticuerpos preferidos incluyen el mAb anti-LT- $\beta$ -R humano BDA8 y el mAb anti-LT- $\beta$  humana B9.

30

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una secuencia de la porción extracelular del receptor humano de LT $\beta$  que codifica el dominio de unión al ligando.

35

La Figura 2 es un análisis inmunohistoquímico del bazo de ratones que recibieron múltiples inyecciones de las proteínas de fusión LT $\beta$ -R-Ig o LFA-3-Ig y del antígeno.

La Figura 3 es un análisis inmunohistoquímico que muestra la ausencia de centros germinales a partir de bazos de ratones tratados con LT $\beta$ -R-Ig y tratados con MR-1 (anticuerpo anti-ligando de CD40) y la presencia de células dendríticas foliculares en bazos de ratones tratados con MR-1, pero no con LT $\beta$ -R-Ig. Las proteínas de fusión y el antígeno SRBC se administraron según se describe para la figura 2.

40

La Figura 4 es un análisis inmunohistoquímico que muestra que la expresión de adhesina está alterada en LN de ratones tratados *in utero* y de forma continuada postnatalmente con LT $\beta$ -R-Ig.

45

La Figura 5 es un análisis inmunohistoquímico de la posición de los linfocitos y de la expresión de marcadores de macrófagos en NL mesentéricos de ratones tratados (como en la figura 4) *in utero* y de forma continuada postnatalmente con LT $\beta$ -R-Ig.

50

La Figura 6 es un análisis inmunohistoquímico que muestra que el tratamiento de ratones con LT $\beta$ -R-Ig inhibe la respuesta de los anticuerpos a SRBC.

La Figura 7 es una representación del inmunocomplejo atrapado en las FDCs.

55

### Descripción detallada del invento

A fin de que el invento descrito en esta memoria pueda entenderse completamente, se expone la siguiente descripción detallada.

60

Los términos “respuesta de la inmunoglobina” o “respuesta humoral”, según se emplean en la presente memoria, se refieren a la respuesta inmunológica de un animal a un antígeno extraño por medio de la cual el animal produce anticuerpos frente al antígeno extraño. La clase Th2 de células T colaboradoras son importantes para la producción eficaz de anticuerpos de afinidad elevada.

65

El término “centro germinal”, según se emplea en la presente memoria, se refiere a un folículo secundario de células B que se forma tras inmunización antigénica. La aparición de este lugar histológico se correlaciona con la

## ES 2 268 727 T3

óptima generación de memoria, cambio de isotipo, hipermutación somática y, por tanto, con la maduración de la afinidad de la respuesta de un anticuerpo.

5 Los términos “zona marginal” o “área del tipo de la zona marginal” se refieren a compartimentos de los tejidos linfoides secundarios descritos histológicamente que comprenden primariamente macrófagos de la zona marginal (MZM), macrófagos metalófilos (MM), células B y células reticulares de la zona marginal y, también, células T y células dendríticas. El flujo sanguíneo arterial se abre en los senos marginales proporcionando a los antígenos, de este modo, acceso directo a estas células y promoviendo reacciones celulares frente a los antígenos en este sitio.

10 El término “adresina”, según se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula implicada en el regreso de los linfocitos a los órganos linfáticos secundarios. Tales moléculas se expresan en las células endoteliales, específicamente en las vénulas de endotelio alto en los nódulos linfáticos. La adresina esplénica no está definida. MAdCAM-1 es una adresina de la mucosa; PNA<sub>d</sub> es una adresina periférica.

15 El término “células T colaboradoras (Th)”, según se emplea en esta memoria, se refiere a una subclase funcional de células T que ayuda a generar células T citotóxicas y que coopera con células B para estimular la producción de anticuerpos. Las células T colaboradoras reconocen al antígeno en asociación con las moléculas MHC de clase II y proporcionan señales dependientes de contacto e independientes de contacto (citoquinas) a las células efectoras.

20 El término “citoquina”, según se emplea en esta memoria, se refiere a una molécula que media la señalización entre células. Una “linfoquina” es una citoquina liberada por linfocitos.

25 El término “Th2” se refiere a una subclase de células T colaboradoras que produce LT $\alpha$ , interferón- $\gamma$  e IL-2 (y otras citoquinas) y las cuales producen reacciones inflamatorias asociadas con una respuesta celular, es decir, sin inmunoglobulinas, frente a una provocación.

30 El término “Th2” se refiere a una subclase de células T colaboradoras que produce citoquinas, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, las cuales están asociadas con una respuesta por inmunoglobulinas (humoral) frente a una provocación inmunológica.

35 El término “dominio Fc” de un anticuerpo se refiere a una parte de la molécula que comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3, pero que carece de los sitios de unión al antígeno. El término también pretende incluir las regiones equivalentes de una IgM o de otros isotipos de anticuerpos.

40 El término “anticuerpo anti-receptor de LT $\beta$ ” se refiere a cualquier anticuerpo que se una de forma específica a al menos un epítipo del receptor de LT $\beta$ .

45 El término “anticuerpo anti-LT” se refiere a cualquier anticuerpo que se una de forma específica a al menos un epítipo de LT $\alpha$ , LT $\beta$  o de un complejo LT $\alpha/\beta$ .

50 El término “señalización de LT $\beta$ -R” se refiere a las reacciones moleculares asociadas con la vía de LT $\beta$ -R y a las reacciones moleculares subsiguientes que resultan de esto.

55 El término “agente bloqueante de LT $\beta$ -R” se refiere a un agente que puede disminuir la unión del ligando a LT $\beta$ -R, el agrupamiento de LT $\beta$ -R en la superficie celular o la señalización de LT $\beta$ -R, o que puede influir en cómo se interpreta la señal de LT $\beta$ -R dentro de la célula.

60 Un agente bloqueante de LT $\beta$ -R que actúa en la etapa de unión ligando-receptor puede inhibir la unión del ligando LT al LT $\beta$ -R al menos en un 20%. Ejemplos de agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R incluyen moléculas solubles de LT $\beta$ -R-Fc y Abs anti-LT $\alpha$ , anti-LT $\beta$ , anti-LT $\alpha/\beta$  y anti-LT $\beta$ -R. Preferiblemente, los anticuerpos no tienen reacción cruzada con la forma secretada de LT $\alpha$ .

65 El término “actividad biológica de LT $\beta$ -R” se refiere a: 1) la capacidad de la molécula o derivado de LT $\beta$ -R para competir por la unión del ligando LT soluble o de superficie con moléculas de LT $\beta$ -R solubles o de superficie; o 2) la actividad nativa de LT $\beta$ , tal como la capacidad para estimular una respuesta reguladora inmune o actividad citotóxica.

70 El término “ligando LT” se refiere a un complejo heteromérico de LT $\alpha/\beta$  o su derivado que puede unirse específicamente al receptor de LT $\beta$ .

75 El término “dominio de unión al ligando de LT $\beta$ -R” se refiere a la parte o partes del LT $\beta$ -R que están implicadas en el reconocimiento específico de un ligando LT y en la interacción con éste.

80 Los términos “LT de superficie” y “complejo LT de superficie” se refieren a un complejo que comprende LT $\alpha$  y las subunidades LT $\beta$  unidas a membrana, incluidas formas mutantes, alteradas y quiméricas de una o más de las subunidades -el cual se exhibe en la superficie celular. “Ligando LT de superficie” se refiere a un complejo LT de superficie o su derivado que puede unirse de forma específica al receptor de LT $\beta$ .

El término “sujeto” se refiere a un animal o a una o más células derivadas de un animal. Preferiblemente, el animal es un mamífero. Las células puede estar en cualquier forma, incluido, pero no limitado a, células retenidas en el tejido, grupos de células, células inmortalizadas, transfectadas o transformadas y células derivadas de un animal que se ha alterado física o fenotípicamente.

5

#### Linfotoxina $\beta$ : un miembro de la familia TNF

Las citoquinas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) han emergido como una gran familia de mediadores pleiotrópicos para la defensa y regulación inmunológica del hospedante. Existen miembros de esta familia en formas unidas a membrana, las cuales actúan localmente a través del contacto célula-célula, o como proteínas secretadas, las cuales pueden actuar sobre dianas distantes. Una familia paralela de receptores relacionados con TNF reacciona con estas citoquinas y desata un gran número de vías, incluyendo muerte celular, proliferación celular, diferenciación de tejidos y respuestas proinflamatorias.

TNF, linfotóxina  $\alpha$  ( $LT\alpha$ , también llamada  $TNF\beta$ ) y linfotóxina  $\beta$  ( $LT\beta$ ) son miembros de la familia de ligandos TNF, la cual también incluye los ligandos de los receptores Fas, CD27, CD30, CD40, OX-40 y 4-1BB (Smith *et al.*, *Cell*, 76: 959-62, 1994). La señalización por varios miembros de la familia TNF -incluidos TNF,  $LT\alpha$ ,  $LT\beta$  y Fas- puede inducir muerte de las células tumorales por necrosis o apoptosis (muerte celular programada). En células no tumorogénicas, TNF y muchas de las interacciones ligando-receptor de la familia TNF influyen en el desarrollo del sistema inmune y en las respuestas a varias provocaciones inmunes.

La mayoría de los complejos  $LT\alpha/\beta$  asociados a membrana (“LT de superficie”) tiene una estequiometría  $LT\alpha 1/\beta 2$  (Browning *et al.*, *Cell*, 72: 847-56, 1993; Browning *et al.*, *J Immunol.*, 154: 33-46, 1995). Los ligandos LT de superficie no se unen a TNF-R con gran afinidad y no activan la señalización de TNF-R. El receptor de  $LT\beta$  ( $LT\beta$ -R), sin embargo, sí se une a estos complejos de linfotóxina de superficie con afinidad elevada (Crowe *et al.*, *Science*, 264: 707-10, 1994).

La señalización de  $LT\beta$ -R, como la señalización de TNF-R, tiene efectos antiproliferativos y puede ser citotóxica para las células tumorales. En el documento WO 96/22788, se describen las composiciones y métodos para estimular de forma selectiva  $LT\beta$ -R empleando agentes activadores de  $LT\beta$ -R. Los agentes activadores de  $LT\beta$ -R son útiles para inhibir el crecimiento de las células tumorales sin activar simultáneamente las vías proinflamatorias o inmunorreguladoras inducidas por TNF-R.

Estudios recientes de genes diana sugieren un papel para  $LT\alpha/\beta$  en el desarrollo de los órganos linfoides secundarios (Banks *et al.*, *J Immunol.*, 155: 1685-1693, 1995; De Togni *et al.*, *Science*, 264: 703-706, 1994). Realmente, los ratones deficientes en  $LT\alpha$  carecen de nódulos linfáticos (LN) y de placas de Peyer (PP). Además, sus bazo tienen la arquitectura desorganizada y la expresión de marcadores funcionales en las células de la zona marginal esplénica está alterada (Banks *et al.*, 1995; De Togni *et al.*, *Science*, 264: 703-706, 1994; Matsumoto *et al.*, *Science*, 271: 1289-1291, 1996). Ninguna de estas características se ha descrito para cualquiera de los ratones sin el receptor TNF (ratones *knock out*) (Erickson *et al.*, *Nature*, 372: 560-563, 1994; Pfeiffer *et al.*, *Cell*, 73: 457-467, 1993; Rothe *et al.*, *Nature*, 364: 798-802, 1993). Los solicitantes han definido recientemente un papel para los complejos de membrana  $LT\alpha/\beta$  en el desarrollo de los órganos linfoides secundarios al mostrar que la progenie de ratones a los que se les inyectó durante la gestación con una forma soluble de  $LT\beta$ -R de ratón fusionado con la porción Fc de la IgG1 humana ( $LT\beta$ -R-Ig) carecía de la mayor parte de los nódulos linfáticos y mostraba la arquitectura esplénica desorganizada (Rennert *et al.*, 1996. “Surface Lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs”. *J Exp Med.*, 184: 1999-2006). En otro estudio, ratones transgénicos para un constructo similar a  $LT\beta$ -R-Ig, que empieza a expresarse tres días después del nacimiento, mostraron tener LN. Sin embargo, su arquitectura esplénica estaba desorganizada y varios marcadores de las células de la zona marginal esplénica no se expresaban (Ettinger *et al.*, “Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble  $LT\beta$ -R/IgG1 fusion protein”. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93: 13102-7). En conjunto, estos datos indican que hay un requerimiento temporal de las funciones de LT de membrana para mediar los efectos sobre el desarrollo de órganos linfoides secundarios, pero no para los efectos sobre la arquitectura esplénica.

El sistema TNF también puede funcionar en el desarrollo del bazo. Las células de la zona marginal esplénica de ratones deficientes en TNF no expresan marcadores de macrófagos o MAdCAM-1 (Alexopoulou *et al.*, 60.º Int TNF Congress, Eur Cytokine Network, pág. 228, 1996; Pasparakis *et al.*, 60.º Int TNF Congress, Eur Cytokine Network, pág. 239, 1996). Los ratones deficientes TNF-R55 también carecen de tinción de MAdCAM-1 (pero no de MOMA-1) en la zona marginal esplénica (Neumann *et al.*, *J Exp Med.*, 184: 259-264, 1996; Matsumoto *et al.*, *Science*, 271: 1289-1291, 1996). La expresión de estos marcadores según se observa en el bazo de los ratones deficientes en TNF-R75 parece normal (Matsumoto *et al.*, *Science*, 271: 1289-1291, 1996).

Los tejidos de tipo linfoide no sólo se generan como parte de los procedimientos del desarrollo, sino que también aparecen bajo algunas circunstancias patológicas, tales como la inflamación crónica, un proceso denominado recientemente neolinfoorganogénesis (Picker y Butcher, *Ann Rev Immunol.*, 10: 561-591, 1992; Kratz *et al.*, *J Exp Med.*, 183: 1461-1471, 1996). Tales procedimientos están influenciados aparentemente por miembros de la familia TNF. Los ratones transgénicos para el gen  $LT\alpha$  conducido por el promotor de insulina de rata (RIP-LT) desarrollaron lesiones inflamatorias crónicas inducidas por LT con características de tejidos linfoides organizados (Kratz *et al.*, *J Exp Med.*, 183: 1461-1471, 1996; Picarella *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 89: 10036-10040, 1992).

La evaluación de la función de LT durante una respuesta inmune dependiente de células T, empleando ratones deficientes en  $LT\alpha$ , mostró la necesidad de LT para la formación de GC, posiblemente para mantener una estructura organizada de células dendríticas foliculares (FDCs) y para las respuestas humorales (Banks *et al.*, *J Immunol.*, 155: 1685-1693, 1995; Matsumoto *et al.*, *Science*, 271: 1289-1291, 1996; Matsumoto *et al.*, *Nature*, 382: 462-466, 1996).  
 5 Los ratones deficientes en TNF-R55 también carecen de FDCs, no logran desarrollar GC ni logran desarrollar una respuesta óptima de anticuerpos a las células rojas sanguíneas de oveja (SRBC). Esto sugiere que TNF-R55 podría dispararse por LT soluble o señales de TNF para la mayoría de estas respuestas (Le Hir *et al.*, *J Exp Med.*, 183: 2367-2372, 1996); Alexopoulou *et al.*, 60.º Int TNF Congress, Eur Cytokine Network, pág. 228, 1996; Pasparakis *et al.*, 60.º Int TNF Congress, Eur Cytokine Network, pág. 239, 1996). Hasta la fecha permanece sin identificar un papel  
 10 funcional para la vía de LT/LT $\beta$ -R de superficie en las respuestas inmunes humorales.

El receptor de LT $\beta$ , un miembro de la familia TNF de receptores, se une específicamente a los ligandos LT de superficie. LT $\beta$ -R se une a los complejos heteroméricos de LT (predominantemente LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 y LT $\alpha$ 2 $\beta$ 1), pero no se une a TNF o LT $\alpha$  (Crowe *et al.*, *Science*, 264: 707-10, 1994). En el bazo, timo y, en general, en órganos humanos con implicación en el sistema inmune se encuentran ARNm de LT $\beta$ -R. Aunque los estudios de expresión de LT $\beta$ -R están  
 15 en sus estadios tempranos, los patrones de expresión de LT $\beta$ -R parecen similares a los descritos para TNF-R55, salvo que LT $\beta$ -R carece de células T y B en la sangre periférica, así como de líneas celulares T y B.

Los complejos de linfotoxina (LT) de la superficie celular se han caracterizado en células de hibridoma de células T CD4+ (II-23.D7), las cuales expresan altos niveles de LT (Browning *et al.*, *J Immunol.*, 147: 1230-37, 1991; Androlewicz *et al.*, *J Biol Chem.*, 267: 2542-47, 1992, ambos están incorporados en esta memoria por referencia). La expresión y los papeles biológicos de LT $\beta$ -R, de las subunidades de LT y de los complejos LT de superficie se han revisado por C.F. Ware *et al.* "The ligands and receptors of the lymphotoxin system", en Pathways for Cytolysis. *Current Topics Microbiol Immunol.*, Springer-Verlag, págs. 175-218, 1995, incorporado específicamente por referencia en esta  
 20 memoria.

La expresión de LT $\alpha$  se induce y LT $\alpha$  se secreta primariamente por linfocitos T y B activados y por células asesinas naturales (natural killer, NK). Entre las células T colaboradoras, LT $\alpha$  parece producirse por las células Th1, pero no por las Th2. LT $\alpha$  también se ha detectado en melanocitos. La microglia y las células T en las lesiones de pacientes con esclerosis múltiple pueden teñirse también con antiseros anti-LT $\alpha$  (Selmaj *et al.*, *J Clin Invest.*, 87: 949-954, 1991).  
 30

La linfotoxina  $\beta$  (también llamada p33) se expresa en la superficie de linfocitos T, líneas celulares T, líneas celulares B y células asesinas activadas por linfocitos (LAK) de humanos y de ratón. LT $\beta$  es el sujeto de las solicitudes internacionales de los solicitantes en tramitación con la presente en PCT/US91/04588, publicada el 9 de enero de 1992 como documento WO 92/00329; y PCT/US93/11669, publicada el 23 de junio de 1994 como documento WO 94/13808, los cuales están incorporados en esta memoria por referencia.  
 35

Los complejos LT de superficie se expresan primariamente por linfocitos T (colaboradores, Th1, y células asesinas) y B activados y por células asesinas naturales (NK) según se define por análisis de FACS o inmunohistología empleando anticuerpos anti-LT $\alpha$  o proteínas solubles de fusión LT $\beta$ -R-Ig. En el documento WO 97/03687, se describen composiciones y métodos para usar receptores solubles de LT $\beta$  y anticuerpos específicos anti-receptor de LT $\beta$  y anti-ligando como terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunológicas mediadas por células Th1. LT de superficie también se ha descrito en clones de linfocitos T citotóxicos (CTL) humanos, linfocitos mononucleares periféricos (PML) activados, linfocitos de sangre periférica activados por IL-2 (células LAK), linfocitos B periféricos (PBL) activados por mitógeno de carmín o activados por anti-CD40 y en varios tumores linfoides de linaje celular T y B. El compromiso de las células diana que llevan aloantígenos induce específicamente la expresión de LT de superficie por los clones CTL CD8+ y CD4+.  
 40  
 45

Los solicitantes han descrito en esta memoria varias funciones inmunológicas para la LT de superficie y muestran los efectos de los reactivos que unen LT $\alpha$ / $\beta$  en la generación y carácter de las respuestas de las inmunoglobulinas, en el mantenimiento de la organización celular de los tejidos linfoides secundarios, incluyendo efectos en el estado de diferenciación de las células dendríticas foliculares y en la formación del centro germinal, y sobre los niveles de expresión de adhesina que influyen el tráfico celular. De este modo, los solicitantes definen las aplicaciones terapéuticas para los agentes que se unen a LT $\alpha$ / $\beta$  de superficie y al receptor de LT $\beta$ .  
 50  
 55

Hasta el presente invento, sin embargo, el impacto de la señalización de LT- $\beta$ -R sobre las respuestas humorales, o inmunogénicas, no se entendían completamente. Los inventores han descubierto, por primera vez, que el bloqueo de la vía de las LT, bien LT- $\beta$  o LT- $\beta$ -R, puede alterar la respuesta inmune humoral en un animal.  
 60

Los agentes bloqueantes preferidos incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra LT- $\beta$ -R, incluidos, preferentemente, mAb anti-LT- $\beta$ -R humano BDA8 y mAb anti-LT- $\beta$  humano B9. Los anticuerpos más preferidos incluyen A1.D5.18 y AO.D12.10 y BB-F6. En ciertos casos, puede ser deseable el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra un ligando LT de superficie murino.  
 65

La presentación a largo plazo de antígenos por FDCs es probablemente importante en las enfermedades autoinmunes donde la activación continua del sistema inmune por antígenos endógenos o autoantígenos perpetúa la enfermedad. El inmunocomplejo atrapado en FDCs se ilustra en la Figura 7. La capacidad para eliminar estos inmunocomplejos

de las FDC serviría para reducir la cantidad de activación inmune y amortiguar la enfermedad o, incluso, para parar la progresión de la enfermedad. Esas enfermedades autoinmunes que implican respuestas anómalas de los anticuerpos son dianas obvias para los inhibidores de la vía LT, aunque otras enfermedades autoinmunes más “clásicamente” mediadas por células T puedan tener componentes humorales no reconocidos y, por tanto, pueden también afectarse de forma beneficiosa.

Asimismo, en el campo del trasplante, el rechazo del injerto, es decir, hospedante vs. enfermedad del injerto e injerto vs. enfermedad del hospedante, requiere que la presentación de antígenos se perpetúe. Los mecanismos descritos aquí para manipular FDC pueden aplicarse también para esos problemas asociados con el reconocimiento de lo ajeno, es decir, el trasplante.

Adicionalmente, la presentación continuada de antígenos o el mantenimiento de la memoria antigénica pueden jugar un papel en esas enfermedades autoinmunes causadas por mimetismo molecular. Por ejemplo, la reacción inmune al agente infeccioso *Borrelia burgdorferi* de la enfermedad de Lyme conduce a una enfermedad similar a la artritis presumiblemente porque algunos epítomos antigénicos de esta bacteria se asemejan a un componente normal de la articulación. La eliminación del antígeno bacteriano de Lyme retenido por FDC puede mejorar la artritis inducida por la enfermedad de Lyme. Tal terapia sería también relevante para otros casos de mimetismo asociados con agentes infecciosos.

Los solicitantes han encontrado sorprendentemente que la administración de agentes bloqueantes de LT- $\beta$ -R es capaz de interferir con la presentación y/o depósito de antígenos sobre las células dendríticas foliculares. Típicamente, las células B reconocen los antígenos como inmunocomplejos unidos a la superficie de células dendríticas foliculares. Las células dendríticas foliculares pueden retener los antígenos durante un periodo de tiempo inespecífico. El contacto periódico con el antígeno retenido sobre las FDC puede así relacionarse con la retención de memoria de las células B. Por tanto, los métodos abarcan numerosos estados de la enfermedad que son dependientes de la presentación del antígeno sobre las células dendríticas. La administración de agentes bloqueantes puede hacerse antes de la introducción del antígeno en un animal, en cuyo caso los agentes bloqueantes impedirán todo el depósito del antígeno, o una parte del mismo, sobre las células dendríticas foliculares, de tal modo que impidan o disminuyan la respuesta inmunogénica esperada. Alternativamente, los agentes bloqueantes pueden administrarse a un animal en algún momento después de que las células dendríticas foliculares han asociado con ellas el antígeno. Los métodos pueden interrumpir esta asociación, de modo que la respuesta inmunogénica esperada disminuiría o desaparecería.

La capacidad para interrumpir la asociación entre estas células dendríticas foliculares presentadoras de antígenos y los inmunocomplejos parece ser exclusiva de la vía de la LT- $\beta$ . Por ejemplo, anti-CD40L (MR-1) es otro miembro de la familia TNF y también se expresa en las células dendríticas foliculares. Al igual que LT- $\beta$ -R/Ig, se ha mostrado que MR-1 impide la formación de células germinales y, sin embargo, no afecta a la expresión de los marcadores de FDC. Anti-CD40-L, a diferencia de LT- $\beta$ -R, no impide el atrapamiento de los inmunocomplejos en las células dendríticas foliculares, así como tampoco es capaz de eliminar los inmunocomplejos previamente atrapados en las células dendríticas foliculares. Adicionalmente, los solicitantes han mostrado que anti-CD40-L no afecta a la supervivencia/mantenimiento de las células B de memoria previamente generadas.

Aunque se desconocen las bases precisas de las diferencias entre el impacto de anti-CD40L y de los agentes bloqueantes de LT- $\beta$ -R, se hipotetiza que CD40 puede proporcionar señales de supervivencia a las células B. Sin embargo, el sistema LT es crítico para mantener las células dendríticas foliculares en un estado completamente diferenciado y funcional, una condición que parece necesaria para la reacción del centro germinal y la generación y mantenimiento de las células B de memoria. Por tanto, el bloqueo de la vía CD40/CD40L puede impedir la generación de células B de memoria, pero no afectará a la agrupación de células B de memoria ya establecida. El bloqueo de la vía LT, por otro lado, impide no sólo la generación y el mantenimiento de las células B de memoria, sino que también afecta al mantenimiento de células B de memoria previamente generadas.

Una aplicación adicional de la inhibición de la vía LT fuera del alcance de las reivindicaciones reside en el tratamiento de virus que forman reservorios en el compartimento de las células dendríticas foliculares (FDC). El virus VIH es un buen ejemplo de tal caso. Tras la infección viral, grandes cantidades de virus infecciosos residen en las FDC de los folículos de las células B de los órganos linfoides secundarios (Heathe *et al.*, 1995. “Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity”. *Nature*, 377: 740-4). Se presume que el virus se acompleja con el complemento o con inmunoglobulinas y se une a los receptores de Fc, a los receptores del complemento o a ambos. De este modo, el virus explota el mecanismo normal del sistema inmune de retener la memoria del antígeno durante periodos largos. Durante el curso de la enfermedad, la infección activa de los linfocitos ocurre primariamente en estos lugares. Se ha calculado que durante la fase asintomática de la infección, la agrupación del virus en este compartimento es más de 10 veces más grande que el contenido en células T y monocitos (Cavert *et al.*, 1997. “Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection”. *Science*, 276: 960-4). En las modalidades actuales de tratamiento del VIH, se combinan múltiples fármacos antivirales para reducir la carga viral y evitar que se escapen las variantes resistentes. Una limitación probable de esta terapia reside en la falta de cumplimiento con la terapia y, durante tales intervalos, el virus residual es libre de mutar, permitiendo el desarrollo de variantes resistentes y, de este modo, circundando el proceso terapéutico. Mientras que la carga viral en el compartimento de FDC es drásticamente impactada durante la terapia con múltiples fármacos, los fármacos en sí mismos están mayormente dirigidos hacia la maquinaria de replicación viral, y no a los virus no replicantes en las superficies de las FDC. Por tanto, el reservorio viral en las FDCs puede servir como un reinoculo tras el cese del tratamiento farmacológico. Además, las FDCs pue-

den convertir los virus neutralizados hasta una forma infecciosa acentuando más la importancia de estas células en la patogénesis del VIH.

5 Dado que la inhibición de la vía LT puede provocar que las FDCs desprendan los inmunocomplejos de la superficie celular, el VIH en la forma de un inmunocomplejo podría también desprenderse. Sería deseable desprenderse de toda la carga de VIH en este compartimento inmediatamente antes del inicio de regímenes del tipo de terapia múltiple dado que el virus desprendido debería ser procesado y eliminado del cuerpo o tras infección sería sensible a tratamiento farmacológico. Tal combinación podría reducir la carga viral residual hasta niveles muy bajos, produciendo probablemente una cura. En este caso, bien LT $\beta$ -R/Ig o anticuerpos bloqueantes del ligando o del receptor podrían ser útiles. 10 Un protocolo de tratamiento potencial implicaría iniciar la terapia farmacológica y entonces, dentro de varios días, desprender cualquier virus unido con uno o varios tratamientos con inhibidores de la vía LT. Una vez que la carga viral se redujese, no se requeriría tratamiento adicional con fármacos dirigidos a LT.

15 Mientras que VIH es un ejemplo particularmente bien estudiado, es probable que otros virus residan o se escondan en las FDC en un estado quiescente aguardando a algún evento, como una alteración inmunológica, que conlleve a grandes cantidades de carga antigénica adicional y, en consecuencia, al desprendimiento del virus unido de las FDCs y al resurgimiento del virus.

20 Este descubrimiento tiene implicaciones significativas para muchas enfermedades que dependen de la presentación de antígenos sobre las células dendríticas y de la respuesta generada por las células B de memoria. La señalización de LT $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 es eficaz y sirve como ejemplo de un monoclonal anti-LT $\beta$  bloqueante terapéuticamente útil. Adicionalmente, un anticuerpo monoclonal anti-LT alfa humano dirigido, acreditado AOD12, era capaz de bloquear la señalización LT $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 si bien, en contraste con la mayoría de anticuerpos monoclonales anti-LT alfa humanos, era poco eficaz frente a LT $\alpha$  solo. Estos anticuerpos monoclonales se obtuvieron siguiendo la inmunización de ratones con ligando 25 LT $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 soluble llevando al descubrimiento de anticuerpos monoclonales con especificidad única. Además, los autores mantienen que los anticuerpos monoclonales anti-LT $\alpha$  con especificidad dirigida preferentemente contra el complejo LT $\alpha$ 1/ $\beta$ 2 se encontrarán sólo siguiendo esta forma de inmunización y no vía inmunización con LT alfa solo y, por esto, comprende una clase única de anticuerpos anti-LT $\alpha$ .

## 30 Ejemplos

### *Materiales y métodos*

#### *Ratones*

35 Ratones Balb/c en gestación de duración conocida se adquirieron de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME), alojados bajo barreras de protección convencionales y manipulados de acuerdo con las guías institucionales. Las proteínas de receptor-Ig o los mAbs se inyectaron dentro de la vena de la cola (i.v.) de los ratones gestantes. La progenie de estos ratones y ratones Balb/c de 5 semanas (adquiridos de los laboratorios Jackson, Bar Harbor, ME) se 40 inyectaron con proteínas de fusión vía intraperitoneal (i.p.).

#### *Proteínas de fusión y anticuerpos*

45 Las proteínas de fusión, que comprenden el dominio extracelular bien de LT- $\beta$ -R murino, TNF-R55 humano o LFA-3 humano (que no se une a CD2 murino) fusionado con los dominios de la región bisagra, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 de la IgG1 humana, se prepararon como se describe (Force *et al.*, *J Immunol.*, 155: 5280-5288, 1995; Millar *et al.*, *J Exp Med.*, 178: 211-222, 1993). La IgG1 humana purificada usada como control se adquirió de Protos Immunoresearch (San Francisco, CA). MR1, anticuerpo anti-ligando de CD40 de ratón, se adquirió de Pharmingen (San Diego, CA).

50 Los anticuerpos (MOMA-1, ED3) específicos para marcadores expresados por macrófagos metalófilos (MM) de ratón (ED3 reconoce sialoadhesina) o específicos para fibroblastos reticulares de ratón (ER-TR-7) se adquirieron de Serotec (Oxon, RU). Los anticuerpos específicos para B220, CD4 y MAdCAM-1 (MECA 367) de ratón se adquirieron de Pharmingen (San Diego, CA). Un anticuerpo (ER-TR-9) específico para un marcador expresado por macrófagos de ratón de la zona marginal lo proporcionó el Dr. Reina Mebius (Vrije Universiteit, Ámsterdam). Los anticuerpos (FDC- 55 M1 y FDC-M2) específicos para células dendríticas foliculares (FDC) de ratón se han descrito previamente (Maeda *et al.*, *J Immunol.*, 148: 2340-2347, 1992). El anticuerpo anti-CR1 de ratón (que también tiñe FDC) fue amablemente proporcionado por el Dr. Randolph J. Noelle (Dartmouth Medical School). La detección de la adhesina de nódulos linfáticos periféricos (PNAd) utilizó el anticuerpo MECA 79 (sobrenadante de cultivo celular derivado de células adquiridas de la ATCC, Rockville, MD).

#### *Antígenos e inmunizaciones*

60 Los ratones se inmunizaron i.p. con 100  $\mu$ l de una suspensión al 10% de SRBC (adquiridas de Colorado Serum Company). Esto es equivalente a 1-5 x 10<sup>8</sup> SRBC por inmunización. 65

*Inmunohistoquímica*

El bazo y los nódulos linfáticos se congelaron en medio de inclusión OCT (Miles, Elkhart, IN) y se montaron para seccionamiento por criostato. Las secciones de 7-10 mm de ancho se secaron y fijaron con acetona. Las secciones se incubaron con anticuerpos conjugados durante 1 h a temperatura ambiente en una caja humidificada después de la dilución en tampón A salino tamponado con Tris (TBS-A, 0,05 M de Tris, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween-20 (v/v), 0,25% de albúmina sérica bovina (BSA)), se enjuagaron en TBS-B (0,05 M de Tris, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween-20) y se fijaron 1 min en metanol antes de iniciar la reacción enzimática. Las actividades de la peroxidasa de rábano (HRP) y de la fosfatasa alcalina (AP) se revelaron empleando el kit de sustrato DAB en tabletas (Sigma, St. Louis, MO) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitrozol de tetrazolio (BCIP/NBT, Sigma), respectivamente. Las secciones de tejido se fijaron durante 5 min en metanol y se tiñeron para contador con Giemsa (Fluka, Buchs, Suiza).

*Análisis de imagen de fluorescencia*

Para la tinción de inmunofluorescencia, las secciones congeladas se fijaron con acetona, se secaron al aire y se preparó un bloque con 5  $\mu\text{g/ml}$  de bloque Fc de anti-CD16/CD32 (Pharmingen, San Diego, CA) en salino tamponado con Tris con 0,25% de BSA, 0,05% de Tween-20 y 10% de suero de conejo agregado por calor. Las secciones se tiñeron en el mismo tampón empleando los mAbs y reactivos de detección siguientes: 10  $\mu\text{g/ml}$  de mAb anti-B220 biotinilado (Pharmingen) seguido por 20  $\mu\text{g/ml}$  de estreptavidina-FITC (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL); 10  $\mu\text{g/ml}$  de MECA 367 seguido por 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IgG de rata en F(ab')<sub>2</sub> de cabra con PE (Southern Biotechnology Associates); el sobrenadante del cultivo de MECA79 seguido por 20  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IgM de rata de ratón con FITC (Pharmingen); 20  $\mu\text{g/ml}$  de mAb anti-sialoadhesina seguida por 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IgG de rata en F(ab')<sub>2</sub> de cabra con PE (Southern Biotechnology Associates); 50  $\mu\text{g/ml}$  de PNA biotinilado (Vector Laboratorios, Burlingame, CA) seguido por 10  $\mu\text{g/ml}$  de estreptavidina-PE (Southern Biotechnology Associates); una dilución 1:5 de sobrenadante del cultivo celular del mAb MOMA-1 seguido por 20  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IgM de rata en ratón conjugado con FITC (Pharmingen). Algunas secciones se tiñeron con múltiples mAbs simultáneamente para permitir el análisis superponible de la imagen. Todas las secciones se vieron bajo una óptica de 50X y se fotografiaron empleando Ektachrome P1600 (Kodak, Rochester, NY) o se capturaron como ficheros separados de imagen roja y verde según se describe (Rennert *et al.*, *J Exp Med.*, noviembre de 1996, en prensa).

*Ensayos de hemaglutinación*

Diluciones seriadas de sueros se colocaron en placas de microtitración de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en PBS/1% de glucosa. El título de IgM específica de SRBC se determinó al añadir 25  $\mu\text{l}$  de una suspensión del 10% de SRBC en cada pocillo y la placa se incubó 1 h en un incubador humidificado a 37°C. Para la IgG específica de SRBC, los sueros se incubaron durante 30 min a 37°C con 20  $\mu\text{l/pocillo}$  de 1% de 2-mercaptoetanol (v/v) (Bio-Rad, Richmond, CA) para eliminar los pentámeros de IgM. Entonces 25  $\mu\text{l/pocillo}$  de una suspensión del 10% de SRBC se añadió, seguido por 25  $\mu\text{l/pocillo}$  de 10 mg/ml de una solución (en PBS/1% de glucosa) de anti-IgG de ratón en cabra (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) como agente entrelazante para la hemaglutinación. El título se determinó como el recíproco de la última dilución de suero para la que la hemaglutinación es claramente aparente.

*ELISAs*

Los análisis para el receptor-Ig en plasma usaron mAb específicos para LT $\beta$ -R murino (Browning *et al.*, artículo en preparación), LFA-3 (Miller *et al.*, *J Exp Med.*, 178: 211-222, 1993) o el dominio CH3 de la IgG<sub>1</sub> humana (CDG5, preparado en Biogen) directamente inmovilizados (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en las placas de microtitración de 96 pocillos para la captura, y anti-IgG<sub>1</sub> humano de burro conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) para la detección (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; a dilución 1:4000).

*Producción de moléculas solubles de LT $\beta$ -R*

Los agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R comprenden moléculas de receptor soluble de LT $\beta$ . La Figura 1 muestra la secuencia de la porción extracelular del LT $\beta$ -R humano, la cual codifica el dominio de unión al ligando. Empleando la información de la secuencia en la Figura 1 y las técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica, los fragmentos funcionales que codifican el dominio de unión al ligando de LT $\beta$ -R pueden clonarse dentro de un vector y expresarse en un hospedante apropiado para producir una molécula soluble de LT $\beta$ -R. Las moléculas solubles de LT $\beta$ -R que pueden competir con los receptores nativos de LT $\beta$  por la unión al ligando LT, de acuerdo con los ensayos descritos en el documento WO 97/03687, se seleccionan como agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R.

Un receptor soluble de LT $\beta$  que comprende secuencias de aminoácidos seleccionados entre aquéllos mostrados en la Figura 1 puede estar unido a uno o más dominios de proteína heteróloga (“dominio de fusión”) para aumentar la estabilidad *in vivo* de la proteína de fusión del receptor o modular su actividad biológica o localización.

Preferiblemente, proteínas plasmáticas estables -que típicamente tienen una vida media mayor de 20 horas en la circulación se emplean para construir las proteínas de fusión del receptor. Tales proteínas plasmáticas incluyen, pero no están limitadas a: inmunoglobulinas, albúmina sérica, lipoproteínas, apolipoproteínas y transferrina. Las secuencias que pueden dirigir la molécula soluble de LT $\beta$ -R hacia una célula o tejido particular pueden unirse también al dominio de unión al ligando de LT $\beta$ -R para crear una proteína de fusión de LT $\beta$ -R soluble de localización específica.

Toda o una parte funcional de la región extracelular de  $LT\beta$ -R (Figura 1) que comprende el dominio de unión al ligando de  $LT\beta$ -R puede fusionarse a una región constante de inmunoglobulina como el dominio Fc de una cadena pesada de IgG1 humana (Browning *et al.*, *J Immunol.*, 154: 33-46, 1995). Las proteínas de fusión del receptor soluble con IgG son preferibles, y son los reactivos inmunológicos comunes, y los métodos para su construcción son conocidos en la técnica (véase, p. ej., la patente de Estados Unidos n° 5.225.538, que se incorpora en esta memoria por referencia).

Un dominio funcional de unión al ligando de  $LT\beta$ -R puede fusionarse a un dominio Fc de una inmunoglobulina (Ig) derivado a partir de una inmunoglobulina de clase o subclase distinta de IgG1. Los dominios Fc de anticuerpos pertenecientes a clases o subclases diferentes de Ig pueden activar funciones secundarias diversas. La activación ocurre cuando el dominio Fc se une a un receptor de Fc conocido. Las funciones efectoras secundarias incluyen la capacidad para activar el sistema del complemento, atravesar la placenta y unirse a varias proteínas microbianas. Las propiedades de las diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas se describen en Roitt *et al.*, *Immunology*, pág. 4.8, Mosby-Year Book Europe Ltd., 3.<sup>a</sup> ed., 1993.

La activación del sistema del complemento inicia cascadas de reacciones enzimáticas que median la inflamación. Los productos del sistema del complemento tienen diversidad de funciones, incluyendo la unión de bacterias, endocitosis, fagocitosis, citotoxicidad, producción de radicales libres y solubilización de inmunocomplejos.

La cascada de enzimas del complemento puede activarse por los dominios Fc de los anticuerpos IgG1, IgG3 e IgM unidos al antígeno. El dominio Fc de IgG2 parece ser menos eficaz y los dominios Fc de IgG4, IgA, IgD e IgE son ineficaces en la activación del complemento. De este modo, puede seleccionarse un dominio Fc según si sus funciones efectoras secundarias asociadas son deseables para la respuesta inmune o enfermedad particular, siendo tratado con la proteína de fusión  $LT\beta$ -R-Ig.

Si fuese ventajoso dañar o matar la célula diana que lleva el ligando LT, podría seleccionarse un dominio Fc (IgG1) especialmente activo para fabricar la proteína de fusión  $LT\beta$ -R-Ig. Alternativamente, si fuese deseable dirigir la fusión  $LT\beta$ -R-Fc a una célula sin disparar el sistema del complemento, podría seleccionarse un dominio Fc inactivo de IgG4.

Las mutaciones en los dominios Fc que reducen o eliminan la unión a los receptores de Fc y la activación del complemento se han descrito (S. Morrison, *Ann Rev Immunol.*, 10: 239-65, 1992). Pueden usarse éstas y otras mutaciones, solas o en combinación, para optimizar la actividad del dominio Fc empleado para construir la proteína de fusión  $LT\beta$ -R-Ig.

La producción de una proteína de fusión  $LT\beta$ -R humana soluble que comprende las secuencias de unión al ligando unidas a un dominio Fc de una inmunoglobulina humana ( $hLT\beta$ -R-Ig) se describe en el Ejemplo 1. Una línea de CHO fabricada de acuerdo con el Ejemplo 1 que secreta  $hLT\beta$ -R-Fc se denomina " $hLT\beta$ -R;hG1 CHO#14". Una muestra de esta línea se depositó el 22 de julio de 1995 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC) (Rockville, MD) de acuerdo con las cláusulas del Tratado de Budapest y se le asignó el número de acceso de ATCC CRL 11965.

La producción de una molécula de fusión soluble de  $LT\beta$ -R murina ( $LT\beta$ -R-Ig) se describe en el Ejemplo 2. Una línea CHO fabricada de acuerdo con el Ejemplo 2 que secreta  $LT\beta$ -R-Ig se denomina " $mLT\beta$ ;R-hG1 CHO#1.3.BB". Una muestra de esta línea se depositó el 21 de julio de 1995 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Rockville, MD), de acuerdo con las cláusulas del Tratado de Budapest y se le asignó el número de acceso de ATCC CRL 11964.

Todas las restricciones acerca de la disponibilidad al público de los depósitos ATCC anteriores serán eliminadas de forma irrevocable por la concesión de una patente sobre esta solicitud.

Diferentes residuos de aminoácidos que forman la junta de unión de la proteína de fusión del receptor-Ig pueden alterar la estructura, estabilidad y, finalmente, la actividad biológica de la proteína de fusión del receptor soluble de  $LT\beta$ . Uno o más aminoácidos pueden añadirse al C-terminal del fragmento  $LT\beta$ -R seleccionado para modificar la junta de unión con el dominio de fusión seleccionado.

El N-terminal de la proteína de fusión  $LT\beta$ -R también puede variarse cambiando la posición en la que el fragmento de ADN de  $LT\beta$ -R seleccionado se corta en su extremo 5' para su inserción dentro del vector de expresión recombinante. La estabilidad y actividad de cada proteína de fusión  $LT\beta$ -R puede someterse a ensayo y optimizarse empleando experimentación rutinaria y ensayos para seleccionar los agentes bloqueantes de  $LT\beta$ -R descritos en la presente memoria.

Empleando las secuencias del dominio de unión al ligando de  $LT\beta$ -R del dominio extracelular mostrado en la Figura 1, las variantes de la secuencia de aminoácidos también pueden construirse para modificar la afinidad del receptor soluble de  $LT\beta$  o la proteína de fusión para el ligando LT. Las moléculas solubles de  $LT\beta$ -R pueden competir por la unión al ligando LT de superficie con los receptores endógenos de  $LT\beta$  de la superficie celular.

*Fuente de anticuerpos anti-LT $\beta$ -R*

En otra realización de este invento, los anticuerpos dirigidos contra el receptor de LT $\beta$  humano (Abs anti-LT $\beta$ -R) funcionan como agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R. Los Abs anti-LT $\beta$ -R pueden ser policlonales o monoclonales (mAbs) y pueden modificarse para optimizar su capacidad para bloquear la señalización de LT $\beta$ -R, su biodisponibilidad *in vivo*, su estabilidad u otros rasgos deseados.

Los sueros de anticuerpo policlonal dirigidos contra el receptor de LT $\beta$  humano se preparan empleando técnicas convencionales mediante inyección a animales, tales como cabras, conejos, ratas, hámsteres o ratones, subcutáneamente con una proteína de fusión de receptor humano de LT $\beta$  con Ig (Ejemplo 1) en adyuvante completo de Freund, seguido de una inyección de refuerzo intraperitoneal o subcutánea en adyuvante incompleto de Freund. Los sueros policlonales que contienen los anticuerpos deseados contra el receptor de LT $\beta$  se escrutan mediante procedimientos inmunológicos convencionales.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de ratón dirigidos contra una proteína de fusión de receptor de LT $\beta$  humano con Ig se preparan como se describe en el documento WO 97/03687. Una línea celular de hibridoma (BD.A8.AB9), que produce el mAb de ratón anti-LT $\beta$ -R humano BDA8, se depositó el 12 de enero de 1995 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Rockville, MD), de acuerdo con las cláusulas del Tratado de Budapest y se le asignó el número de acceso ATCC HB11798. Todas las restricciones acerca de la disponibilidad para el público de los depósitos anteriores de la ATCC serán irrevocablemente eliminadas por la concesión de una patente en esta solicitud.

También pueden fabricarse varias formas de anticuerpos anti-LT $\beta$ -R empleando técnicas estándar de ADN recombinante (Winter y Milstein, *Nature*, 349: 293-99, 1991). Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos “quiméricos” en los cuales el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo animal se liga a un dominio constante humano (p. ej., Cabilly *et al.*, patente de EE.UU. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 81: 6851-55, 1984). Los anticuerpos quiméricos reducen las respuestas inmunogénicas observadas producidas por los anticuerpos animales cuando se emplean en tratamientos clínicos humanos.

Además, pueden sintetizarse “anticuerpos humanizados” recombinantes que reconocen el LT $\beta$ -R. Los anticuerpos humanizados son quimeras que comprenden secuencias mayoritariamente humanas de IgG en las que se han insertado las regiones responsables para la unión específica al antígeno (p. ej., documento WO 94/04679). Los animales se inmunizan con el antígeno deseado, los anticuerpos correspondientes se aíslan y se elimina la parte de las secuencias de la región variable responsable de la unión específica al antígeno. Entonces, las regiones de unión al antígeno derivadas del animal se clonan dentro de la posición apropiada de los genes de anticuerpos humanos en los que las regiones de unión al antígenos se han delecionado. Los anticuerpos humanizados minimizan el empleo de secuencias heterólogas (inter-especies) en los anticuerpos humanos, y es menos probable que produzcan respuestas inmunes en los sujetos tratados.

La construcción de diferentes clases de anticuerpos recombinantes anti-LT $\beta$ -R puede llevarse a cabo también haciendo anticuerpos quiméricos o humanizados que comprendan los dominios variables de anti-LT $\beta$ -R y los dominios constantes humanos (CH1, CH2, CH3) aislados a partir de diferentes clases de inmunoglobulinas. Por ejemplo, pueden producirse recombinantemente anticuerpos IgM anti-LT $\beta$ -R con valencias aumentadas de sitios de unión al antígeno mediante clonación del sitio de unión al antígeno dentro de vectores portadores de las regiones constantes de la cadena  $\mu$  humana (Arulanandam *et al.*, *J Exp Med.*, 177: 1439-50, 1993; Lane *et al.*, *Eur J Immunol.*, 22: 2573-78, 1993; Traunecker *et al.*, *Nature*, 339: 68-70, 1989).

Además, pueden emplearse técnicas estándar de ADN recombinante para alterar las afinidades de unión de los anticuerpos recombinantes con sus antígenos mediante alteración de los residuos de aminoácidos en la vecindad de los sitios de unión al antígeno. La afinidad de unión al antígeno de un anticuerpo humanizado puede aumentarse por mutagénesis basada en modelado molecular (Queen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 86: 10029-33, 1989; documento WO 94/04679).

Sería deseable aumentar o disminuir la afinidad de los Abs anti-LT $\beta$ -R por el LT $\beta$ -R dependiendo del tipo de tejido diana o de un régimen de tratamiento particular previsto. Por ejemplo, puede ser ventajoso tratar un paciente con niveles constantes de Abs anti-LT $\beta$ -R con capacidad reducida para enviar señales a través de la vía de LT- $\beta$  para tratamientos semiprofilácticos. Asimismo, los Abs anti-LT $\beta$ -R inhibidores con afinidad aumentada por el LT $\beta$ -R pueden ser ventajosos para los tratamientos a corto plazo.

*Fuente de anticuerpos anti-ligando LT de superficie*

Otra realización preferida de este invento comprende el uso de anticuerpos dirigidos contra el ligando LT que funcionan como agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R. Según se describe arriba para los Abs anti-LT $\beta$ -R, los anticuerpos anti-ligando LT que funcionan como agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R pueden ser policlonales o monoclonales y pueden modificarse conforme a procedimientos rutinarios para modular sus propiedades de unión al antígeno y su inmunogenicidad.

Los anticuerpos anti-LT de este invento pueden producirse contra una cualquiera de las dos subunidades de LT individualmente, incluidas las formas solubles, mutantes, alteradas y quiméricas de la subunidad LT. Si las subunidades

de LT se emplean como antígenos son preferiblemente subunidades de  $LT\beta$ . Si se emplean las subunidades de  $LT\alpha$ , se prefiere que los anticuerpos anti- $LT\alpha$  resultantes se unan al ligando LT de superficie y no presenten reacción cruzada con la  $LT\alpha$  secretada o modulen la actividad del TNF-R (de acuerdo con los ensayos descritos en el documento WO 97/03687).

Alternativamente, los anticuerpos dirigidos contra un complejo homomérico ( $LT\beta$ ) o heteromérico ( $LT\alpha/\beta$ ) que comprende una o más subunidades de LT pueden producirse y escrutarse para la actividad como agentes bloqueantes de  $LT\beta$ -R. Preferiblemente, se emplean complejos  $LT\alpha1/\beta2$  como antígenos. Según se comentó anteriormente, se prefiere que los anticuerpos anti- $LT\alpha1/\beta2$  resultantes se unan al ligando LT de superficie sin unirse a la  $LT\alpha$  secretada y sin afectar la actividad de TNF-R.

La producción de anticuerpos policlonales anti- $LT\alpha$  humanos se describe en la solicitud de los aplicantes en tramitación con la presente (documento WO 94/13808). Los anticuerpos monoclonales anti- $LT\alpha$  y anti- $LT\beta$  también se han descrito (Browning *et al.*, *J Immunol.*, 154: 33-46, 1995).

Los mAbs anti- $LT\beta$  humana de ratón se prepararon según se describe en el documento WO 97/03687. Una línea celular de hibridoma (B9.C9.1) que produce el mAb anti- $LT\beta$ -R humano de ratón B9 se depositó el 21 de julio de 1995 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Rockville, MD), de acuerdo con las cláusulas del Tratado de Budapest, y se le asignó el número de acceso de la ATCC HB11962.

Los anticuerpos monoclonales de hámster anti- $LT\alpha/\beta$  de ratón se prepararon según se describe en el documento WO 97/03687. Una línea celular de hibridoma (BB.F6.1) que produce el mAb de hámster anti- $LT\alpha/\beta$  de ratón BB.F6 se depositó el 21 de julio de 1995 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Rockville, MD), de acuerdo con las cláusulas del Tratado de Budapest, y se le asignó el número de acceso de la ATCC HB11963.

Todas las restricciones acerca de la disponibilidad al público de los depósitos anteriores se eliminarán de forma irrevocable por la concesión de una patente de esta aplicación.

*Empleo de  $LT\beta$ -R-Ig soluble para inhibir las funciones inmunológicas del complejo LT de superficie.* Los autores muestran ahora los efectos de un reactivo de unión a LT de superficie, una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular del  $LT\beta$ -R murino y los dominios de la región bisagra, CH2 y CH3 de la IgG1 humana ( $LT\beta$ -R-Ig), en la generación y carácter de las respuestas de inmunoglobulinas, en el mantenimiento de la organización celular de los tejidos linfoides secundarios, incluidos los efectos sobre el estado de diferenciación de las células dendríticas foliculares y la formación del centro germinal, y en los niveles de expresión de la adhesina que influyen en el tráfico celular.

*Múltiples inyecciones de ratones con  $LT\beta$ -R-Ig alteran la organización de los linfocitos esplénicos y la expresión de marcadores funcionales por las células de la zona marginal esplénica*

El efecto del bloqueo de LT de superficie en la estructura del bazo se examinó dando a los ratones seis inyecciones consecutivas de  $LT\beta$ -R-Ig semanalmente. Entonces, los ratones se inmunizaron con SRBC y se les dio una inyección adicional de  $LT\beta$ -R-Ig 4 días más tarde. Los ratones se sacrificaron el día 10 después de la inyección de SRBC. La tinción inmunohistoquímica de las secciones congeladas de los bazos reveló varios cambios histológicos. Los folículos que comprenden el compartimento esplénico de células B en los ratones normales dejan de ser discretos después del tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig. En cambio, las células B están organizadas ahora en una banda difusa que rodea las áreas de células T (Figura 2B) y el límite entre las zonas de células T y B está disgregado (Figura 2B). En contraste, en los ratones control tratados con LFA-3-Ig los folículos esplénicos de células B son discretos y existe una demarcación clara entre las áreas de células T y B (Figura 2A).

La expresión de los marcadores de superficie celular reconocidos por los anticuerpos monoclonales ER-TR-9 y MOMA-1 está ausente de dos poblaciones distintas de macrófagos que residen en la zona marginal esplénica de los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig. Se sabe que ER-TR-9 tiñe un marcador en MZM (Dijkstra *et al.*, *Immunol.*, 55: 23-30, 1985) y que MOMA-1 tiñe un marcador en los macrófagos metalófilos (Kraal y Janse, *Immunol.*, 58: 665-669, 1986) (Figura 2 D, F, respectivamente). Estos marcadores se expresan en las células de ratones tratados control (LFA-3-Ig) (Figura 2 C, E). La expresión de sialoadhesina, otro marcador de los macrófagos MOMA-1+ en la zona marginal esplénica murina, está también ausente en los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig (datos no mostrados).

El anticuerpo MECA-367 se une a la molécula de adhesión y a la adhesina de la mucosa MAdCAM-1, originalmente descrita en las células endoteliales de las placas de Peyer, en los nódulos linfáticos mesentéricos, en la mucosa intestinal y en la lámina propia (Briskin *et al.*, *Nature*, 363: 461-464, 1993; Nakache *et al.*, *Nature*, 337: 179-181, 1989). La expresión de MAdCAM-1 se ha descrito también en la zona marginal esplénica (presumiblemente expresada en las células endoteliales de las arteriolas terminales pequeñas que se abren en el seno marginal) y en el retículo-reticular dentro de los centros germinales (Kraal *et al.*, *Am J Pathol.*, 147: 763-771, 1995) (figura 2G). La tinción con MECA 367 de las secciones de los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig muestra que la expresión de MAdCAM-1 se ha extinguido en el bazo (Figura 2H).

Asimismo, la tinción por el anticuerpo ER-TR-7 (Van Vliet *et al.*, *Cytochem.*, 34: 883-890, 1986) que traza una población de fibroblastos reticulares en la zona marginal (Figura 2I), está anormalmente distribuida y más fuerte en

la pulpa blanca de los animales tratados con  $LT\beta$ -R-Ig que con LFA-3-Ig (Figura 2J). Los cambios observados en los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig fueron independientes de la exposición al antígeno, dado que el patrón de tinción fue idéntico en los ratones no inmunizados tratados con  $LT\beta$ -R-Ig (datos no mostrados).

5 *La formación del centro germinal se extirpa y las células dendríticas foliculares no se detectan en los bazo de los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig*

Para determinar a nivel histológico si las inyecciones múltiples de los ratones con  $LT\beta$ -R-Ig afectan la respuesta inmune a SRBC, se llevó a cabo un análisis de formación del centro germinal (GC) y de distribución de células dendríticas foliculares (FDC) en respuesta a la carga de antígeno. Las secciones congeladas de bazo de ratones pretratados múltiples veces con  $LT\beta$ -R-Ig o LFA-3-Ig, según se describe para la figura 2, se tiñeron con aglutinina de cacahuete (PNA) para trazar los GCs y para detectar FDC con el anticuerpo FDC-M1, un componente celular requerido para la formación de GC (Schriever y Nadler, *Adv Immunol.*, 51: 243-284, 1992; Tew *et al.*, *Immunol Rev.*, 117: 185-211, 1990). La interacción de CD40 con el ligando de CD40 también se mostró crítica para la formación de GC (Foy *et al.*, 15 *J Exp Med.*, 180: 157-163, 1994). Así, por comparación, se trató un grupo de ratones con MR1, un anticuerpo anti-ligando de CD40 de ratón, seguido de protocolo de inyecciones que había mostrado previamente inhibir la formación de GC (Han *et al.*, *J Immunol.*, 155: 556-567, 1995). Diez días después de la provocación con SRBC, los ratones tratados con la proteína control LFA-3-Ig desarrollaron numerosos GC brillantes para PNA en el bazo (Figura 3A). Los GC no se detectaron en el bazo de los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig o MR1 (Figura 3 B, C, respectivamente). Sin embargo, el efecto de MR1 y  $LT\beta$ -R-Ig puede distinguirse por dos observaciones adicionales. La tinción para FDC (FDC-M1) dentro del GC (Figura 3D) está ausente en el bazo de los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig (Figura 3E), pero todavía está presente en el bazo de los ratones tratados con MR1 (Figura 3F). Observaciones similares se han realizado empleando el anticuerpo FDC-M2 para teñir FDCs (datos no mostrados). De este modo, el tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig da como resultado la alteración fenotípica de FDC en el bazo y el fallo para formar GC.

Además de teñir GC, PNA también tiñe la zona marginal en el bazo de ratones normales. Tal tinción también se notó en ratones tratados con LFA-3-Ig (Figura 3A) y tratados con MR1 (Figura 3C), pero no estuvo presente en el bazo de ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig (Figura 3B).

30 La expresión de sialoadhesina, MOMA-1, ER-TR-9, ER-TR-7 y MAdCAM-1 en el bazo de ratones tratados con MR1 también fue normal (datos no mostrados), distinguiéndose aún más los efectos moleculares de interferir con la señalización de CD40 y de  $LT\beta$ -R.

35 *La cinética de  $LT\beta$ -R-Ig indujo alteraciones de la organización de los linfocitos esplénicos y de la expresión de marcadores celulares de la zona marginal*

Se analizó el número de inyecciones de  $LT\beta$ -R-Ig requeridas para afectar a la organización de los linfocitos y la expresión de marcadores celulares de la zona marginal en el bazo. Los ratones fueron inyectados i.p. con  $LT\beta$ -R-Ig bien una o múltiples veces, según se indica en la Tabla 1. Algunos ratones también se inmunizaron con SRBC el día de la última inyección con  $LT\beta$ -R-Ig. Se evaluó la expresión de B220 y CD4 en las células B y T, respectivamente, así como la tinción con PNA (para GC) y MECA367 (para MAdCAM-1), MOMA-1, ER-TR-9 y FDC-M1 en secciones congeladas de bazo de ratones tratados. Las cinéticas de desaparición de la tinción de los macrófagos metalófilos, macrófagos de la zona marginal, MAdCAM-1, GCs y FDCs se muestran diferentes.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

TABLA 1

*Efecto de LT $\beta$ -R-Ig en la organización esplénica y en la formación del centro germinal en ratones adultos en respuesta a SRBC*

Número de inyecciones de LT $\beta$ -R-Ig	Organización de las células T/B	Macrófagos metalófilos*	Macrófagos en la zona marginal*	Expresión de MAdCAM-1*	Centros germinales§	FDC*
0	normal	+++	+++	+++	+++	+++
1	normal	++	+++	-	+	+
2	ligeramente anormal	+	+++	-	+	+/-
3‡	desorganizada	+	++	-	ND	ND
4‡	desorganizada	+/-	++	-	ND	ND
5‡	desorganizada	-	+	-	ND	ND
6	desorganizada	-	+/-	-	-	-

Los ratones se inyectaron i.p. con 100  $\mu$ g de LT $\beta$ -R-Ig cada semana durante 1 a 5 semanas y entonces se sacrificaron. LT $\beta$ -R-Ig se administró antes de la inyección i.p. de SRBC (100  $\mu$ l de una suspensión del 10%), a menos que se indique de otro modo, y la última inyección de LT $\beta$ -R-Ig se dio el mismo día que el antígeno. Los animales se sacrificaron 10 días después de la inyección de SRBC. Las secciones congeladas de bazo se tiñeron doblemente con anti-B220 de ratón en rata biotinilado y anti-CD4 de ratón en rata, seguido por estreptavidina-fosfatasa alcalina y anti-Ig de rata en ratón con peroxidasa, respectivamente. Las secciones de bazo también se tiñeron con los siguientes anticuerpos anti-ratón: anti-macrófagos de la zona marginal en rata (ER-TR9), anti-macrófagos metalófilos en rata (MOMA-1), anti-MAdCAM1 en rata (MECA 367) y anti-FDC en rata (FDC-M1), seguido por un anti-Ig de rata en ratón con peroxidasa. Un grupo adicional de secciones congeladas se tiñó con aglutinina de cacahuate biotinilada (PNA-biotina), seguida por tinción con estreptavidina-peroxidasa para detectar los centros germinales. Las observaciones se llevaron a cabo sobre secciones de al menos 3 animales por grupo.

\*La intensidad de la tinción se estimó a ojo: tinción normal, +++; tinción reducida, ++; tinción débil, +; y sin tinción, -. La intensidad de la tinción sobre las secciones de animales no tratados y de animales tratados con LFA-3-Ig se tomó como referencia de tinción normal.

§El número de centros germinales por sección de bazo se registra como sigue: > 10, +++; 5-10, ++; 1-5, +; y ninguno, -.

‡Los animales de estos grupos no recibieron SRBC.

ND: no determinado.

Una inyección de LT $\beta$ -R-Ig es suficiente para eliminar la tinción de MAdCAM-1 una semana después. Después de tres inyecciones semanales de LT $\beta$ -R-Ig, la tinción para GCs y FDCs no se detecta y los compartimentos de linfocitos T/B están disgregados. Se requieren un mínimo de cuatro inyecciones de LT $\beta$ -R-Ig para anular la tinción para los macrófagos metalófilos. Seis inyecciones de LT $\beta$ -R-Ig no eliminan por completo la tinción de los macrófagos de la zona marginal con el anticuerpo ER-TR-9 (también ilustrado en la Figura 2D).

Un análisis más preciso de la inhibición rápida de la tinción de MOMA-1, MAdCAM-1, FDC-M1, FDC-M2 y CR1 tras una inyección única de LT $\beta$ -R-Ig se realizó en ausencia de antígeno (Tabla 2).

TABLA 2

Momento preciso de los efectos de  $LT\beta$ -R-Ig en la tinción de MOMA-1, MAdCAM-1, CR1, FDC-M1 y FDC-M2

		Días después de una única inyección de $LT\beta$ -R-Ig						
		0	1	3	5	7	10	14
5								
10	MOMA-1*	+++	+++	+++	+++		++	++
	MAdCAM-1*	+++	+/-	-	-	-	-	-
	CR1*	+++	+++	++	++	++	++	+
15	FDC-M1*	+++	+/-	-		-	-	-
	FDC-M2*	+++	+/-	-	-	-	-	-

20 Los ratones Balb/c de 5-6 semanas recibieron una inyección i.p. de 100  $\mu$ g de  $LT\beta$ -R-Ig o Ig humana. Los ratones de cada grupo se sacrificaron en el día 0, 1, 3, 5, 7, 10 y 14. Las secciones congeladas del bazo se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-macrófagos metalófilos de ratón en rata (MOMA-1), anti-MAdCAM1 de ratón en rata (MECA 367), anti-FDC de ratón en rata (FDC-M1), anti-FDC de ratón en rata (FDC-M2) y anti-CR1 de ratón en rata marcado con biotina seguido por un anti-Ig de rata en ratón con peroxidasa (MOMA-1, MadCAM-1, FDC-M1 y FDC-M2) o con estreptavidina marcada con peroxidasa (CR1).

25 \*La intensidad de la tinción se estimó a ojo: tinción normal, +++; tinción reducida, ++; tinción débil, +; y sin tinción, -. La intensidad de la tinción sobre las secciones de animales no tratados y de animales tratados con Ig humana se tomó como referencia de tinción normal. Se analizaron las secciones de al menos 2 animales por grupo.

30 Los ratones Balb/c que recibieron una única inyección i.p. de  $LT\beta$ -R-Ig se sacrificaron cada día durante catorce días después de la inyección y sus bazos se recogieron y congelaron. Las secciones congeladas de bazo se tiñeron con MOMA-1, anti-MAdCAM-1 (MECA 367) y reactivos específicos de FDC: FDC-M1, FDC-M2 y anticuerpos anti-CR1. Un día después de la inyección con  $LT\beta$ -R-Ig, la tinción con anti-MAdCAM-1 y con los reactivos FDC-M1 y FDC-M2 se redujo enormemente (Tabla 2). La inhibición más rápida de la tinción con FDC-M1 en este experimento, comparable con los resultados de la Tabla 1, puede deberse a la intensidad de la tinción de FDC-M1 que es más fuerte en animales inmunizados. La tinción para CR1 era detectable aún en el día 14, lo que indica que las FDC estaban aún presentes en el día 3 después del tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig, aunque la expresión de los marcadores detectados con FDC-M1 y FDC-M2 se había extinguido. De este modo, el tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig alteró el fenotipo FDC. Finalmente, la tinción con MOMA-1 se redujo, pero aún se detectaba en el día 14.

#### Múltiples tratamientos de $LT\beta$ -R-Ig inhiben la expresión de adhesina en LN

50 Los autores examinaron la expresión de adhesina en LN de la progenie de los ratones Balb/c en gestación de duración conocida que fueron inyectados i.v. en los días 14 y 17 de gestación con 200  $\mu$ g de proteínas de receptor-Ig. Después de nacer, la progenie no fue tratada o fue inyectada una vez semanalmente con 100  $\mu$ l de  $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig o LFA-3-Ig, i.p. Los niveles de proteína de fusión permanecieron iguales o superiores a 10  $\mu$ g/ml a lo largo de toda la vida, según se determinó por ELISA (datos no mostrados). La tinción inmunohistoquímica con MECA367 y MECA79 mostró que MAdCAM-1 y las adhesinas de los LN periféricos estaban completamente ausentes en los LN mesentéricos de ratones tratados toda la vida con  $LT\beta$ -R-Ig (Figura 4 A, B). Los LN sacros de estos ratones también carecían de expresión de todas las adhesinas y los LN cervicales e ilíacos no mostraron tinción de nódulos linfáticos periféricos (PNAd) (datos no mostrados). La reducción de la expresión de adhesinas fue reversible, dado que la expresión se recuperó hasta niveles normales en animales que fueron tratados sólo *in utero* (Figura 4 G, H). En ratones tratados a lo largo de toda la vida con 100  $\mu$ g/semana de TNF-R55-Ig o LFA-3-Ig, la expresión de adhesina en LN permaneció comparable a la de los animales sin tratar (Figura 4 C, D, E, F).

#### La posición de los linfocitos B y la expresión de los marcadores de macrófagos están alteradas en LN de ratones tratados con $LT\beta$ -R-Ig

65 Los anticuerpos que unen marcadores en las poblaciones de macrófagos en los senos capsulares de LN (análogos a los de la zona marginal esplénica) se emplearon para hacer análisis inmunohistoquímico de LN tomados de ratones

que se habían tratado durante la gestación y de forma continua postnacimiento, según se describe para la figura 4 arriba con  $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig o LFA-3-Ig. Las imágenes fluorescentes se analizaron empleando programas de análisis de imagen. La expresión de sialoadhesina se muestra reducida en los LN de ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig soluble (Figura 5B), pero no en los LN de ratones con TNF-R55-Ig o LFA-3-Ig (Figura 5 E, H). La expresión de MOMA-1 en los macrófagos del seno subcapsular aún se detectó en LN de ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig (Figura 5C).

Se evaluaron también los efectos del tratamiento continuado con  $LT\beta$ -R-Ig sobre la organización de los linfocitos en LN. Las secciones de LN se tiñeron con mAbs específicos para el marcador de células B, B220, y para el marcador de células T, CD4. El análisis de imagen se empleó para identificar áreas de zonas superpuestas de células T y B. El tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig provocó la disgregación de los folículos de células B, de modo que las células B se encontraron presentes en una banda difusa en el margen exterior del área de células T (Figura 5A). A pesar de la disgregación de su estructura folicular, las células B no estuvieron presentes dentro de las áreas de células T de los LN, en cambio aparecieron en áreas no ocupadas normalmente por linfocitos. Se observó un patrón muy similar de tinción de células T y B en los ratones tratados a lo largo de toda la vida con 100  $\mu$ g/semana de TNF-R55-Ig, pero no con LFA-3-Ig (Figura 5D). De nuevo los folículos de células B se desorganizaron y aparecieron células B en áreas de LN que normalmente no contenían linfocitos. No se observó superposición de células B con células T.

#### *El tratamiento de ratones con $LT\beta$ -R-Ig inhibe la respuesta de los anticuerpos de IgM e IgG*

El fallo del GC esplénico para formarse después de la carga de SRBC de ratones tratados múltiples veces con  $LT\beta$ -R-Ig (como en la figura 3) sugirió alteraciones en la respuesta inmune humoral de estos ratones. Para someter esto a ensayo directamente ratones adultos recibieron seis inyecciones de  $LT\beta$ -R-Ig o LFA-3-Ig una vez por semana y luego fueron cargados con SRBC. Los ratones se sangraron los días 7 y 14 posteriores a la inmunización y la presencia de IgM e IgG específicos de SRBC en los sueros se analizó empleando ensayos de hemaglutinación. Siete días después de la inmunización con SRBC el título de IgM es normal, pero la respuesta IgG disminuye enormemente en los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig comparado con los ratones tratados con Ig humana o PBS (Figura 6A). En el día 14 posterior a la inmunización, la IgG específica de SRBC no se detecta aún en los sueros de los ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig y el título de IgM específico de SRBC en estos ratones también decrece en más de la mitad frente al de los ratones tratados con Ig humana o PBS (Figura 6A).

Diez días después de la carga de SRBC se detectaron GCs en los bazos de los ratones tratados una o dos veces con  $LT\beta$ -R-Ig, sin embargo, el número de GCs está muy disminuido comparado con los controles (Tabla 1). Cuando los ratones recibieron dos inyecciones de  $LT\beta$ -R-Ig, la primera inyección una semana antes de la carga de SRBC y la segunda inyección el mismo día de la inyección de SRBC, la inhibición de la respuesta de IgM e IgG al SRBC en el día 7 y día 14 (Figura 6 B) es similar a la detectada cuando los ratones recibieron múltiples inyecciones con  $LT\beta$ -R-Ig (Figura 6 A). En el día 30 postinmunización, no se detecta IgG específica de SRBC y los niveles de IgM se redujeron en más de un 80% comparado con los controles (Figura 6 B). De este modo, estos protocolos de tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig dieron como resultado la inhibición completa de las respuestas de IgG y una respuesta de IgM condensada/disminuida relativa a los controles.

Cuando los ratones recibieron una inyección única de  $LT\beta$ -R-Ig el mismo día que la carga de SRBC el nivel de las respuestas de IgG e IgM a SRBC en el día 7 fue comparable al de los grupos control (Figura 6 C). Sin embargo, el día 24 posterior a la inmunización los títulos de IgM e IgG están ambos reducidos en un 30%. El día 34 después de la carga de SRBC, el título de IgM específica de SRBC se reduce en un 50% comparada con los grupos control y la IgG específica de SRBC no pudo detectarse (Figura 6 C). Estos datos muestran que este protocolo de tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig dio como resultado la condensación/reducción marcada de los niveles de ambas respuestas IgM e IgG en curso, lo que indica que el tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig puede inhibir una respuesta humoral que ya se ha iniciado.

#### *Enfermedades mediadas por anticuerpos*

Muchas enfermedades órgano-específicas y autoinmunes sistémicas incluyen respuestas patológicas de anticuerpos. Tales enfermedades incluyen: Miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Chagas, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Wegener, granulomatosis, poliarteritis nodosa y glomerulonefritis rápidamente progresiva (De Benjamini *et al.*, *Immunology. A Short Course*, Wiley-Liss, Nueva York, 3.<sup>a</sup> ed., 1996).

Aunque la etiología de LES no está definida, se conoce bastante acerca del mecanismo inmunológico responsable de la patología observada. Por razones desconocidas, los pacientes con LES producen anticuerpos contra los componentes nucleares del cuerpo (anticuerpos antinucleares, ANA, de forma notable contra el ADN de doble cadena nativo). Clínicamente la presencia de estos anticuerpos se correlaciona mejor con la patología de implicación renal en LES. Estos anticuerpos forman complejo con ADN aparentemente derivado de la desintegración del tejido normal, y como en cualquier enfermedad inmune de agregación, tales complejos forman depósitos atrapados contra la base de la membrana de los glomerulos, en las paredes arteriolares y en los espacios sinoviales de las articulaciones. Estos complejos activan la cascada del complemento y atraen granulocitos. La reacción inflamatoria subsiguiente se caracteriza como glomerulonefritis, con daño resultante en los riñones que conduce a proteinuria y hematuria.

La nefritis por lupus se ha estudiado en modelos murinos durante décadas. Recientemente, la eficacia terapéutica de un reactivo específico para el ligando de CD40 murino se evaluó en un modelo así (Mohan *et al.*, *J Immunol.*, 154:

1470-1480, 1995). La aceleración del lupus por la transferencia de células que inducen la producción de anticuerpos patógenos *in vivo* se mostró inhibida por la administración de un anticuerpo monoclonal que bloquea las interacciones CD40/ligando de CD40. Además, un tratamiento breve de los ratones con lupus con anticuerpo anti-ligando de CD40 tuvo un efecto beneficioso mantenido en su enfermedad espontánea gran tiempo después de que el anticuerpo se haya aclarado de sus sistemas. La experimentación indicó que las células B patógenas no pudieron producir anticuerpos incluso 9 meses después de la terapia, lo que sugiere que hubo un retraso de la expansión de las células B de memoria autoinmune que dio como resultado beneficios terapéuticos a largo plazo. Dado que los autores han mostrado que los reactivos que bloquean las interacciones  $LT\alpha/\beta/LT\beta-R$  *in vivo* inhiben la generación de las respuestas de anticuerpos, alteran el fenotipo de FDC y la formación de centros germinales implicados en la generación óptima de memoria de células B, los reactivos de este invento que bloquean  $LT\alpha/\beta/LT\beta-R$  serán útiles para tratar o prevenir LES.

La respuesta inmune normal a algunos agentes infecciosos patógenos también produce respuestas de autoanticuerpos que pueden llegar a ser excesivas y presentar un problema médico. Un ejemplo es la enfermedad de Chagas, una cardiomiopatía inflamatoria que se desarrolla en humanos y animales experimentales con infección crónica por *Tripanosoma cruzi*. Entre los posibles mecanismos implicados en la patogénesis de la cardiomiopatía de Chagas humana, la inducción de respuestas autoinmunes específicas del corazón ha recibido recientemente apoyo experimental substancial. Un estudio reciente (Tibbetts *et al.*, *J Immunol.*, 152: 1493-1499, 1994) determinó que los anticuerpos específicos de antígenos cardíacos se producen en ratones C57B1/6 infectados por *T. cruzi* con enfermedad de corazón. Tras infección con la cepa brasileña de *T. cruzi* los ratones C57B1/6 desarrollan una cardiomiopatía que es histológicamente similar a la observada en los humanos infectados de forma crónica. Los antisueros de estos ratones reaccionan con tres antígenos cardíacos, mientras que los ratones C57B1/6 infectados con la cepa de Guaymas de *T. cruzi*, que no desarrollan cardiomiopatía, no produjeron tales anticuerpos. Estos datos indican que estos anticuerpos son marcadores específicos de la cardiomiopatía. De este modo, la capacidad de los agentes bloqueantes de  $LT\beta-R$  para inhibir el daño mediado por los autoanticuerpos puede evaluarse en tal modelo de roedor.

Otro ejemplo de destrucción celular por autoanticuerpos generados como consecuencia de ciertas enfermedades infecciosas o por otras razones desconocidas es la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP). En esta condición, los anticuerpos dirigidos a las plaquetas dan como resultado la destrucción de las plaquetas (por complemento o células fagocíticas con receptor de Fc o C3b), lo que puede conducir a sangrado. Los tratamientos que inhiban tales reacciones autoinmunes mediadas por anticuerpos *in vivo*, tales como los agentes bloqueantes de  $LT\beta-R$  -los cuales inhiben la generación de anticuerpos- serán útiles para tratar o evitar estas enfermedades autoinmunes también.

#### *Tratamientos que emplean agentes bloqueantes de $LT\beta-R$*

Las composiciones se administrarán a una dosis eficaz para tratar la enfermedad clínica que se pretende en particular. La determinación de una formulación farmacéutica preferida y un régimen de dosis terapéuticamente eficaz para una aplicación determinada quedan bien dentro de la pericia de la técnica, teniendo en consideración, por ejemplo, la enfermedad y el peso del paciente, la extensión del tratamiento deseado y la tolerancia del paciente al tratamiento.

Las dosis de aproximadamente 1 mg/kg de un  $LT\beta-R$  soluble se espera sean puntos de partida adecuados para optimizar las dosis del tratamiento.

La determinación de una dosis eficaz terapéuticamente puede valorarse también realizando experimentos *in vitro* que midan la concentración del agente bloqueante de  $LT\beta-R$  requerida para recubrir las células diana (células positivas para  $LT\beta-R$  o ligando LT dependiendo del agente bloqueante) durante 1 a 14 días. Los ensayos de unión receptor-ligando descritos previamente en el documento WO 97/03687 pueden emplearse para monitorizar la reacción de recubrimiento celular. Las células positivas para  $LT\beta-R$  o ligando LT pueden separarse de las poblaciones de linfocitos activadas empleando FACS. Conforme a los resultados de tales ensayos de unión *in vitro*, puede seleccionarse un intervalo de concentraciones adecuadas del agente bloqueante de  $LT\beta-R$  para someter a ensayo en animales.

La administración de las moléculas solubles de  $LT\beta-R$ , Abs anti-ligando LT y anti- $LT\beta-R$ , solos o en combinación, incluidas las formas aisladas y purificadas de los anticuerpos o complejos, sus sales o sus derivados farmacéuticamente aceptables, pueden llevarse a cabo empleando cualquiera de los modos de administración de los agentes aceptados convencionalmente que exhiban actividad inmunosupresora.

Las composiciones farmacéuticas empleadas en estas terapias pueden estar también en diversidad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas en dosis sólidas, semi-sólidas y líquidas tales como tabletas, píldoras, en polvo, soluciones o suspensiones líquidas, supositorios y soluciones inyectables o en infusión. La forma preferida depende del modo de administración que se pretenda y de la aplicación terapéutica. Los modos de administración pueden incluir administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intralesional o tópica.

Las moléculas solubles de  $LT\beta-R$  y los Abs anti-ligando LT y anti- $LT\beta-R$  pueden, por ejemplo, colocarse dentro de formulaciones estériles, isotónicas con o sin cofactores que estimulen la ingesta o la estabilidad. La formulación es preferentemente líquida o puede estar liofilizada en polvo. Por ejemplo, las moléculas solubles de  $LT\beta-R$ , Abs anti-ligando de LT y anti- $LT\beta-R$  pueden diluirse con un tampón de formulación que comprende 5,0 mg/ml de ácido cítrico monohidratado, 2,7 mg/ml de citrato trisódico, 41 mg/ml de manitol, 1 mg/ml de glicina y 1 mg/ml de polisorbato 20. Esta solución puede liofilizarse, almacenarse bajo refrigeración y reconstituirse antes de la administración con agua para inyección estéril (USP).

Las composiciones también incluirán preferiblemente vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceuticals Sciences, 16.<sup>a</sup> edición, 1980, Mac Publishing Company). Tales vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir otros agentes medicinales, vehículos, vehículos genéticos, adyuvantes, excipientes, etc., tales como albúmina sérica humana o preparaciones plasmáticas. Las composiciones están preferiblemente en la forma de una dosis unidad y se administrarán normalmente una o más veces cada día.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse empleando microesferas, liposomas, otros sistemas de administración microparticulados o formulaciones de liberación mantenida colocadas en, cerca de, o de otro modo en comunicación con, los tejidos afectados o el torrente sanguíneo. Ejemplos apropiados de vehículos de liberación mantenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en la forma de artículos con formas como supositorios o microcápsulas. Las matrices implantables o microcapsulares de liberación mantenida incluyen polilácticos (patente de EE.UU. n.º 3.773.319; EP 58.481); copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-56, 1985); poli(2-hidroxietil-metacrilato) o etilvinil acetato (Langer *et al.*, *J Biomed Mater Res.*, 15: 167-277, 1981; Langer, *Chem Tech.*, 12: 98-105, 1982).

Los liposomas que contienen moléculas solubles de LT $\beta$ -R, Abs anti-ligando LT y anti-LT $\beta$ -R, solos o en combinación, pueden prepararse por métodos bien conocidos (véase, p. ej., el documento DE 3.218.121; Epstein *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 82: 3688-92, 1985; Hwang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 77: 4030-34, 1980; patentes de EE.UU. n.º 4.485.045 y 4.544.545). Normalmente los liposomas son del tipo unilamelar pequeños (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los que el contenido lipídico es mayor de aproximadamente 30 mol.% colesterol. La proporción de colesterol se selecciona para controlar la velocidad óptima de liberación de molécula soluble de LT $\beta$ -R, Ab anti-ligando LT y anti-LT $\beta$ -R.

Las moléculas solubles de LT $\beta$ -R y los Abs anti-ligando LT y anti-LT $\beta$ -R pueden también unirse a liposomas que contienen otros agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R, agentes inmunosupresores o citoquinas para modular la actividad bloqueante de LT $\beta$ -R. La adhesión de las moléculas de LT $\beta$ -R y de los Abs anti-ligando LT y anti-LT $\beta$ -R a los liposomas puede llevarse a cabo mediante cualquier agente entrelazador conocido, tal como los agentes entrelazadores heterobifuncionales que se han empleado ampliamente para acoplar toxinas o agentes quimioterápicos a anticuerpos para una administración dirigida. La conjugación a los liposomas también puede llevarse a cabo empleando el reactivo entrelazador dirigido a los carbohidratos, ácido 4-(4-maleimidofenil)butírico hidrazida (MPBH) (Duzgunes *et al.*, *J Cell Biochem.*, Abst. Suppl. 16E 77, 1992).

#### Ventajas de las composiciones terapéuticas que comprenden agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R

Los agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R son capaces de inhibir selectivamente los mecanismos efectores inmunes. La inhibición de la inmunidad mediada por anticuerpos se inhibe por múltiples mecanismos, incluyendo la regulación de la formación de GC al influir en la función de FDC. Ambas, la inmunidad mediada por anticuerpos y la celular se inhiben en parte por regulación de la expresión de las adresinas y, de este modo, por influencia sobre el tráfico de linfocitos. Por tanto, los agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R serán útiles en tratar condiciones que se exacerban por las actividades de los anticuerpos o que presentan una expresión aberrante de adresinas. La capacidad para inhibir selectivamente tales respuestas mediadas inmunológicamente será útil para tratar anomalías, incluidas varias condiciones autoinmunes e inflamatorias crónicas. Según se comentó con anterioridad, el tratamiento de tales condiciones patológicas inmunológicamente mediadas emplea generalmente fármacos inmunomoduladores e inmunosupresores que tienen efectos pleiotrópicos en una amplia variedad de tipos celulares y respuestas inmunológicas. Estos agentes inmunosupresores inespecíficos se requieren generalmente en dosis elevadas y a menudo citotóxicas que causan efectos secundarios adversos.

La capacidad de un reactivo que inhibe las respuestas de los anticuerpos para mejorar una respuesta inmunológica patológica se apoya en el estudio reciente de la nefritis del lupus de ratón. En este último estudio, la administración de un anticuerpo que bloquea la vía CD40/CD40L mostró inhibir la aceleración de la nefritis del lupus producido por transferencia de células que inducen la producción de anticuerpos patógenos *in vivo*, y tiene un efecto beneficioso mantenido sobre la enfermedad espontánea mucho tiempo después de que el anticuerpo se ha aclarado del sistema. Estos datos indican que los agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R de este invento serán útiles en suprimir el rechazo celular de injertos de tejido y trasplantes de órganos al inhibir los procedimientos que conducen a la generación de respuestas de anticuerpos.

Los agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R pueden modificarse para obtener un nivel deseable de señalización de LT $\beta$ -R dependiendo de la condición, trastorno o enfermedad que se esté tratando. Se prevé que el nivel absoluto de señalización de LT $\beta$ -R puede ajustarse bien manipulando la concentración y las afinidades de los agentes bloqueantes de LT $\beta$ -R para sus dianas moleculares respectivas.

Por ejemplo, se administran a un sujeto composiciones que comprenden moléculas solubles de LT $\beta$ -R. El receptor soluble de LT $\beta$  puede competir de forma eficaz con los receptores de LT $\beta$ -R de la superficie celular por los ligandos LT de superficie. La capacidad para competir con los ligandos LT de superficie depende de las concentraciones relativas de las moléculas de LT $\beta$ -R solubles y de la superficie celular, así como de las afinidades relativas de unión al ligando.

Las moléculas solubles de  $LT\beta$ -R que albergan mutaciones que aumentan o disminuyen la afinidad de unión de ese mutante de  $LT\beta$ -R soluble con la superficie del ligando LT pueden obtenerse empleando técnicas convencionales de ADN recombinante bien conocidas para aquellos expertos en la técnica. Pueden someterse a ensayo un gran número de moléculas con mutaciones dirigidas al sitio o al azar para determinar su capacidad para actuar como agentes bloqueantes de  $LT\beta$ -R empleando experimentos rutinarios y las técnicas descritas en la presente memoria.

De forma similar, los anticuerpos dirigidos bien contra el receptor de  $LT\beta$  o contra una o más subunidades del ligando LT funcionan como agentes bloqueantes de  $LT\beta$ -R. La capacidad de estos anticuerpos para bloquear la señalización del receptor de  $LT\beta$  puede modificarse mediante mutación, modificación química o por otros métodos que pueden variar la concentración o actividad eficaz del anticuerpo administrado al sujeto.

La capacidad para disminuir la señalización de  $LT\beta$ -R sin inhibirla completamente puede ser importante para establecer o mantener niveles reducidos de señalización de  $LT\beta$ -R que sostengan la función inmune normal mientras inhiben las respuestas mediadas por anticuerpos o células que son exageradas o anómalas.

La disgregación del gen  $LT\alpha$  en un ratón lleva al desarrollo anómalo de los órganos linfoides periféricos (De Togni *et al.*, *Science*, 264: 703-707, 1994). Tales ratones carecían de nódulos linfáticos y sus bazo carecían de la normalmente clara demarcación entre las regiones ricas en células T y B en los folículos. Los autores creen que este fenotipo está asociado con la pérdida de la señalización de  $LT\beta$ -R inducida por LT de superficie, ya que no se han observado fenotipos similares al modular la actividad de TNF-R. La capacidad para bloquear de forma selectiva o parcial la vía  $LT\beta$ -R puede, de este modo, ser útil para tratar el desarrollo anómalo de las estructuras similares a las linfoides que resultan de la inflamación crónica asociada con la ausencia o sobreexpresión de señalización por parte de la vía  $LT\beta$ -R.

Los anticuerpos son mediadores decisivos de las respuestas inmunes a agentes patológicos. De este modo, la inhibición absoluta de las respuestas de los anticuerpos puede no ser deseable en determinadas circunstancias. Por ejemplo, los anticuerpos se requieren para mediar resistencia a las infecciones por bacterias extracelulares como neumococos y hemófilus.

La capacidad para influir el nivel de anticuerpos generado mediante bloqueo de la señalización de  $LT\beta$ -R puede ser importante para maximizar los resultados beneficiosos que pueden conseguirse mediante los tratamientos con los agentes bloqueantes de  $LT\beta$ -R.

Los métodos terapéuticos incluyen inhibir de forma selectiva las respuestas que son dependientes, en su totalidad o en parte, de la vía  $LT\beta$ . Los usos terapéuticos particulares dependen del mecanismo etiológico relevante de uno cualquiera de los procedimientos a inhibir o de los procedimientos deseables a promover médicamente, según será aparente para aquellos expertos en la técnica. De este modo, los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente bloqueante del  $LT\beta$ -R. La proteína empleada en estos métodos puede ser bien una proteína de cadena completa, fragmentos de la proteína o fusión de fragmentos. Los métodos pueden incluir la administración de un receptor de la linfotóxina- $\beta$  soluble. Los agentes bloqueantes pueden administrarse de forma concurrente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo componente que ejerce un efecto médicamente deseable.

Las composiciones pueden formularse de acuerdo con prácticas convencionales, tales como preparadas en un vehículo transportador. El término vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere a uno o más ingredientes orgánicos o inorgánicos, naturales o sintéticos, que pueden facilitar la administración de los agentes bloqueantes del invento a un paciente. Los vehículos adecuados son conocidos para los expertos ordinarios de la técnica.

Cualquiera de las composiciones puede administrarse de cualquier manera que sea médicamente aceptable. Esto puede incluir inyecciones, mediante vías parenterales, tales como intravenosas, intravasculares, intraarteriales, subcutáneas, intramusculares, intratumorales, intraperitoneales, intraventriculares, intraepidurales u otras, así como oral, nasal, oftálmica, rectal o tópica. La administración de liberación mantenida también se incluye de forma específica en el invento, por medios tales como inyecciones *depot* o implantes. La administración localizada también puede ser deseable. Los modos de administración son fácilmente definidos por aquellos expertos en la técnica.

Los agentes bloqueantes de la vía LT que son útiles en el invento reivindicado pretenden incluir derivados funcionales del  $LT\beta$ -R soluble. Los derivados funcionales tienen un dominio de unión a ligando que puede unirse selectivamente a un ligando LT de superficie. Un fragmento de una molécula, como cualquiera de los antígenos quiere referirse a cualquier subgrupo polipeptídico de la molécula. Una variante de tal molécula quiere referirse a una molécula natural substancialmente similar bien a la molécula entera o a un fragmento de la misma. Un análogo de la molécula se refiere a una molécula no natural, substancialmente similar bien a la molécula entera o a un fragmento de la misma.

Las variantes de los agentes bloqueantes difieren de los agentes que ocurren de forma natural en la secuencia de aminoácidos, o en formas que no implican a la secuencia o en ambos. Las variantes en la secuencia de aminoácidos se producen cuando uno o más aminoácidos en las moléculas que ocurren de forma natural se sustituyen con un aminoácido natural diferente, un aminoácido derivado o un aminoácido no nativo. Las variantes particularmente preferidas incluyen las proteínas que ocurren de forma natural o los fragmentos activos biológicamente de proteínas que

ocurren de forma natural, cuyas secuencias difieren de la secuencia salvaje por una o más sustituciones conservativas de aminoácidos. Tales sustituciones son bien conocidas para aquellos expertos en la técnica y típicamente tienen una influencia mínima en la estructura secundaria y en la naturaleza hidrofóbica del agente bloqueante.

5 Las variantes con sustituciones de aminoácidos que son menos conservativas también pueden dar como resultado derivados deseados, p. ej., causando cambios en la carga, conformación y en otras propiedades biológicas. Tales sustituciones incluirían, por ejemplo, la sustitución de residuos hidrofílicos por un residuo hidrofóbico, la sustitución de una cisteína o una prolina por otro residuo, la sustitución de un residuo que tiene una cadena secundaria pequeña por un residuo con una cadena secundaria voluminosa o la sustitución de un residuo con una carga neta positiva por un  
10 residuo con una carga neta negativa. Cuando el resultado de una sustitución dada no puede predecirse a ciencia cierta, los derivados pueden ser sometidos a ensayo fácilmente de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria para determinar la presencia o ausencia de las características deseadas.

15 Los siguientes son ejemplos que ilustran los receptores solubles de  $LT\beta$ , los anticuerpos anti-ligando LT y anti- $LT\beta$ -R y los métodos empleados para caracterizarlos. Estos ejemplos no deberían interpretarse como limitantes: los ejemplos se incluyen con propósitos de ilustración y el presente invento está limitado únicamente por las reivindicaciones.

#### Ejemplo 1

20 *Preparación de receptores solubles de  $LT\beta$  humana como proteínas de fusión de inmunoglobulinas Fc*

La secuencia de un clon de ADNc humano aislado a partir de una librería de secuencias transcritas de 12p humano derivadas de una célula somática híbrida (Baens *et al.*, *Genomics*, 16: 214-18, 1993), se introdujo en el GenBank y se  
25 identificó posteriormente como la secuencia que codifica el  $LT\beta$ -R humano. La secuencia de este clon de ADNc de  $LT\beta$ -R humano de cadena completa ha estado disponible desde 1992 como acceso de GenBank n° L04270.

El dominio extracelular de  $LT\beta$ -R hasta la región transmembrana (Figura 1) se amplificó por PCR a partir de  
30 un clon de ADNc empleando cebadores que incorporaron los sitios de las enzimas de restricción NotI y Sall en los extremos 5' y 3', respectivamente (Browning *et al.*, *J Immunol.*, 154: 33-46, 1995). El producto amplificado se digirió con NotI y Sall, se purificó y se ligó dentro de un vector pMDR901 linealizado con NotI junto con un fragmento Sall-NotI que codifica la región Fc de la IgG1 humana. El vector resultante contenía el gen de la dihidrofolato reductasa y la proteína de fusión  $LT\beta$ -R-Ig conducidos por promotores separados.

35 El vector se electroporó dentro de células CHO dhfr y se aislaron los clones resistentes a metotrexato según procedimientos estándares. La  $LT\beta$ -R-Ig se secretó en el medio y se empleó un ensayo de ELISA para seleccionar las líneas celulares productoras de los mayores niveles de la proteína de fusión del receptor. Una línea celular altamente productora se cultivó hasta números grandes y se recogió el medio condicionado. La proteína de fusión pura del receptor de  $LT\beta$  se aisló mediante cromatografía de afinidad con Proteína A Sefarosa de Flujo Rápido (Pharmacia).  
40

#### Ejemplo 2

*Preparación de receptores solubles de  $LT\beta$  murina como proteínas de fusión de inmunoglobulinas*

45 Un clon del ADNc completo del  $LT\beta$ -R murino se preparó al ligar unos fragmentos 5' NotI/ApaLI y 3' ApaLI/NotI a partir de dos aislamientos de ADNc parciales dentro del sitio NotI de pCDNA3 (InVitrogen, San Diego, CA). La secuencia de este clon de ADNc está accesible como acceso de GenBank n° U29173. No se detectaron diferencias en la secuencia codificante cuando se comparó con otro acceso de la secuencia para el  $LT\beta$ -R murino encontrado en el acceso de GenBank n° L38423.  
50

Una proteína de fusión  $LT\beta$ -R murino soluble/IgG1 humana se preparó mediante amplificación por PCR del clon del ADNc de m $LT\beta$ -R de secuencia completa como modelo y los cebadores 5' AACTGCAGCGCCGCC ATGCGCCTGCC 3' y 5' GACTTTGTCGACCATTGCTCCTGGCTCTGGGG 3'. El producto amplificado se purificó y se digirió con NotI y Sall y se ligó con un fragmento Sall/NotI Fc de IgG1 humana dentro de SAB132 linealizado con NotI y tratado con fosfatasa para formar JLB 122. Para expresión estable, el casete NotI conteniendo el fragmento  $LT\beta$ -R-Ig murino se transfirió dentro del sitio NotI de pMDR901 formando PSH001 y el vector se transfectó dentro de células CHO según se describe (Browning *et al.*, *J Immunol.*, 154: 33-46, 1995). Los clones celulares que secretan  $LT\beta$ -R-Ig murino se identificaron mediante análisis de ELISA. La proteína de fusión del receptor purificada se aisló de los sobrenadantes de las células CHO mediante cromatografía con Proteína A Sefarosa de Flujo Rápido (Pharmacia) y se utiliza en los ejemplos que siguen.  
60

#### Ejemplo 3

*Análisis inmunohistoquímico del bazo después de múltiples inyecciones de los ratones con  $LT\beta$ -R-Ig*

65 Ratones de 4-5 semanas recibieron seis inyecciones, una por semana, de  $LT\beta$ -R-Ig o LFA-3-Ig (100  $\mu$ g i.p.) y fueron inmunizados con SRBC en el día de la sexta inyección de la proteína de fusión. Los ratones recibieron entonces una inyección adicional de  $LT\beta$ -R-Ig o LFA-3-Ig al cuarto día de la provocación con SRBC. Los animales se sacrificaron el

## ES 2 268 727 T3

día 10 después de la inmunización con SRBC y los órganos se recogieron para el análisis de su estructura. La columna izquierda de la Figura 2 representa las secciones de bazo de animales tratados con LFA-3-Ig (A, C, E, G, I) y la columna derecha las de los animales tratados con  $LT\beta$ -R-Ig (B, D, F, H, J). Las secciones de bazo congeladas y fijadas en acetona se tiñeron doblemente con anticuerpos marcados anti-B220 de ratón biotinilado y anti-CD4 de ratón (A y B), seguido por una segunda tinción correspondiente con fosfatasa alcalina marcada con estreptavidina (azul púrpura, tinción oscura) y anti-Ig de rata en ratón marcado con peroxidasa (tinción marrón claro), respectivamente. Otro grupo de secciones congeladas se tiñó con los anticuerpos ER-TR-9 (para detectar MZM; C y D), MOMA-1 (para detectar macrófagos metalófilos; E y F), MECA-367 (específico para MAdCAM-1; G y H) y ER-TR-7 (para teñir fibroblastos reticulares; I y J), seguido de una segunda tinción con un anti-Ig de rata en ratón marcado con peroxidasa de rábano (tinción marrón). Estas imágenes son tinciones representativas de secciones a partir de un mínimo de seis animales. Ampliación 10X.

### Ejemplo 4

15 *Efecto de  $LT\beta$ -R-Ig y del anti-ligando de CD40 en la formación de GC y en la tinción de FDC*

Los animales se trataron con  $LT\beta$ -R-Ig o LFA-3-Ig según se describe en el ejemplo 3. Otro grupo de animales se trató con MR1 (anti-ligando de CD40 de ratón, 250  $\mu$ g/inyección, intraperitonealmente) en el día -1, día 1 y día 3, recibieron SRBC en el día 0 y fueron sacrificados en el día 10. Las secciones de bazo fijadas en acetona de los animales tratados con LFA-3-Ig (columna izquierda de la Figura 3; A y D) o  $LT\beta$ -R-Ig (columna del medio; B y E) o MR1 (columna derecha; C y F) se tiñeron con aglutinina de cacahuete marcada con biotina (PNA, fila superior; A, B y C) o con FDC-M1 (fila inferior; D, E, y F), seguido por una segunda tinción con una estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano y anti-Ig de rata en ratón marcada con peroxidasa de rábano, respectivamente (tinción marrón). La tinción con PNA de la zona marginal se indica mediante una flecha en A y C. La formación de GC se indica por una estrella blanca en A. La tinción para FDC se indica mediante una flecha negra en D y F. Estas imágenes son tinciones representativas de secciones de al menos cuatro animales. Ampliación 10X.

### Ejemplo 5

30 *Expresión de adreína en LN de ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig *in utero* y de forma continuada postnatalmente*

Estos experimentos emplearon la progenie de ratones Balb/c en gestación de duración conocida que se inyectaron i.v. en los días 14 y 17 de la gestación con 200  $\mu$ g de proteínas de receptor-Ig. Después del nacimiento se inyectó la progenie i.p. una vez por semana con 100  $\mu$ g de  $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig o LFA-3-Ig. Los niveles de proteína de fusión permanecieron iguales o superiores a 10  $\mu$ g/ml a lo largo de toda la vida según se determinó mediante ELISA (datos no mostrados). Figura 4. Paneles A, B, G, H: tinción de los nódulos linfáticos de ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig. Paneles C, D: tinción de los nódulos linfáticos de ratones tratados con LFA-3-Ig. Paneles E, F: tinción de los nódulos linfáticos de ratones tratados con TNF-R55-Ig. Los paneles A, C, E, G son nódulos linfáticos mesentéricos teñidos con el anticuerpo MECA367 para detectar la adreína de la mucosa, MAdCAM-1. Los paneles B, D, F, H son nódulos linfáticos periféricos (braquiales) teñidos con el anticuerpo MECA79 específico para las adreínas de LN periféricos (PNAds). Los paneles G, H son nódulos linfáticos de ratones de 6 semanas expuestos sólo a  $LT\beta$ -R-Ig *in utero*. Todas las imágenes están ampliadas 50X.

### Ejemplo 6

45 *Localización de los linfocitos y expresión de los marcadores de macrófagos en los LN de ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig *in utero* y de forma continuada postnatalmente*

Los ratones se trataron *in utero* y de forma continuada postnatalmente con  $LT\beta$ -R-Ig, TNF-R55-Ig o LFA-3-Ig según se describe en el ejemplo 5. Las secciones de LN se tiñeron entonces con anticuerpos específicos para los marcadores expresados por los macrófagos o con mAbs específicos para el marcador B220 de células B y para el marcador CD4 de las células T. El análisis de imagen se empleó a fin de identificar áreas de superposición de zonas de células T y B. Figura 5: los paneles A, D, G son tinción B220/CD4 de LN de ratones tratados con  $LT\beta$ -R-Ig, LFA-3-Ig y TNF-R55-Ig, respectivamente. Las imágenes fluorescentes se analizaron empleando programas de análisis de imagen. Los paneles B, E, H son tinciones para sialoadhesina y los paneles C, F, I son tinciones para MOMA-1.

### Ejemplo 7

60 *Efecto del tratamiento con  $LT\beta$ -R-Ig en la respuesta humoral a SRBC*

Los ratones Balb/c se inyectaron bien con  $LT\beta$ -R-Ig, Ig humana o PBS según sigue: Figura 6A: los ratones recibieron seis inyecciones según se describe para la figura 2, ejemplo 3. Los animales se sangraron el día 7 (barras negras) y el día 14 (barras rayadas) después de la inmunización con SRBC. 6B: los animales recibieron las proteínas de fusión en el día -7 y el día 0. Se les dio SRBC en el día 0 y los animales se sangraron el día 7 (barras negras), el día 14 (barras rayadas) y el día 30 (barras blancas). 6C: los animales recibieron las proteínas de fusión una vez en el día 0, al mismo tiempo que la inmunización con SRBC. La sangre se recogió en el día 7 (barras negras), día 14 (barras rayadas) y día 34 (barras grises).

## ES 2 268 727 T3

El título de IgM e IgG específico de SRBC se determinó mediante análisis de los sueros en ensayos de hemaglutinación. El título se define como el recíproco de la última dilución sérica para la que se detecta hemaglutinación y se representa en una escala logarítmica en base 2 (1 = dilución 1/15 de los sueros). Los resultados se representan como la media de 4 animales diferentes por grupo con los errores estándar.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente bloqueante de LT- $\beta$ -R seleccionado del grupo que consiste en linfotoxina- $\beta$ -R soluble que tiene un dominio de unión al ligando que puede unirse selectivamente a un ligando LT de superficie, un anticuerpo dirigido contra LT- $\beta$ -R y un anticuerpo dirigido contra el ligando LT de superficie, o en el que el agente bloqueante LT- $\beta$ -R comprende un linfotoxina- $\beta$ -R soluble que tiene un dominio de unión al ligando que puede unirse selectivamente a un ligando LT de superficie para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno autoinmune mediado por anticuerpos en un animal, en el que el agente bloqueante de LT- $\beta$ -R inhibe la interacción entre LT- $\beta$  y su receptor.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica comprende además un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el animal es un mamífero.
4. El uso de la reivindicación 3, en el que el mamífero es un humano.
- 20 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente bloqueante de LT- $\beta$ -R comprende un anticuerpo monoclonal dirigido contra el ligando LT de superficie o una subunidad del mismo.
6. El uso de la reivindicación 5, en el que el ligando LT de superficie es un ligando LT de superficie murino.
- 25 7. El uso de la reivindicación 1, en el que el receptor soluble de la linfotoxina- $\beta$  (LT $\beta$ -R) comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.
8. El uso, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio de unión al ligando comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 o un fragmento funcional de la misma.
- 30 9. El uso, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el LT- $\beta$ -R soluble comprende además uno o más dominios de la proteína heteróloga.
10. El uso, de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el dominio de la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en inmunoglobulinas, albúmina sérica, lipoproteínas, apolipoproteínas y transferrina.
- 35 11. El uso de la reivindicación 1, en el que la linfotoxina- $\beta$ -R soluble comprende un dominio Fc de inmunoglobulina humana.
- 40 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6, en el que el agente bloqueante de LT- $\beta$ -R comprende un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de LT- $\beta$ .
13. El uso de la reivindicación 12, en el que la composición farmacéutica debe administrarse en una cantidad suficiente para recubrir las células positivas para el receptor de LT- $\beta$  durante aproximadamente 1 hasta aproximadamente 14 días.
- 45 14. El uso de la reivindicación 12 o 13, en el que el agente bloqueante de LT- $\beta$ -R comprende Ab anti-LT- $\beta$ -R humano BDA8 (n° de acceso de la ATCC: HB 11798).
- 50 15. El uso de la reivindicación 1, en el que el trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en Miasma gravis, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), lupus eritematoso sistémico (LES), granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa y glomerulonefritis rápidamente progresiva.
16. El uso de la reivindicación 15, en el que el trastorno autoinmune es una enfermedad inflamatoria crónica.
- 55 17. El uso de la reivindicación 16, en el que la enfermedad inflamatoria crónica es la enfermedad de Chagas o la enfermedad de Graves.
18. El uso de un receptor soluble de la linfotoxina-beta (LT $\beta$ R) que comprende un dominio de unión al ligando con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, o un fragmento funcional del mismo, fusionado a un dominio Fc de IgG1 humana en la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno autoinmune mediado por anticuerpos en humanos.
- 60 19. El uso de un receptor soluble de la linfotoxina-beta (LT $\beta$ R) que comprende un dominio de unión al ligando con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1, o un fragmento funcional del mismo, fusionado a un dominio Fc de IgG1 humana en la preparación de una composición farmacéutica para tratar el lupus eritematoso sistémico (LES) en humanos.
- 65

Figura 1

1	SQPQAVPPYA	SENQTCRDQE	KEYYEPQHRI	CCSRCPPTY	VSAKCSRIRD	50
51	TVCATCAENS	YNEHWNYLTI	CQLCRPCDPV	MGLEEIAPCT	SKRKTQCRCQ	100
101	PGMFCAAWAL	ECTHCELLSD	CPPGTEAELK	DEVGKGNHC	VPCKAGHFQN	150
151	TSSPSARCQP	HTRCENQGLV	EAAPGTAQSD	TTCKNPLEPL	PEMSGT	197

Figura 2

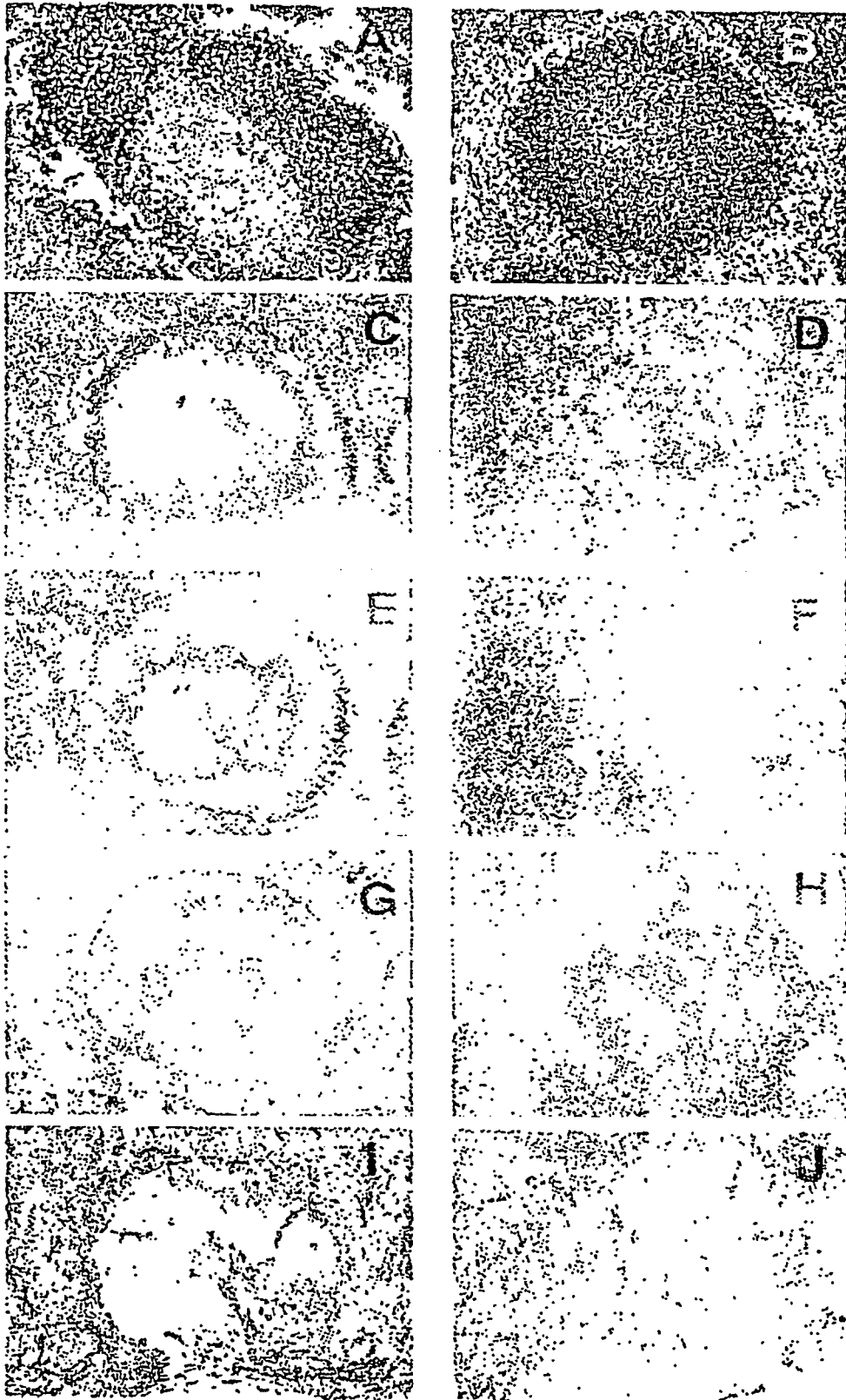


Figura 3

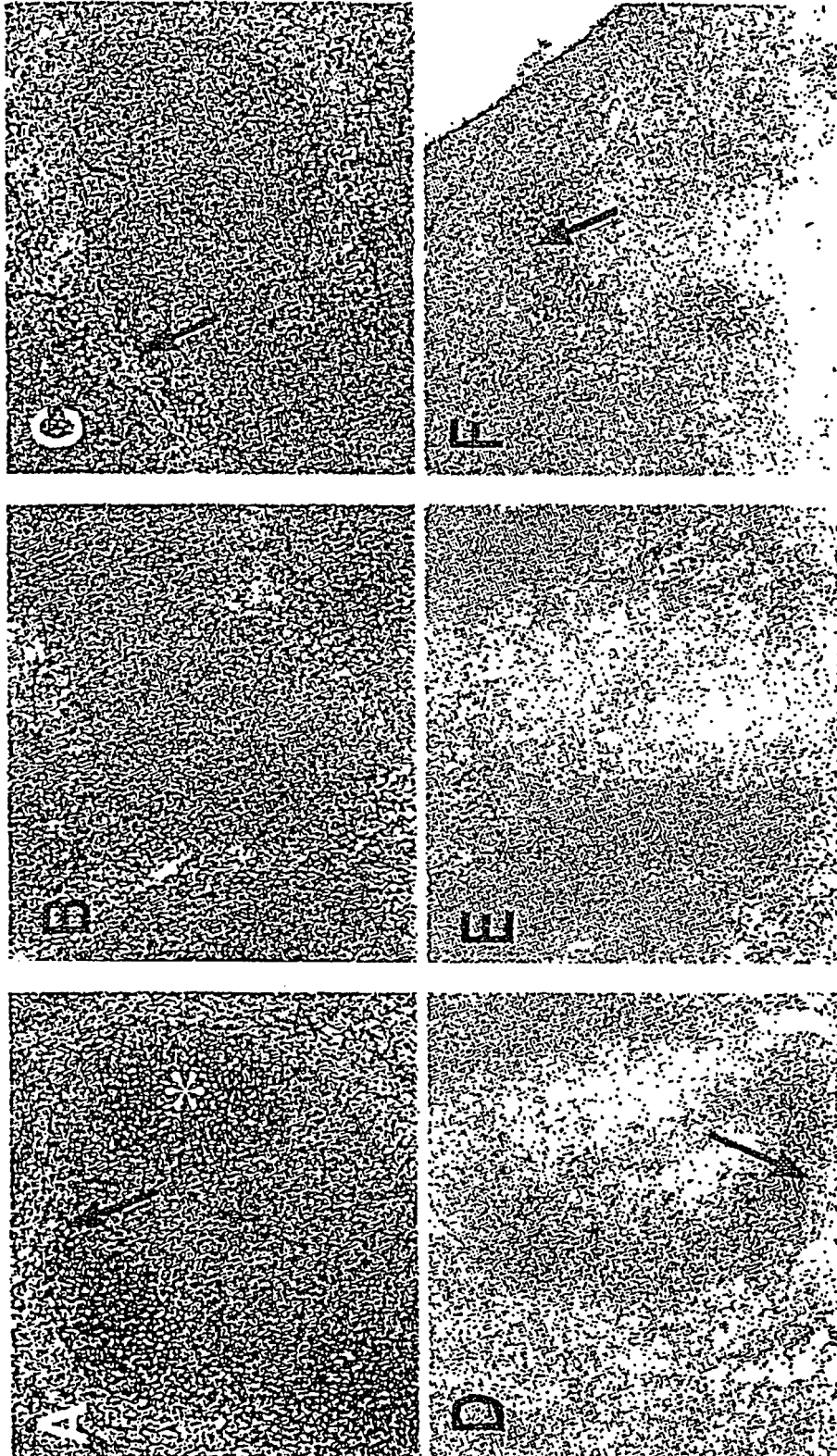


Figura 4

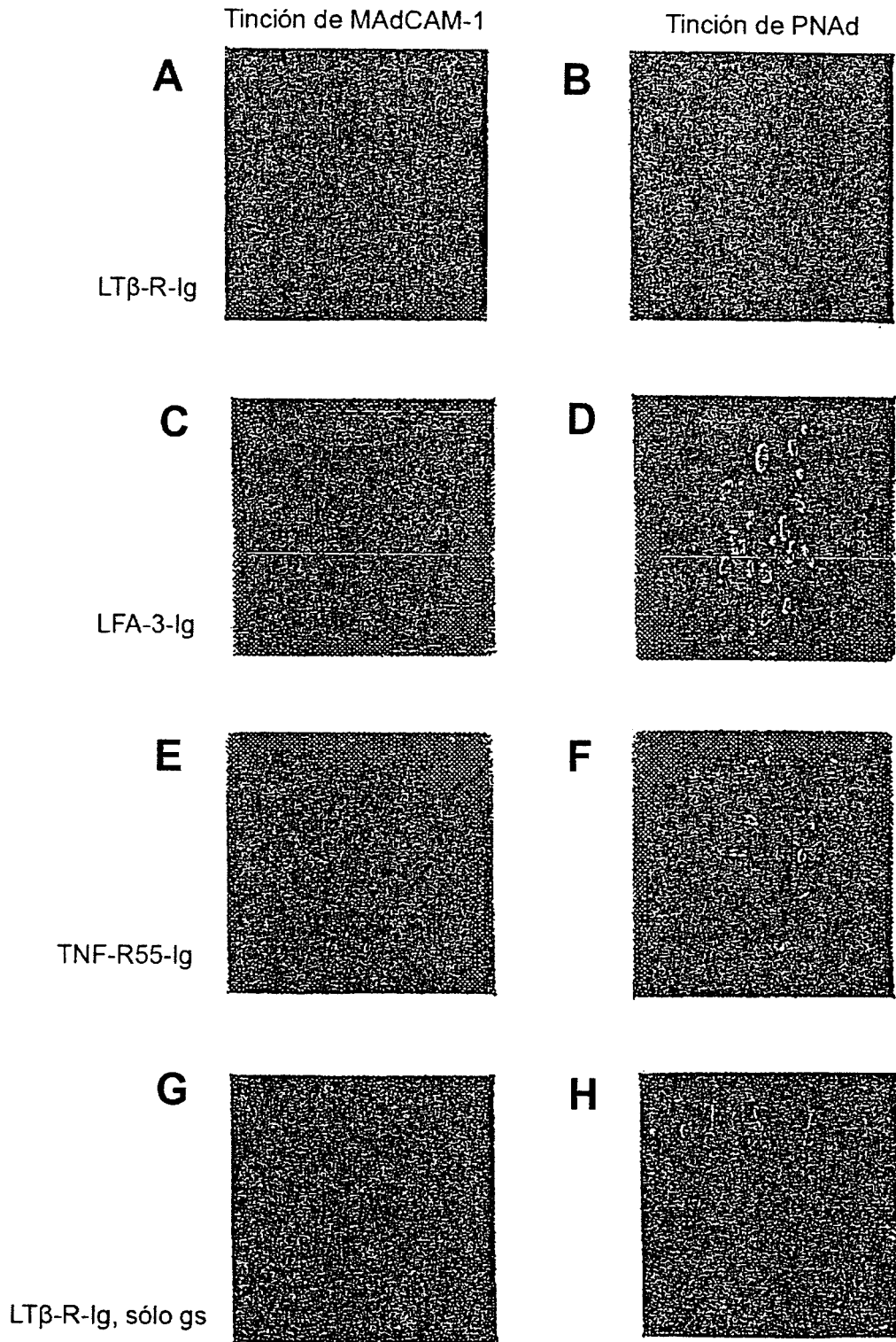


Figura 5

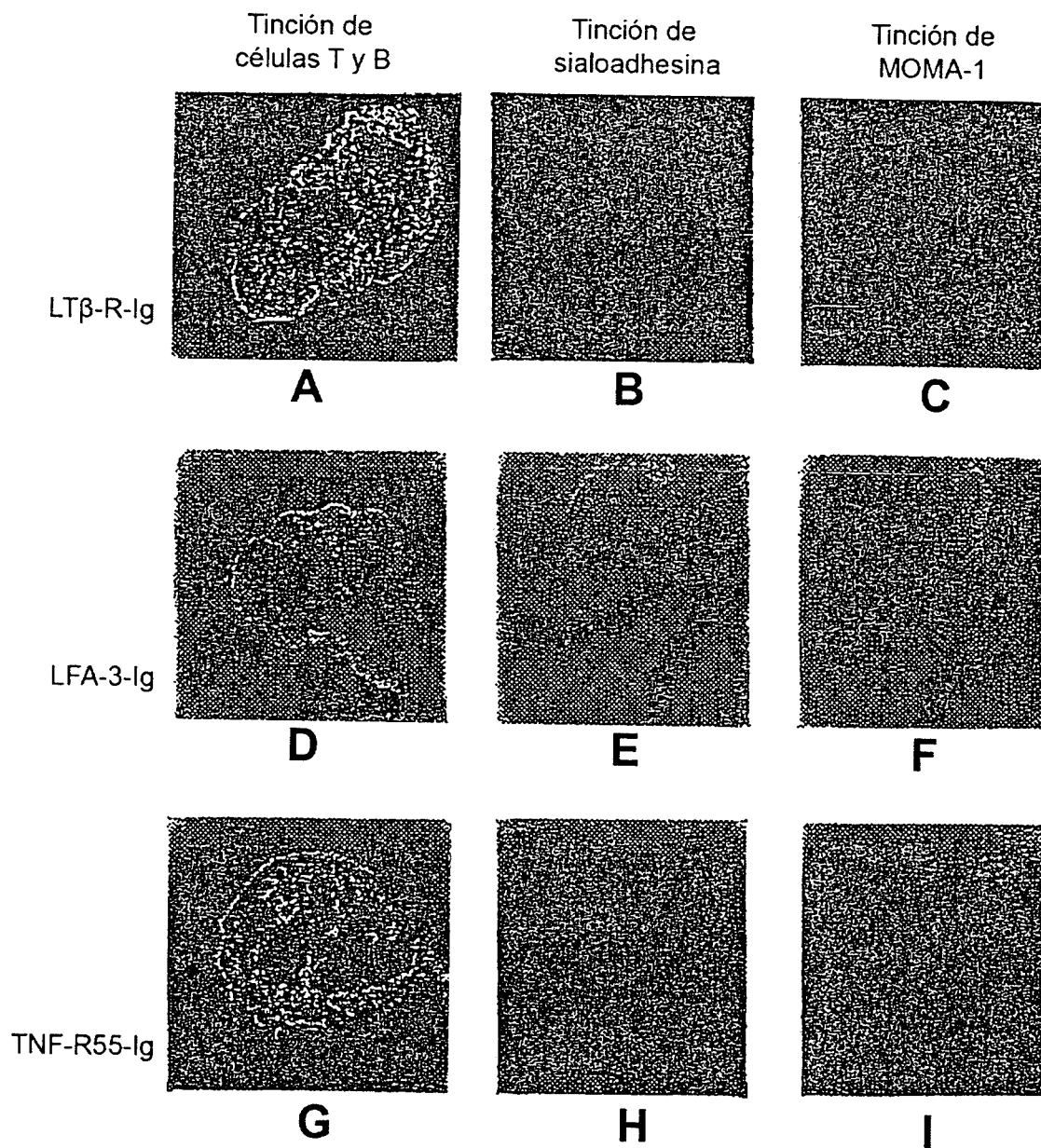
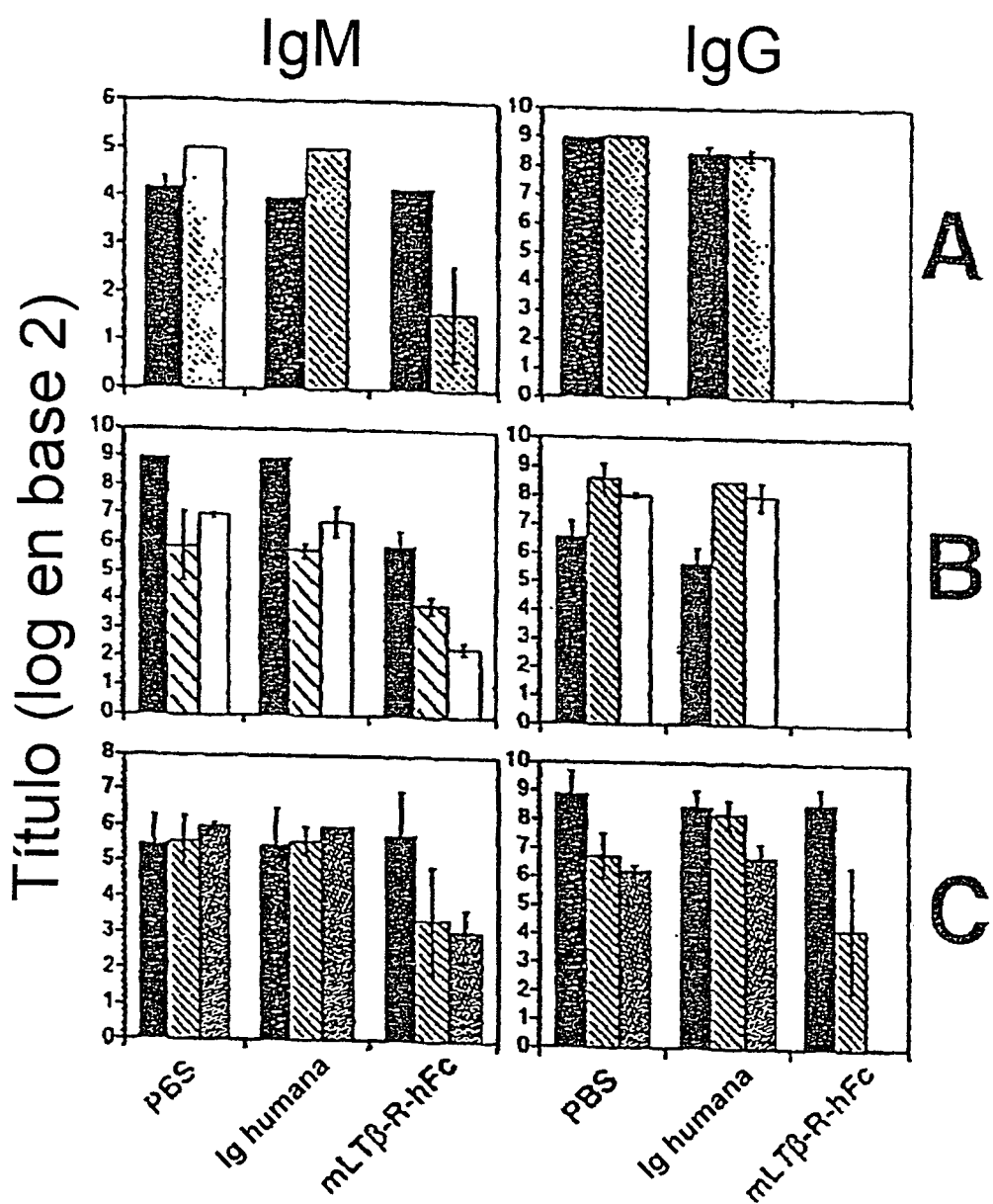


Figura 6



# Inmunocomplejos atrapados en FDC

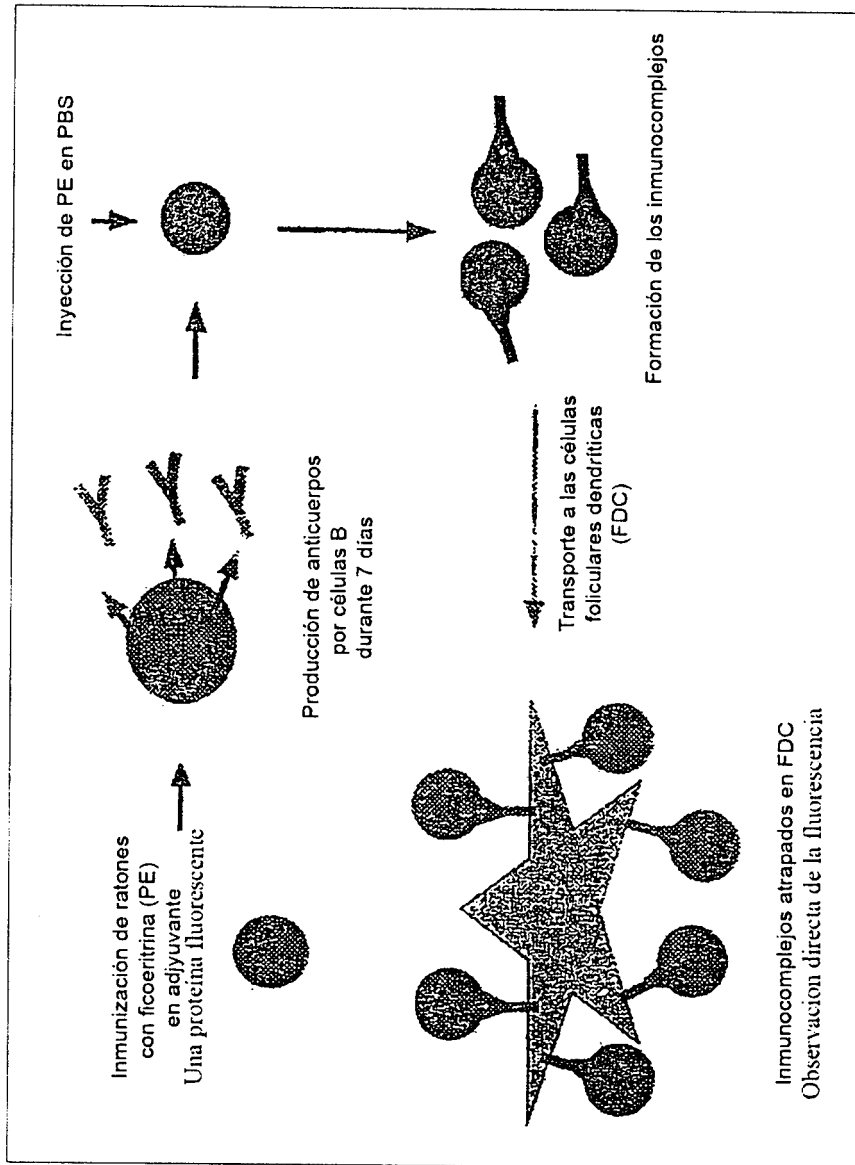


Figura 7