



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 210 225**

⑤① Int. Cl.7: **C12P 21/08**
C07K 7/06
A61K 39/395
// C12N 5/16

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **90913598 .0**

⑧⑥ Fecha de presentación: **31.08.1990**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0489837**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.1992**

⑤④ Título: **Inhibición de la adherencia de los linfocitos al endotelio vascular mediante una nueva interacción receptor de matriz extracelular-ligando.**

③⑩ Prioridad: **01.09.1989 US 402389**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2004

⑦③ Titular/es:
Fred Hutchinson Cancer Research Center
1124 Columbia Street
Seattle, Washington 98104, US

⑦② Inventor/es: **Wayner, Elizabeth**

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 210 225 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

Inhibición de la adherencia de los linfocitos al endotelio vascular mediante una nueva interacción receptor de matriz extracelular-ligando.

1. Introducción

La presente invención se refiere al uso de anticuerpos que se unen al receptor $\alpha 4\beta 1$ e inhiben la adherencia de una célula a otra, para preparar una composición farmacéutica de uso en mamíferos, destinada a la supresión de una respuesta inmune.

Está basada en el descubrimiento de que el receptor de matriz extracelular $\alpha 4\beta 1$ favorece la adherencia de los linfocitos a las células endoteliales por fijación a una secuencia definida de péptidos. En las formas de ejecución de la presente invención se pueden usar anticuerpos monoclonales para inhibir la unión de linfocitos a células endoteliales, impidiendo de esta manera la entrada de linfocitos en el tejido y suprimiendo la respuesta inmune.

2. Antecedentes de la presente invención

2.1. Receptores de matriz extracelular

Se han descrito receptores específicos de la superficie celular (R) para componentes de la matriz extracelular (ECM) tales como el colágeno, la fibronectina y la laminina (revisado por Hynes, 1987, Cell, 48:549-554; Hemler, 1988, Immunol. Today, 9:109). Las funciones de los receptores de matriz extracelular (ECMRs I, II y VI) se han definido por cromatografía de afinidad (Wayner y Carter, 1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884; Staatz y otros, 1989, J. Cell Biol., 198:1917-1924) y preparando anticuerpos monoclonales que inhiben específicamente la interacción de las células con ligandos purificados (Wayner y Carter, 1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884) o ECM (Wayner y otros, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891).

Mediante estas técnicas se ha identificado una serie de ECMRs. Con el empleo de anticuerpos monoclonales, Wayner y Carter (1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884) identificaron dos clases de receptores de la superficie celular para colágeno nativo en células de fibrosarcoma humano; la clase I participaba en la adherencia celular al colágeno, a la fibronectina y a la laminina, mientras que la clase II solo estaba implicada en la adherencia celular al colágeno nativo. Wayner y otros (1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891) identificaron unos anticuerpos monoclonales que inhiben la adherencia de células humanas al colágeno (P1H5), a la fibronectina (P1F8 o P1D6) y tanto al colágeno como a la fibronectina (P1B5); se encontró que el P1F8 y el P1D6 reaccionaban con un receptor de superficie de 140 kD conocido como ECMR VI. Kunicki y otros (1988, J. Biol. Chem. 263:4516-4519) reseñaron que el P1H5 (arriba) también inhibía específicamente la adherencia de las plaquetas humanas inactivadas a los tipos de colágeno I y III, pero no a la fibronectina. A partir de fibroblastos de embrión de pollo se aisló un complejo formado por al menos tres glucoproteínas, empleando anticuerpos monoclonales que bloquean la adherencia de las células a la fibronectina (Knudsen y otros, 1985, Exp. Cell Res. 157:218-226; Chen y otros, 1985, J. Cell Biol., 100:1103-1114), mientras que de células de mamíferos se aisló un complejo formado por dos glucoproteínas mediante cromatografía de afinidad a la vitronectina (Pytela y otros, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:5766-5770; Pytela y otros, 1986, Science 231:1559-1562). Se ha encontrado que las glucoproteínas principales de la superficie de las plaquetas, IIb y IIIa, existían en forma de complejo no covalente 1:1 en la membrana de las plaquetas (Jennings y Phillips, 1982, J. Biol. Chem. 257:10458-10463) y servían como un ECMR de fibrinógeno (Bennett y otros, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2417-2421; Marguerie y otros, 1984, Eur. J. Biochem. 139: 5-11), fibronectina (Gardner y Hynes, 1985, Cell 42:439-448; Plow y otros, 1985, Blood 66:724-727), factor de von Willebrand (Ruggeri y otros, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:6038-6041) y vitronectina (Pytela y otros, 1986, Science 231: 1559-1562).

La homología estructural es compartida por los innumerables receptores de matriz extracelular. Los ECMRs son miembros de la familia de integrinas perteneciente a las moléculas de adherencia celular y poseen subunidades únicas α complejadas con la subunidad de integrina $\beta 1$ (Hynes, 1987, Cell 48:549-554; Wayner y Carter, 1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884; Wayner y otros, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891). Otros miembros de la familia de receptores de integrina son las proteínas de adherencia a los leucocitos y los antígenos VLA. Las proteínas de adherencia a los leucocitos comprenden la LFA-1, Mac-1 y P150/95, y son glucoproteínas dímeras formadas por diferentes cadenas α y una cadena común β de 95 kDa (Kishimoto y otros, 1987, Cell 48:681-690). Los antígenos VLA se denominan así porque aparecen muy tarde en los cultivos de linfocitos T (Hemler y otros, 1984, J. Immunol. 132: 3011-3018; Hemler y otros, 1985, Eur. J. Immunol. 15:502-508). Se descubrió que los antiseros de la subunidad VLA- β bloqueaban la adherencia de las células a la fibronectina o a la laminina (Takada y otros, 1987, Nature 326:607-610). Se ha demostrado que los anticuerpos de la VLA4 inhiben la lisis de las células B causada por CTL (Takada y otros, 1989, EMBO J., 8:1361-1368).

Se han identificado interrelaciones entre estos ECMRs. El ECMR VI es igual al prototipo de receptor de fibronectina (Pytela y otros, 1985, Cell 40:191-198), al $\alpha 5\beta 1$, a la glucoproteína (gp) de plaquetas Ic/IIa y al VLA 5; el ECMR II es idéntico al $\alpha 2\beta 1$, a la glucoproteína de plaquetas Ia/IIa y al VLA 2 (Hemler y otros, 1987, J. Biol. Chem. 262:11478-11485), y el ECMR I es idéntico al $\alpha 3\beta 1$ y al VLA 3 (Kunicki y otros, 1988, J. Biol. Chem. 263:4516-4519; Takada y otros, J. Cellular Biochem., 37:385-393; Wayner y otros, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891). Los anticuerpos monoclonales de $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ (P1H5, P1D6 y P1B5) inhiben la adherencia de los fibroblastos o de

las plaquetas al colágeno, a la fibronectina y a las superficies recubiertas de laminina (Kunicki y otros, 1988, J. Biol. Chem. 107:1881-1891; Wayner y otros, 1988, arriba citado).

En la tabla I se recoge una lista de los miembros de la familia de integrinas arriba descritas y la tabla II presenta una lista de varios anticuerpos monoclonales que reconocen distintos ECMRs.

Tabla I: La familia de receptores de integrina

Receptor	Composición propuesta	Ligandos conocidos	Funciones conocidas
Complejo de integrinas de pollo	$\alpha_5\beta_1$ $\alpha_3\beta_1$	FN, LM, VN	Adherencia celular, migración celular, conexión citoesquelética
Receptor de fibronectina	$\alpha_5\beta_1$	FN	Adherencia a fibronectina
Receptor de vitronectina	$\alpha_5\beta_1$	VN	Adherencia a vitronectina
Glucoproteína 11b/111a	$\alpha_{IIb}\beta_3$	FN, FB, VN, VWF	Adherencia y agregación de plaquetas
LFA-1	$\alpha_1\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2	Adherencia de leucocitos al endotelio
MAC-1	$\alpha_m\beta_2$	C3bi	Receptor de C3b Adherencia de monocitos y leucocitos
p150/95	$\alpha_{1-6}\beta_1$	C3bi	Adherencia de neutrófilos
VLAs 1-6	$\alpha_{1-6}\beta_1$	FN, COL, LAM	Adherencia celular, migración celular y conexión citoesquelética
Epitelial	$\alpha_6\beta_4$	LAM	Adherencia epitelial
Epitelial	$\alpha_v\beta_5$	VN, FN	Adherencia de células epiteliales a VN, FN
ECMRs I, II, VI, V	$\alpha_2\beta_1$	COL, LAM	Adherencia a COL, LM
	$\alpha_3\beta_1$	COL, LM, FN	Adherencia a COL, LM, FN
	$\alpha_4\beta_1$		Anteriormente desconocido
	$\alpha_5\beta_1$	FN	Adherencia a FN

ES 2 210 225 T3

TABLA II
Anticuerpos anti-ECMR

Anticuerpo	Receptor	Ligando	Referencia
P1H5	$\alpha_2\beta_1$	Colágeno Laminina	(Wayner y otros, 1987, J. Cell Biol., <u>105</u> :1873-1884; Wayner y otros, 1988, J. Cell Biol., <u>107</u> :1881-1891)
P1B5	$\alpha_3\beta_1$	Colágeno Fibronectina	(Wayner y otros, 1987, J. Cell Biol., <u>105</u> :1873-1884)
P4C2	$\alpha_4\beta_1$	Fibronectina (CS-1)	
P1D6	$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina (Arg-Gly-Asp-Ser)	(Wayner y otros, 1987, J. Cell Biol., <u>105</u> :1873-1884)
P4C10	β_1	FN, COL, LAM	
P4119	β_2 (Cd18)		

Las integrinas β_1 están diferencialmente expresadas en las células cultivadas y en el tejido, y muestran diferencias claras en la expresión dependiente de la activación. Así por ejemplo, la expresión del $\alpha_5\beta_1$ en las células hematopoyéticas está restringida a subpoblaciones de timocitos y linfocitos de la sangre periférica, a monocitos, a leucemias linfáticas o mieloides agudas, a células T activadas, a células precursoras hemopoyéticas migradoras y a algunas líneas de células T, B o eritroleucémicas cultivadas (Bernardi y otros, 1987, J. Cell Biol., 105:489-498; Cardarelli y otros, 1988, J. Cell Biol., 106:2183-2190; García Pardo y otros, 1989, Exp. Cell Res., 181:420-431; Giancotti y otros, 1986, J. Cell Biol., 103:429-437; Liao y otros, 1987, Exp. Cell Res., 171:306-320; Wayner y otros, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891).

2.2. Fibronectina

La fibronectina es una proteína que se encuentra en la matriz extracelular, así como en el plasma y en la superficie de determinadas clases de células (Akiyama y Yamada, 1987, Adv. Enzymol., 59:1-57). En el plasma, la fibronectina existe como una glucoproteína heterodímera formada por dos subunidades similares (llamadas cadena A y B), cada una de las cuales tiene un peso molecular de aproximadamente 220 kDa (Akiyama y Yamada, 1987, Adv. Enzymol., 59:1-57; Erickson y otros, 1981, J. Cell Biol., 91:673-678). Varios dominios intramoleculares especializados (Ruoslahti y otros, 1981, J. Biol. Chem., 256: 7277-7281) de la molécula de fibronectina se pueden cortar en fragmentos que a su vez son capaces de interactuar con colágeno, fibrina, heparina y superficies celulares, de manera análoga a la molécula intacta (Hynes y Yamada, 1982, J. Cell Biol., 95:369-377).

Los heterodímeros celulares y plasmáticos de fibronectina comprenden polipéptidos similares pero no idénticos. La variabilidad estructural de las subunidades de fibronectina proviene de alteraciones en la secuencia primaria del mRNA de la fibronectina, debidas a empalmes alternativos en al menos 2 regiones del pre-mRNA de la fibronectina (las regiones ED y IIICS).

La fibronectina es capaz de promover la adherencia de muchos tipos de células, como por ejemplo fibroblastos

(Grinell y otros, 1977, *Exp. Cell Res.*, 110:175-210), macrófagos (Bevilacqua y otros, 1981, *J. Exp. Med.*, 153:42-60), leucocitos polimorfonucleares (Marino y otros, 1985, *J. Lab. Clin. Med.*, 105:725-730), plaquetas (Kotliansky y otros, 1981, *Fed. Euro. Biochem. Soc.*, 123:59-62) y queratinocitos (Clark y otros, 1985, *J. Invest. Dermatol.*, 84:378-383), por citar unos cuantos (Liao y otros, 1989, *Exp. Cell Res.*, 181:348-361). La interacción entre la fibronectina y una proteína de la superficie celular con un peso molecular de aproximadamente 140 kDa se ha observado en fibroblastos (Brown y Juliano, 1985, *Science* 228:1448-1451; Akiyama y otros, 1986, *J. Cell Biol.*, 102:442-448; Brown y Juliano, 1986, *J. Cell Biol.*, 103:1595-1603; Wylie y otros, 1979, *J. Cell Biol.*, 80:385-402), células endoteliales (Plow y otros, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:6002-6006), células linfoides (Brown y Juliano, 1986, *J. Cell Biol.*, 103:1595-1603), plaquetas (Pytela y otros, 1986, *Science* 228:1559-1562; Gardner y Hynes, 1985, *Cell* 42:439-448), células musculares (Horowitz y otros, 1985, *J. Cell Biol.*, 101:2134-2144; Dambsky y otros, 1985, *J. Cell Biol.*, 100:1528-1539; Chapman, 1984, *J. Cell Biochem.*, 259:109-121) y células de osteosarcoma (Pytela y otros, 1985, *Cell* 40:191-198).

La unión de la fibronectina a las superficies celulares puede ser inhibida por la competencia de fragmentos de fibronectina (Akiyama y otros, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260:13256-13260). Usando péptidos sintéticos, una secuencia de lo que se creía que era solamente el lugar mínimo de reconocimiento celular fue identificada como el tetrapéptido Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984, *Nature* 309:30-33; Pierschbacher y otros, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:1224-1227; Pierschbacher y otros, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:5985-5988; Akiyama y otros, 1985, *J. Cell Biol.*, 102:442-448; Patente de Estados Unidos 4,578,079). La secuencia RGDS presente en el dominio de "unión celular" de la fibronectina es el ligando para el prototipo de receptor de la fibronectina, descrito por Pytela y otros (1985, *Cell* 40:191-198).

Varias observaciones indicaban que aparte del RGDS hay otras regiones que pueden fijar la fibronectina (Humphries y otros, 1986, *J. Cell. Biol.*, 103:2637-2647). Por ejemplo, se encontró que los péptidos sintéticos tenían una afinidad para la unión sustancialmente menor que la de los fragmentos más grandes o que la de la fibronectina intacta (Akiyama y otros, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260:10402-10405; Akiyama y otros, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260:13256-13260). McCarthy y otros (1986, *J. Cell Biol.*, 102:179-188) informaron de la afinidad de unión entre un fragmento de 33 kDa de fibronectina plasmática y células tumorales de melanoma B16-F10. Bernardi y otros (1987, *J. Cell Biol.*, 105:489-498) reportaron que las células precursoras linfoides se adherían a dos lugares diferentes de la fibronectina; la línea de células BaF3 interactuaba con el dominio de unión RGD, mientras que la línea de células PD31 parecía interactuar con un dominio distinto, localizado en el segmento carboxi-terminal y asociado con una gran afinidad de unión para la heparina.

Humphries y otros (1986, *J. Cell. Biol.*, 103:2637-2647) compararon la capacidad de fragmentos de fibronectina para formar interacciones adherentes con células de melanoma o con células fibroblásticas. Se observó que las células fibroblásticas BHK se extendían rápidamente sobre un fragmento de 75 kDa correspondiente al dominio de unión celular que contiene el RGDS, mientras que, aparentemente, las células de melanoma B16-F10 no se extendían sobre el fragmento de 75 kDa, sino sobre un fragmento de 113 kDa procedente de la porción de la fibronectina que contiene la región diferencial tipo III con el segmento conector (CS), o región V (en la que pueden tener lugar empalmes alternativos del mRNA). En esta región IIICS, situada cerca del extremo carboxílico de la fibronectina, la secuencia Arg-Glu-Asp-Val (REDV) parecía poseer importancia funcional. Humphries y otros (1987, *J. Biol. Chem.*, 262:6886-6892) estudiaron una serie de péptidos sintéticos solapados, extendidos por toda la región IIICS. Se vio que dos péptidos adyacentes, CS1 y CS5, competían para inhibir la adherencia de la fibronectina a las células de melanoma, pero no a las fibroblásticas, y que el CS1 mostraba mayor acción inhibitoria que el CS5. Liao y otros (1989, *Exp. Cell Res.*, 181:348-361) reportaron que las MOPC 315, células linfoides secretoras de IgA, además de fijarse al dominio de unión celular mediante una interacción de RGD, se unen preferentemente al dominio de unión carboxi-terminal de la heparina mediante un mecanismo independiente del RGD. Sin embargo no se ha(n) identificado la(s) secuencia(s) adherentes de las regiones carboxi-terminales de la fibronectina, ni el receptor o receptores de la superficie celular responsables de la adherencia de las células a dichas secuencias adherentes.

2.3. Funciones biológicas de las moléculas de adhesión celular

Se ha comprobado que las interacciones adherentes entre células ocurren durante muchos sucesos biológicos importantes, incluyendo la diferenciación, crecimiento y desarrollo de los tejidos, y también parecen jugar un papel crítico en la patogénesis de diversas enfermedades (Humphries y otros, 1986, *J. Cell Biol.*, 103:2637-2647; Grinnell, 1984, *J. Cell Biochem.*, 26: 107-116; Hynes, 1986, *Sci. Am.*, 254:42-51).

Se sabe, por ejemplo, que las interacciones adherentes son extremadamente importantes para el sistema inmune, porque la localización de células inmuno-mediadoras se debe probablemente, al menos en parte, a interacciones adherentes entre células. La recirculación de células linfoides no es aleatoria (Male y otros, en "Advanced Immunology", J. B. Lippincott Co., Philadelphia, p. 14.4-14.5); los linfocitos muestran preferencia por el tipo de órgano linfoide secundario en el que van a entrar. Al circular a través de un órgano linfoide secundario, los linfocitos deben fijarse primero al endotelio vascular en las vénulas postcapilares apropiadas, luego abrir las apretadas uniones entre las células endoteliales y finalmente migrar al tejido subyacente. La migración de los linfocitos recirculantes desde la sangre hacia tejidos linfoides específicos, denominada retorno, se ha asociado con moléculas de adherencia complementaria a la superficie de los linfocitos y a las células endoteliales de las vénulas endoteliales superiores. Según un estudio, los anticuerpos de un receptor de linfocitos múridos (LPAM-1) inhibieron el retorno de los linfocitos a HEV de placas de Peyer (Holzmann y otros, 1989, *Cell*, 56:37-46).

Se cree igualmente que la adherencia de los leucocitos polimorfonucleares al endotelio vascular es un acontecimiento clave en el desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda, y parece ser necesaria para una respuesta quimio-táctica eficaz, así como para ciertos tipos de lesión vascular en que intervengan neutrófilos (Zimmerman y McIntyre, 1988, *J. Clin. Invest.*, 81: 531-537; Harlan y otros, 1987, en "Emigración de leucocitos y sus secuelas", Movat, ed. S. Karger AG, Basel, págs. 94-104; Zimmerman y otros, *ibid.*, págs. 105-118). Al estimularlos con sustancias agonistas específicas, los leucocitos polimorfonucleares (Tonnensen y otros, 1984, *J. Clin. Invest.*, 74:1581-1592), las células endoteliales (Zimmerman y otros, 1985, *J. Clin. Invest.*, 76:2235-2246; Bevilacqua y otros, *J. Clin. Invest.*, 76:2003-2011), o ambos (Gamble y otros, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8667-8671) se vuelven adherentes; como resultado, los leucocitos polimorfonucleares se acumulan en la superficie de las células endoteliales.

Además, los estudios realizados con anticuerpos específicos anti-glucoproteína en pacientes con un déficit inmunológico demostraron que se requiere uno o más componentes del complejo CD18 para la quimiotaxis neutrófila efectiva y otras funciones (Zimmerman y McIntyre, 1988, *J. Clin. Invest.*, 81:531-537). El complejo CD18 es idéntico a la subfamilia de integrinas β_2 (antes citada).

Durante su maduración y diferenciación, las subpoblaciones de linfocitos se localizan en distintas partes anatómicas; por ejemplo, las células T inmaduras se localizan en el timo. De manera análoga se observa que las células B productoras de IgA se localizan en la mucosa intestinal (Parrot, 1976, *Clin. Gastroenterol.*, 5:211-228). En cambio, las células B productoras de IgG se localizan principalmente en los ganglios linfáticos, que secretan la IgG al sistema circulatorio (Parrot y de Sousa, 1966, *Nature*, 212:1316-1317). Las células T parecen ser más abundantes en la epidermis que en las láminas de mucosa (Cahill y otros, 1977, *J. Exp. Med.*, 145:420-428).

La importancia fisiológica de las proteínas de adhesión a los leucocitos (antes mencionada) se pone de manifiesto por la existencia de una enfermedad genética humana, la carencia de fijación de los leucocitos (LAD; Anderson y otros, 1985, *J. Infect. Dis.*, 152:668; Arnaout y otros, 1985, *Fed. Proc.*, 44:2664). Varios estudios han indicado que el defecto molecular relacionado con la LAD tiene como consecuencia la falta de síntesis de la cadena común β o un nivel normal de síntesis, seguido de una rápida degradación (Liowska-Groszpiere y otros, 1986, *Eur. J. Immunol.*, 16:205; Diamanche y otros, 1987, *Eur. J. Immunol.*, 17:417). En la forma grave de la LAD, ni la LFA-1, ni la Mac-1 ni la P150/95 se expresan en la membrana de los leucocitos, y en los pacientes que sufren esta enfermedad de forma moderada se han observado bajos niveles de expresión en la membrana de los leucocitos, lo cual conlleva una movilización defectuosa de los leucocitos polimorfonucleares y de los monocitos, desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos durante la respuesta inflamatoria, con la consecuente aparición de infecciones bacterianas recurrentes (Anderson y otros, 1985, *J. Infect. Dis.*, 152:668; Arnaout y otros, 1985, *Fed. Proc.*, 44:2664).

Asimismo, se ha visto que los ECMRs están relacionados con otras funciones ajenas al sistema inmune. La pérdida del complejo glucoproteínico IIb/IIIa de la superficie de las plaquetas parece ser la causa de su funcionamiento defectuoso en una enfermedad genética llamada trombostenia de Glanzmann (Hynes, 1987, *Cell* 48:549-554). Humphries y otros (1988, *J. Cell Biol.*, 106:1289-1297) observaron que las neuronas del sistema nervioso periférico eran capaces de extender las neuritas sobre substratos que llevan tanto el dominio central de unión celular como la región IIIcS de la fibronectina. Además hemos demostrado recientemente que la formación de neuritas sobre la laminina o fibronectina puede ser inhibida por anticuerpos de los ECMRs.

3. Resumen de la presente invención

La presente invención se refiere al empleo de un anticuerpo o de un fragmento o derivado del mismo que se une al receptor $\alpha 4\beta 1$, inhibiendo la adherencia de células hematopoyéticas nucleadas a las células del endotelio vascular, para preparar una composición farmacéutica de uso en mamíferos, destinada a la supresión de una respuesta inmune. El anticuerpo, o el fragmento o derivado del mismo, interfiere en la interacción entre el receptor de la matriz extracelular y su ligando.

La presente invención está basada en el descubrimiento de que el receptor de matriz extracelular $\alpha 4\beta 1$ favorece la adherencia de los linfocitos a las células endoteliales por fijación a una secuencia definida de péptidos. Antes de la presente invención, ni se había identificado el ligando del receptor $\alpha 4\beta 1$ ni se conocía la función del receptor $\alpha 4\beta 1$ en la fijación de linfocitos. Impidiendo la interacción entre el receptor $\alpha 4\beta 1$ y su ligando por medio de anticuerpos, la presente invención permite por primera vez intervenir específicamente en la migración de linfocitos a través del endotelio vascular y hacia los tejidos. Por tanto, la presente invención tiene una utilidad clínica notable en la supresión de la respuesta inmune; en algunas formas específicas de ejecución de la presente invención, la adherencia de los linfocitos al endotelio se puede inhibir sistemáticamente o bien se puede limitar a determinados tejidos o áreas circunscritas. En consecuencia, la presente invención proporciona tratamiento para enfermedades que llevan implícitas respuestas autoinmunes u otras activaciones crónicas o recidivantes del sistema inmune, incluyendo alergia, asma y estados inflamatorios crónicos de la piel.

3.1. Abreviaturas

Las secuencias de péptidos aquí definidas están representadas con símbolos de una letra para los radicales de los aminoácidos, del modo siguiente:

A (alanina), R (arginina), N (asparagina), D (ácido aspártico), C (cisteína), Q (glutamina), E (ácido glutámico), G

(glicina), H (histidina), I (isoleucina), L (leucina), K (lisina), M (metionina), F (fenilalanina), P (prolina), S (serina), T (treonina), W (triptófano), Y (tirosina), V (valina).

4. Descripción de las figuras

5

Figura 1. Adherencia de linfocitos T (Molt 4) y células K562-1, RD o HT1080 a la fibronectina plasmática, inhibición con anticuerpo monoclonal P1D6 y expresión del $\alpha 5\beta 1$ en la superficie celular.

10 Se incubaron células marcadas con ^{51}Cr (10^5 células/ml) con anticuerpo monoclonal P1D6 ($50 \mu\text{g/ml}$) durante 60 minutos a 4°C y se dejó que se fijaran a unas superficies de plástico recubiertas de fibronectina ($20 \mu\text{g/ml}$), en presencia de P1D6 (barras negras) o de IgG de ratón (barras blancas), durante 30 minutos (HT1080 o RD) o 4 horas (Molt 4 o K562) a 37°C . La adhesión a la fibronectina plasmática (pFN) está expresada en cpm de ^{51}Cr unido a las superficies de plástico. La expresión del $\alpha 5\beta 1$ en la superficie celular se determinó por citometría de flujo, tiñendo las células en suspensión con anticuerpo monoclonal P1D6. El log de la intensidad de fluorescencia del P1D6 (barras rayadas) está expresado como el número medio de canales (0-255) sobre el fondo.

Figura 2. Precipitación inmune del receptor linfocitario de fibronectina, partiendo de extractos con detergente de células HT1080, Molt 4, o T activadas crónicamente con CD8+ (LAK).

20 Células Molt 4, LAK o HT1080 marcadas con ^{125}I se extrajeron con Triton[®] X-100 al 1%, en presencia de fenilmetil-sulfonilfluoruro (1 mM), N-etilmaleimida (1 mM), leupeptina ($1 \mu\text{g/ml}$) y diisopropil-fluorofosfato (1 mM) como inhibidores de proteasa. Unos alícuotas de estos extractos se sometieron a precipitación inmune con anticuerpos monoclonales dirigidos contra $\alpha 3\beta 1$ (P1B5), $\alpha 2\beta 1$ (P1H5) y $\alpha 4\beta 1$ (P3E30). Los antígenos obtenidos por precipitación inmune se cromatografiaron sobre geles SDS-PAGE al 7,5% en ausencia de 2-ME y se visualizaron por autorradiografía. Se señalan las tres bandas resultantes de la precipitación inmune con P3E3 a partir de linfocitos T (flechas).

25

Figura 3. Identificación del receptor linfocitario específico de la fibronectina como la Integrina $\alpha 4\beta 1$.

30 Células Jurkat marcadas en superficie con ^{125}I se extrajeron con CHAPS al 0,3% en presencia de CaCl_2 1 mM, diisopropil-fluorofosfato 1 mM, fenil-metil-sulfonilfluoruro 1 mM, N-etilmaleimida 1 mM, $1 \mu\text{g/ml}$ de leupeptina y $2 \mu\text{g/ml}$ de inhibidor de tripsina de la soja. Unos alícuotas de los extractos se sometieron luego a precipitación inmune con sobrenadante de cultivos de mieloma (SP2) o con anticuerpos monoclonales P3E3, P4C2, P4G9 o con P1D6 (anti- $\alpha 5\beta 1$). Los precipitados inmunes se cromatografiaron en geles SDS-PAGE al 8% en ausencia de agente reductor y se visualizaron por autorradiografía. A la izquierda figuran unos marcadores del peso molecular. Se señalan las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ porque son las bandas presentes en los precipitados inmunes preparados con P3E3, P4C2 y P4G9 (flechas).

35

Figura 4. Localización de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ en adhesiones focales a superficies recubiertas de fibronectina.

40 Se tripsinizaron células RD, dejando que se adhirieran sobre cubreobjetos silanizados y recubiertos de fibronectina ($20 \mu\text{g/ml}$), en ausencia de suero, durante 1 hora a 37°C . Transcurrido este tiempo, las células estaban preparadas para la localización de receptores en adhesiones focales tal como está descrito (Procedimientos experimentales). Los paneles A y C muestran adhesiones focales (flechas) que se visualizan mediante microscopia de reflexión-interferencia, al adherirse las células RD a la fibronectina. El panel B muestra la reorganización del receptor prototipo de RGD de la fibronectina, $\alpha 5\beta 1$, teñido con anticuerpo AB33, para las adhesiones focales (flechas). El panel D demuestra la reorganización del $\alpha 4\beta 1$ teñido con P4G9 (FITC), también para las adhesiones focales, al adherirse las células RD a la fibronectina (flechas). Los paneles A y B son el mismo campo y los paneles C y D son el mismo campo.

45

Figura 5A. Estructura del dominio de la fibronectina de plasma humano (pFN), que muestra el origen de los fragmentos usados en este estudio. B. Análisis cromatográfico sobre gel SDS-PAGE (acrilamida al 10%) que demuestra la pureza de los fragmentos.

50

El fragmento de 80 kDa tenía la secuencia N-terminal de aminoácidos SD(VPSPR)(LQF y, por consiguiente, empieza en la posición 874 de la molécula de fibronectina (Kornbliht y otros, 1985, EMBO J. 4:1755-1759). Este fragmento contiene el dominio de unión celular y la secuencia RGDS de la fibronectina (*). Los fragmentos de 58 kDa y 38 kDa tenían la secuencia N-terminal de aminoácidos TAGPDQTEMTIEGLQ. Ambos fragmentos contienen el dominio C-terminal de unión a la heparina (Hep II) y son el resultado de una distinta fragmentación con tripsina de las dos cadenas de la fibronectina. El fragmento de 38 kDa comprende los primeros 67 restos de aminoácidos del segmento conector de fibronectina empalmado alternativamente (IIICS) (García-Pardo, 1987, Biochem. J., 241:923-928) y por tanto procede de la cadena A. El fragmento de 38 kDa no contiene el lugar de adherencia REDV reconocido por las células de melanoma B16-F10 (Humphries y otros, 1986, antes citado; Humphries y otros, 1987, arriba mencionado). El fragmento de 58 kDa procede a su vez de la cadena B de la fibronectina y carece de la región IIICS (García-Pardo y otros, 1989, EMBO J., presentación). El fragmento de 58 kDa también contiene el dominio C-terminal de la fibronectina que se une a la fibrina (Fib II) y se parece a otros fragmentos de esta región de la fibronectina plasmática antes mencionados (Click, E. M., y Balian, G. 1985, Biochem., 24:6685-6696). Las bandas se visualizan con una tinción de plata.

65

ES 2 210 225 T3

Figura 6. Adherencia de células hematopoyéticas a la fibronectina plasmática y a los fragmentos trípticos purificados de 38 kDa y 80 kDa de la fibronectina plasmática.

Se dejó que células tipo K562 (eritroleucemia), Jurkat (linfocito T CD3+) e YT (linfocito T CD3-) marcadas con ^{51}Cr (10^5 /pocillo) se adhirieran a superficies de plástico recubiertas con fibronectina plasmática intacta (pFN) o con los fragmentos trípticos purificados de 80 kDa y 38 kDa, durante 2 horas a 37°C en las concentraciones indicadas. Pasado este tiempo, las células no adheridas se eliminaron por lavado y las células fijadas se disolvieron en SDS/NaOH y se cuantificaron. Los resultados están expresados en cpm de ^{51}Cr unido.

Figura 7. Efecto de los anticuerpos monoclonales P1D6 y P4C2 de los receptores de integrina $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ (respectivamente) en la adherencia de los linfocitos T a la fibronectina plasmática intacta (pFN) o a los fragmentos trípticos purificados de 80 kDa y 38 kDa.

Células Molt 4 marcadas con ^{51}Cr se incubaron durante 1 hora a 4°C con anticuerpos monoclonales P1D6 o P4C2 purificados ($50 \mu\text{g/ml}$) o IgG purificado de ratón ($50 \mu\text{g/ml}$). Después se dejaron adherir a superficies de plástico, recubiertas con fibronectina plasmática intacta o con los fragmentos trípticos purificados de 80 kDa y 38 kDa, durante 1 hora a las concentraciones indicadas. Transcurrido este tiempo, las células no adheridas se eliminaron por lavado y las células fijadas se disolvieron. El ^{51}Cr fijado se midió en un contador gamma. Los resultados están expresados en cpm unidos.

Figura 8. Efecto del péptido CS-1 B12 en la adherencia de los linfocitos T a células HUVE activadas con IL- 1β .

Figura 9.

(a) Diagrama de las regiones IIICS y CS-1.

(b) Secuencia de aminoácidos de CS-1, A13 y B12.

5. Descripción detallada de la presente invención

En experimentos diseñados para examinar la función del $\alpha 5\beta 1$ en los linfocitos se observó que la sangre periférica en reposo y los linfocitos T cultivados (Molt 4 o Jurkat) expresaban una afinidad por la fibronectina, independiente del receptor prototipo de fibronectina $\alpha 5\beta 1$. A pesar de fijarse a las superficies recubiertas con fibronectina, estas células expresaron niveles bajos o indetectables de $\alpha 5\beta 1$ reconocido por el anticuerpo monoclonal P1D6, definido funcionalmente (Wayner y otros, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891). Además, la adherencia de los linfocitos T a la fibronectina solo pudo inhibirse parcialmente con P1D6 o péptidos que contenían RGD, lo cual sugería la implicación de otros receptores en el proceso de adhesión. En cambio, la adherencia de otras células a la fibronectina, tales como fibroblastos malignos o transformados y linfocitos T activados (células LAK), se pudo inhibir completamente con P1D6. Ello indicaba que los linfocitos T de sangre periférica en reposo y las células leucémicas T cultivadas expresaban múltiples receptores de fibronectina independientes y funcionales.

Según la presente invención, se identificó un receptor de fibronectina alternativo, preparando anticuerpos monoclonales que inhibían específicamente la adherencia de los linfocitos T, pero no de otras células, a la fibronectina. Este receptor era idéntico al receptor de integrina $\alpha 4\beta 1$ e intervenía en la fijación a la fibronectina plasmática de linfocitos de sangre periférica, líneas de células T cultivadas y células RD. Asimismo, los linfocitos T expresaban una clara preferencia por un fragmento tríptico de 38 kDa de la fibronectina plasmática (García-Pardo y otros, 1987, Biochem. J., 241:923-928) que contiene el dominio de la heparina II y 67 restos de aminoácidos del segmento conector tipo III (IIICS) extendidos por las regiones CS-1, CS-2 y CS-3 definidas por Humphries y otros (1986, J. Cell Biol., 103:2637-2647; Humphries y otros, 1986, J. Biol. Chem., 262:6886-6892). Según la presente invención, se descubrió que los linfocitos T solo se fijaban a la CS-1 y que los anticuerpos monoclonales del $\alpha 4\beta 1$ (P3E3, P4C2, P4G9) inhibían completamente la adherencia de los linfocitos T al fragmento de 38 kDa y a la CS-1. También se encontró que los linfocitos T se fijaban (con mucha menor afinidad) a un lugar presente en el dominio de la heparina II y que los anticuerpos monoclonales del $\alpha 4\beta 1$ inhibían igualmente dicha interacción. Los anticuerpos monoclonales funcionalmente definidos del $\alpha 4\beta 1$ no inhibieron la adherencia de los linfocitos T a un fragmento tríptico de 80 kDa de fibronectina plasmática que contenía la secuencia RGD, mientras que los anticuerpos del $\alpha 5\beta 1$ (el receptor prototipo de fibronectina) inhibía completamente esta interacción.

La presente invención se refiere asimismo al descubrimiento de que el receptor $\alpha 4\beta 1$ media en la interacción entre los linfocitos y las células endoteliales. Según la presente invención se pueden usar anticuerpos para bloquear la adherencia de los linfocitos a las células endoteliales.

Por razones de claridad en la exposición y no de manera limitativa, la presente invención se describirá en las subsecciones siguientes.

- i) Preparación de anticuerpos contra receptores de la matriz extracelular (ECMRs);
- ii) Análisis de la interacción ECMR-ligando;

iii) Métodos de intervención en la adherencia celular;

iv) Utilidad de la presente invención; y

5 v) Anticuerpos de la presente invención.

5.1. Preparación de anticuerpos contra los receptores de matriz extracelular

10 La preparación de anticuerpos contra receptores de matriz extracelular se puede realizar empleando cualquier método de generación de anticuerpos conocido del estado técnico actual. Como inmunógeno se pueden utilizar células intactas o receptor de matriz extracelular (ECMR) purificado. La inmunización de un huésped se realiza preferentemente mediante un inmunógeno obtenido de una fuente xenógena. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales.

15 Para la producción de anticuerpos policlonales contra los epítomos de un determinado ECMR se pueden emplear varios procedimientos conocidos del estado técnico. Para la producción de anticuerpo se pueden inmunizar varios animales huésped mediante la inyección de una proteína ECMR, una proteína sintética o un fragmento de ella, o bien, como alternativa, empleando células intactas. Para aumentar la respuesta inmunológica se pueden usar diversos adyuvantes, según la clase de huésped, incluyendo, sin limitarse a los del tipo Freund (completos e incompletos), geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas como lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente
20 útiles como BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y el *Corynebacterium parvulum*.

Se puede preparar un anticuerpo monoclonal contra un epítomo de un ECMR usando una técnica adecuada para producir moléculas de anticuerpo mediante líneas continuas de cultivo celular, incluyendo, sin limitarse a ellas, las técnicas de los hibridomas descritas originalmente por Kohler y Milstein (1975, Nature 256:495-497) y Taggart y Samloff (1983, Science 219:1228-1230), la técnica más reciente del hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros, 1983, Inmunología hoy 4:72) y la técnica del hibridoma-EBV (Cole y otros, 1985, Anticuerpos monoclonales y terapia del cáncer, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).
25

30 Los anticuerpos monoclonales de uso terapéutico pueden ser humanos o quiméricos de humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse según cualquiera de las numerosas técnicas actualmente conocidas (p.ej. Teng y otros, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:7308-7312; Kozbor y otros, 1983, Inmunología hoy 4:72-79; Olsson y otros, 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16). Se pueden preparar moléculas de anticuerpos que contengan un dominio de unión a un antígeno de ratón, con regiones humanas constantes (Morrison y otros, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851; Takeda y otros, 1985, Nature 314:452).
35

Se puede preparar un clon molecular de un anticuerpo contra un epítoto de un ECMR empleando técnicas conocidas. La metodología del ADN recombinante (ver p.ej. Maniatis y otros, 1982, Clonación molecular, Manual de laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) puede usarse para construir secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo monoclonal o una región de la misma fijadora de antígenos.
40

Las moléculas de anticuerpo pueden purificarse mediante técnicas conocidas, p.ej. cromatografía de inmunoabsorción o de inmunoafinidad, métodos cromatográficos como HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), o una combinación de ambos, etc.
45

Los fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, sin que ello suponga una limitación, el fragmento F(ab')₂, el cual puede ser producido digiriendo la molécula de anticuerpo con pepsina; los fragmentos Fab', que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂, y los fragmentos 2Fab o Fab, que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.
50

Asimismo, los anticuerpos que reaccionan con los ECMRs producidos por los métodos anteriores pueden identificarse y seleccionarse mediante cualquier técnica conocida del estado técnico. Por ejemplo, se puede demostrar que los anticuerpos fijan y/o inmunoprecipitan un ECMR conocido que ha sido purificado o, alternativamente, separado de otras proteínas, por ejemplo en un gel de poliacrilamida. Opcionalmente, los anticuerpos de los ECMRs pueden identificarse por su capacidad de competir en la fijación de ECMRs con anticuerpos de ECMR previamente conocidos. Los anticuerpos que se unen a los ECMRs también pueden identificarse por su capacidad de bloquear una interacción ECMR/ligando. Por ejemplo, sin que sirva de limitación, se puede demostrar que las células que llevan un receptor ECMR capaz de unirse a la fibronectina (el cual no es preciso que haya sido identificado o caracterizado, sino solo definido funcionalmente) se adhieren a un sustrato revestido de fibronectina. Si se puede demostrar que un antisuero o un sobrenadante de hibridoma inhibe la adherencia de las células al sustrato, los anticuerpos contenidos en el antisuero o en el sobrenadante pueden reconocer el receptor ECMR.
55
60

Según la presente invención, los anticuerpos que reconocen el receptor $\alpha 4\beta 1$ pueden prepararse mediante los métodos esbozados arriba. En una forma de ejecución preferida de la presente invención, los anticuerpos monoclonales dirigidos al $\alpha 4\beta 1$ se pueden producir como sigue: se pueden inmunizar ratones de la cepa RBF/DN con unos 100 μ l de linfocitos T envasados; a continuación pueden extraerse sus bazos e hibridarlos con células de mieloma, por ejemplo de tipo NS-1/FOX-NY, como las descritas por Oi y Herzenberg (1980, en "Métodos escogidos en inmunología
65

celular”, Mishell y Shiigi, eds. Freeman and Co., San Francisco, págs. 351-373) y Taggart y Samloff (1983, Science 219:1228-1230). Luego pueden seleccionarse los heterocariones viables en un medio RPMI 1640 suplementado con adenina/aminopterina/timidina. Los hibridomas productores de anticuerpos dirigidos a ECMRs de linfocitos se pueden cribar por adhesión a superficies recubiertas de fibronectina y se pueden clonar por dilución limitativa. En concreto, los anticuerpos dirigidos al $\alpha 4\beta 1$ pueden identificarse, por ejemplo, gracias a su capacidad de bloquear la adherencia de los linfocitos al sustrato recubierto con péptido CS-1 o sus derivados, o a células endoteliales. Sin embargo, los anticuerpos que reconocen el $\alpha 4\beta 1$ no inhibirán la adherencia de las células portadoras del receptor $\alpha 5\beta 1$ al sustrato recubierto con péptido RGD. Como alternativa, los anticuerpos dirigidos al $\alpha 4\beta 1$ pueden identificarse por su capacidad de i) inhibir competitivamente la fijación de anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 1$ conocidos (tales como P4C2 o P4C10), o ii) unirse a la misma proteína que los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 1$ conocidos (p.ej. en un gel proteico, en Western blot, o mediante ensayos de inmunoprecipitación secuencial).

5.2. Análisis de la interacción ECMR-ligando

La interacción entre un receptor de matriz extracelular y su ligando se puede analizar, por ejemplo, y sin que ello suponga limitación alguna, mediante los siguientes:

- i) determinación de la distribución y función del receptor;
- ii) intervención en la unión receptor/ligando;
- iii) separación y análisis químico del receptor y/o del ligando.

Estos métodos se describen con más detalles en las tres subsecciones siguientes.

5.2.1. Determinación de la distribución y función del receptor

Conforme a los métodos utilizados en la presente invención, la distribución del receptor se puede determinar según cualquier método conocido del estado técnico. Por ejemplo, y sin que ello suponga limitación alguna, las poblaciones celulares portadoras del ECMR se pueden identificar usando anticuerpos monoclonales dirigidos al ECMR de interés. La unión del anticuerpo al ECMR se puede detectar utilizando técnicas inmunohistoquímicas, tales como la inmunofluorescencia y la coloración inmune con peroxidasa. Alternativamente las poblaciones celulares portadoras del ECMR de interés pueden recogerse mediante técnicas de clasificación de células activadas por fluorescencia.

Ya que, según parece, los receptores de adherencia de la superficie celular se reorganizan específicamente para las adhesiones focales, al cultivar las células sobre los ligandos apropiados (Burridge y otros, 1988, Ann. Rev. Cell Biol. 4:487-525), un método para analizar la interacción funcional entre un determinado receptor y un ligando potencial consiste en investigar si el ECMR de interés se distribuye hacia las adhesiones focales que se forman entre la célula y el sustrato ligando. Por ejemplo, sin que sirva de limitación, con el siguiente método (ver también más abajo la sección 6.2.3.) se puede demostrar que el $\alpha 4\beta 1$ interactúa con la fibronectina a través de una relación receptor/ligando. Se puede dejar que los linfocitos se adhieran a un sustrato de fibronectina, y las adhesiones focales entre las células y el sustrato se pueden visualizar mediante microscopía de reflexión-interferencia (Izzard y otros, 1976, J. Cell Sci., 21:129-159). Los anticuerpos, como P4G9 o P4C10, que reconocen el $\alpha 4\beta 1$ pueden utilizarse para demostrar con técnicas inmunohistoquímicas estándar, p.ej. con fluoro-isotiocianato, que, en ausencia de suero, el $\alpha 4\beta 1$ se redistribuye hacia las adhesiones focales.

La interacción entre el ECMR y el ligando también puede analizarse, ensayando la capacidad del ECMR para adherirse a varios sustratos distintos. Por ejemplo, se puede ensayar la capacidad de un tipo de célula o de un ECMR interesante, para adherirse a sustratos formados por componentes de la matriz extracelular purificados, tales como fibronectina, colágeno, vitronectina o laminina. En una forma de ejecución específica de la presente invención se puede demostrar que las células portadoras del $\alpha 4\beta 1$ se adhieren a la fibronectina, pero no a los sustratos de colágeno o laminina, como resultado de la interacción $\alpha 4\beta 1$ /fibronectina.

Además, cuando se vea que cualquier ECMR de interés se fija a un ligando proteico determinado, se puede ensayar la capacidad de los sustratos portadores de subfragmentos del ligando proteico para fijarse a un ECMR sobre la superficie de las células, permitiendo así localizar el lugar de unión entre el ECMR y el ligando. Concretamente, si el receptor es $\alpha 4\beta 1$, cuya adherencia a la fibronectina ha sido determinada (véase arriba), se puede ensayar la capacidad de los sustratos portadores de subfragmentos de fibronectina para unirse a células portadoras de $\alpha 4\beta 1$, tal como se ejemplifica abajo en la sección 6. Aunque los linfocitos T se fijaron al dominio de unión celular de 80 kDa de la fibronectina, portador del receptor $\alpha 4\beta 1$ (figura 5A), demostraron una clara preferencia por una región que no llevaba RGD, localizada en un fragmento de 38 kDa. Sobre una base molar, el fragmento de 38 kDa fue tres veces más eficiente que el fragmento de 58 kDa respecto a la mediación en la adherencia de los linfocitos T. Tal como se muestra en la figura 5A, los fragmentos de 38 kDa y 58 kDa se obtuvieron de las cadenas A y B de la fibronectina plasmática, respectivamente. Por lo tanto difieren en la presencia o ausencia de IIICS (Kornbliht y otros, 1985, arriba citado; García-Pardo, 1987, arriba citado). Así pues, es posible que los fragmentos de 38 kDa y 58 kDa empleados aquí compartan un lugar común de baja afinidad para la unión a los linfocitos T, localizado en el dominio Hep II, y que haya sitios adicionales de gran afinidad para la adherencia a los linfocitos T en la región IIICS, única del fragmento de 38 kDa. De hecho, parece que los linfocitos T reconocen específicamente el CS-1 y se unen al mismo, el cual ha

sido definido como un sitio de adherencia de gran afinidad para las células de melanoma B16 y las células neurales de crestas de ave (Humphries y otros, 1987, arriba citado; Humphries y otros, 1988, J. Cell Biol., 106:1289-1297; Dufour y otros, 1988, EMBO J., 7:2661-2671). La CS-1 es una región molecular heterogénea (generada por los empalmes alternativos) presente en el dominio de tipo IIICS de la cadena A de la fibronectina plasmática.

5.2.2. Intervención en la unión receptor/ligando

La relación ECMR/ligando también puede analizarse identificando y evaluando agentes que interfirieran en la adhesión receptor/ligando.

Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos a un ECMR de interés se pueden usar para inhibir la unión ligando/receptor. Visto que un tipo concreto de célula se adhiere a un determinado ligando o sustrato celular, puede ser interesante identificar el ECMR implicado en la interacción. Se puede ensayar la capacidad de bloquear la adhesión de las células al sustrato con un panel de anticuerpos monoclonales, cada uno de ellos dirigido a un ECMR diferente. La inhibición de la adherencia mediante un anticuerpo concreto indicaría que el ECMR reconocido por este anticuerpo está implicado en la interacción adherente. Según una forma de ejecución específica de la presente invención, la adherencia de los linfocitos a células endoteliales cultivadas puede inhibirse con anticuerpos dirigidos al $\alpha 4\beta 1$, pero no con anticuerpos dirigidos a diversos ECMRs distintos (véase la sección 7, más adelante), lo cual indica que el $\alpha 4\beta 1$ es necesario para la adhesión de los linfocitos a las células endoteliales. Además, los anticuerpos monoclonales se pueden usar para determinar la relación entre el ECMR y el sustrato ligando.

Tal como se ejemplifica en la sección 6, más abajo, la adhesión de los linfocitos T a los fragmentos de 38 y 58 kDa pudo inhibirse por completo mediante anticuerpos monoclonales definidos funcionalmente para el $\alpha 4\beta 1$. Asimismo, la adherencia de los linfocitos T a las superficies recubiertas de CS-1 (conjugado de IgG) pudo inhibirse totalmente con P4C2, P3E3 o P4G9. Esta información demuestra claramente que el $\alpha 4\beta 1$ es el receptor de los linfocitos T para el CS-1. En cambio, dichos anticuerpos no lograron inhibir la adhesión de las células T al fragmento de 80 kDa que contiene la secuencia prototípica de adherencia arg-gly-asp (RGD). La adhesión de las células T al fragmento de 80 kDa se pudo inhibir completamente mediante un anticuerpo monoclonal del $\alpha 5\beta 1$ (PID6) o con RGDS. Tanto el PID6 como el RGDS fueron incapaces de inhibir completamente la adherencia de los linfocitos T a los fragmentos de 38 y 58 kDa o al CS-1. Todos estos datos demuestran que el $\alpha 4\beta 1$ funciona como receptor del dominio de adhesión carboxi-terminal de la fibronectina plasmática, y como receptor de secuencias alternativas de adherencia en el IIICS (CS-1) y posiblemente en el Hep II.

Además la relación ECMR/ligando puede analizarse determinando la estructura del ligando. En concreto, se puede evaluar la capacidad de los agentes para competir con el ligando en la interacción ECMR/ligando. Por ejemplo, si el ligando es una proteína, se puede ensayar la capacidad de varios fragmentos de la misma para inhibir competitivamente la adhesión receptor/ligando. En particular, como se observa que los linfocitos se fijan tanto a las células endoteliales como a la fibronectina, puede ensayarse la capacidad de fragmentos peptídicos de la fibronectina para inhibir competitivamente la adherencia de los linfocitos al sustrato de células endoteliales. Tal como se ejemplifica en la sección 7, más abajo, el péptido CS-1 y, especialmente, el péptido EILDVPST pudo inhibir competitivamente la adherencia de los linfocitos a la fibronectina y a las células endoteliales, localizándose así el sitio de unión del ligando en una región idéntica u homóloga al EILDVPST.

5.3. Métodos de intervención en la adherencia celular

Según la presente invención, la adhesión de una célula a otra se puede inhibir interviniendo en la interacción ECMR/ligando. Según una forma concreta de ejecución de la presente invención, la adhesión de los linfocitos a las células endoteliales se puede inhibir dificultando la unión del $\alpha 4\beta 1$ a su ligando. Esto puede lograrse utilizando anticuerpos dirigidos al ECMR o, alternativamente, a su ligando (se pueden generar anticuerpos hacia un ligando, de manera análoga a la descrita en la sección 5.1).

Según una forma específica de ejecución de la presente invención, se puede usar un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 1$, o un fragmento o derivado del mismo, para inhibir la unión de los linfocitos que llevan receptores $\alpha 4\beta 1$ a células vasculares del endotelio. En formas de ejecución preferidas el anticuerpo es de tipo monoclonal, en concreto el anticuerpo P4C2 ($\alpha 4\beta 1$) o P4C10 ($\beta 1$), o fragmentos o derivados de ellos, incluyendo los anticuerpos quiméricos con las mismas propiedades específicas de adherencia.

5.4. Utilidad de la presente invención

Según la presente invención, la adhesión de una célula a otra se puede inhibir dificultando la unión entre el ECMR y su ligando. En las formas de ejecución de la presente invención, la adherencia de los linfocitos a las células endoteliales se puede inhibir dificultando la unión del $\alpha 4\beta 1$ de los linfocitos a su ligando en la superficie celular. Conforme a la presente invención, se prevé la interacción de ECMR adicional con ligandos de células endoteliales y la inhibición de la adherencia de estas células al endotelio, dificultando la interacción ECMR/célula endotelial. Por ejemplo, la adherencia de los macrófagos al endotelio también puede inhibirse interviniendo en la interacción ECMR del macrófago/célula endotelial. Análogamente, usando los anticuerpos de la presente invención, se puede inhibir la metastatización y la entrada en los tejidos de las células de melanoma, que también reconocen el péptido CS-1.

Por lo tanto, el método empleado en la presente invención es útil para evitar la salida de linfocitos a través del endotelio vascular hacia el tejido. Por consiguiente, la presente invención sirve para suprimir respuestas inmunes en los pacientes humanos que precisen tal tratamiento. En sus formas concretas, la presente invención sirve para tratar enfermedades relacionadas con la activación crónica o recidivante del sistema inmune, incluyendo las colagenosis vasculares y otras enfermedades autoinmunes (tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide), la esclerosis múltiple, el asma y la alergia, por mencionar unas cuantas.

La presente invención también sirve para tratar activaciones relativamente agudas del sistema inmune en pacientes que necesitan este tipo de tratamiento, incluyendo por ejemplo, sin que ello suponga ninguna limitación, la reacción del injerto contra el huésped, el rechazo de los trasplantes alogénicos o la reacción transfusional.

En función del tipo de trastorno del paciente puede ser deseable inhibir la migración de los linfocitos a los tejidos de manera sistémica o bien local. Por ejemplo, en las enfermedades que afectan a múltiples sistemas de órganos, como el lupus eritematoso sistémico, puede ser deseable inhibir sistémicamente la adhesión de los linfocitos durante una exacerbación clínica. Sin embargo, para una dermatitis de contacto localizada puede ser preferible limitar la migración de los linfocitos solo hacia los tejidos afectados.

El control del empleo sistémico frente al localizado de los métodos de la presente invención se puede lograr modificando las composiciones de los anticuerpos administrados o alterando la estructura de estos agentes o sus composiciones farmacológicas. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía, incluyendo las vías subcutánea, intramuscular, intravascular, intravenosa, intraarterial, intranasal, oral, intraperitoneal, rectal, intratraqueal o intratecal. No obstante, para lograr la inhibición local de la adherencia de los linfocitos al endotelio, puede ser deseable administrar los anticuerpos de la presente invención por la vía subcutánea o intramuscular en cantidades terapéuticas y en un soporte farmacológico apropiado. Alternativamente, para lograr la inhibición sistémica de la adherencia de los linfocitos, puede ser deseable administrar los anticuerpos por la vía intravenosa.

En varias formas de ejecución de la presente invención es ventajoso emplear un soporte farmacológico que facilite la administración de los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, cuando hay que suministrar anticuerpos a la piel (p.ej. para el tratamiento de estados crónicos de inflamación dermatológica), puede resultar ventajoso un soporte farmacológico que ayude a penetrar en la cutícula, la epidermis y la dermis.

La diseminación de los anticuerpos de la presente invención también puede controlarse alterando la vida media del anticuerpo o su vida media efectiva.

En formas de ejecución adicionales, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con otros anticuerpos o ligandos que pueden dirigir los anticuerpos hacia tejidos específicos. Asimismo pueden producirse anticuerpos que mimeticen el ECMR, fijándose así a ligandos de las células endoteliales y bloqueando la adherencia de los linfocitos.

5.5. Anticuerpos de la presente invención

Los anticuerpos de la presente invención, producidos y definidos como se ha descrito antes, incluyen tanto los monoclonales como los policlonales, y los fragmentos y derivados de los mismos, incluyendo los fragmentos $F(ab')_2$, Fab' y Fab .

6. Ejemplo

Identificación y análisis del receptor de adherencia de los linfocitos para un dominio alternativo de unión celular en la fibronectina plasmática

Los siguientes ensayos han descrito un nuevo receptor de fibronectina que parece ser idéntico al receptor de integrina $\alpha 4\beta 1$ (Hemler y otros, 1987, antes citado), expresado de manera preferente por células hematopoyéticas nucleadas. La identificación del $\alpha 4\beta 1$ como un receptor específico de fibronectina se basó en (i) la inhibición de la adherencia celular a la fibronectina por anticuerpos monoclonales (P4C2, P3E3 y P4G9) y (ii) la reorganización y concentración específica del $\alpha 4\beta 1$ en adhesiones focales dependientes de la fibronectina. Estos hallazgos indican que $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, el receptor prototipo de fibronectina, funcionan conjuntamente como mediadores principales de la adherencia celular a la fibronectina.

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Reactivos

El fenil-metil-sulfonilfluoruro, la N-etilmaleimida, la leupeptina, el diisopropilfluorofosfato, el 2-mercaptoetanol, la albúmina de suero bovino (BSA), el Triton[®] X-100, la Proteína A-agarosa, el inhibidor de tripsina de la soja y la proteasa V8 (del *Staphylococcus aureus*, cepa V8, proteasa del tipo XVII) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La lactoperoxidasa y la glucosa oxidasa eran de Calbiochem (San Diego, CA). La TPCK-tripsina era de Cooper Biomedical, Malvern, PA. Los anti-IgG e IgM (cadenas H y L) de ratón (obtenidos en cabra) conjugados con fluoresceína o los anti-IgG e IgM (cadenas H y L) de conejo (obtenidos en cabra) conjugados con rodamina se

obtuvieron de Tago, Inc. (Burlingame, CA). La estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina era de Biomedica (Foster City, CA). El antisuero de conejo anti-IgG de ratón (H+L) se obtuvo de Cappel (Cooper Biomedical, Malvern, PA). El cromato ^{51}Cr sódico era de New England Nuclear. El ^{125}I de Amersham (Arlington Hts., IL). La interleucina-2 (IL-2) humana recombinante fue un generoso regalo del Dr. D. Urdal (Immunex Corp., Seattle, WA). La laminina se compró a Collaborative Research, Inc. (Bedford, MA) y la fibronectina plasmática purificada y los tipos de colágeno I y II se prepararon de la manera anteriormente descrita (Wayner, E. A. y Carter, W. G., 1987, antes citado, y Wayner y otros, 1988, antes citado).

6.1.2. Células y cultivo celular

Las células RD (rabdiosarcoma humano) y HT1080 (fibrosarcoma humano) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), plaquetas y granulocitos procedentes de donantes humanos normales se prepararon de la manera descrita (Kunicki y otros, 1988, antes citado; Wayner y otros, 1988, antes citado). Las células de sangre periférica procedentes de pacientes con leucemias de tipo linfocítica aguda, linfocítica granular grande (LGL) o mieloides se obtuvieron del Dr. I. Bernstein y del Dr. T. Loughran (Fred Hutchinson Cancer Research Center). Las células agresoras activadas (LAK) con linfocinas humanas (500 U/ml de IL-2) y la línea celular C1C4, de linfocitos T citotóxicos humanos (CTL) específicos del HAL B7 monoclonal, se prepararon según protocolos estándar (Grimm y otros, 1982, J. Exp. Med., 155: 1923-1941; Glasebrook, A. L. y Fitch, F. W., 1980, J. Exp. Med., 151:876-895; Brooks, 1983, Nature, 305:155-158; Wayner, E. A. y Brooks, C. G., 1984, J. Immunol., 132:2135-2142; Wayner, E. A. y Carter, W. G., 1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884). La línea celular de linfocitos B (BLCL) transformados por EBV, ST-1, se obtuvo del bazo donante empleado en la producción de la línea CTL C1C4. Todas las demás líneas y condiciones de cultivo celular fueron como se ha descrito previamente (Wayner, E. A. y Carter, W. G., 1987, antes citado; Wayner y otros, 1988, antes citado).

6.1.3. Anticuerpos

Para detectar el $\alpha 5\beta 1$ en las adhesiones focales se usó un anticuerpo policlonal de conejo, AB33, preparado contra el dominio citoplasmático del receptor de fibronectina $\alpha 5\beta 1$. Los anticuerpos monoclonales A1A5, contra la subunidad común de integrina $\beta 1$ (Hynes, R. O., 1987, antes citado) de la familia de los receptores VLA (Hemler, M. E., 1988, antes citado), y B5-G10 contra la subunidad α del VLA 4 (Hemler y otros, 1987, antes citado) se obtuvieron del Dr. Martin Hemler, del Dana-Farber Cancer Inst., (Boston, MA). Los anticuerpos monoclonales de los receptores de integrina $\alpha 3\beta 1$ (P1B5), $\alpha 2\beta 1$ (P1H5) y $\alpha 5\beta 1$ (P1D6) ya se han descrito y fueron desarrollados en este laboratorio. El P1H5 y el P1D6 inhiben la adhesión de fibroblastos y plaquetas al colágeno y a los substratos recubiertos de fibronectina, respectivamente (Wayner, E. A. y Carter, W. G., 1987, antes citado; Kunicki y otros, 1988, antes citado; Wayner y otros, 1988, antes citado).

Los anticuerpos monoclonales contra los receptores de adhesión de los linfocitos se produjeron según los métodos de Oi y Herzenberg (Oi, V.T. y Herzenberg, L.A. 1980, Líneas de células híbridas productoras de inmunoglobulina, en: Métodos escogidos en inmunología celular. Ed. por Mishell y S.M. Shiigi, W.H. Freeman and Co., San Francisco, págs. 351-373) y Taggart y Samloff (Taggart, R.T. y Samloff, I.M., Science, 219, 1228-1230) como se ha descrito (Wayner y Carter, 1987; Wayner y otros, 1988). Se extrajeron los bazos de ratones de la cepa RBF/DN inmunizados con 100 μl de linfocitos T envasados y se fusionaron con células de mieloma NS-1/FOX-NY. Los heterocariotes viables se seleccionaron en RPMI 1640 suplementado con adenina/aminopterina/timidina (Taggart y Samloff, 1983). Los hibridomas productores de anticuerpos dirigidos a los receptores de adhesión de los linfocitos se cribaron inhibiendo específicamente la adhesión de los linfocitos a las superficies recubiertas de fibronectina y se clonaron por dilución limitativa.

Aunque el A1A5 (Hemler y otros, 1987, J. Biol. Chem., 262:3300-3309) reacciona específicamente con la subunidad $\beta 1$ de los receptores de integrina, y se ha reportado que inhibe la adhesión celular (Takeda y otros, 1988, J. Cell. Biochem., 37:385-393), no se ha visto nunca que este reactivo inhiba la adhesión de los linfocitos a cualquier superficie. Por tanto se produjo un anticuerpo monoclonal funcionalmente definido anti- $\beta 1$, P4C10, mediante las técnicas previamente descritas (antes citadas) y el cribado por inhibición de la adhesión celular a múltiples ligandos. Se ha demostrado que el P4C10 inhibe la adhesión de las células a superficies recubiertas de fibronectina, CS-1, colágeno y laminina, y reacciona con la $\beta 1$ según los criterios bioquímicos estándar.

6.1.4. Inhibición de la adhesión celular a la fibronectina intacta y a fragmentos de fibronectina

Los anticuerpos que podrían alterar la adhesión celular a la fibronectina plasmática purificada, a los fragmentos trípticos y a los péptidos CS se identificaron del modo antes descrito (Wayner y Carter, 1987). En resumen, unas placas de poliestireno virgen de 48 pocillos se recubrieron con fibronectina de plasma humano (5 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Las placas se bloquearon con PBS suplementado con 10 mg/ml de BSA desnaturizada térmicamente (HBSA). Se marcaron linfocitos T o células HT1080 con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (50 μl Ci/ml durante 2-4 horas), se lavaron, y, durante 15 minutos a temperatura ambiente, se incubaron 5 $\cdot 10^4$ células HT1080 o células T cultivadas, o 5 $\cdot 10^{10}$ PBL/pocillo, con sobrenadantes de cultivos de hibridoma (dilución 1:2 en PBS suplementado con 1 mg/ml de BSA desnaturizada térmicamente) o como control, con sobrenadante de células de mieloma cultivadas. Se dejó que las células se adhirieran a las superficies recubiertas de proteína, en presencia de los sobrenadantes de hibridoma, durante 15-30 minutos (HT1080) o 2-4 horas

ES 2 210 225 T3

(linfocitos) a 37°C. Las células no adheridas se eliminaron lavando con PBS y las células adheridas se disolvieron en SDS/NaOH, midiendo los cpm del ⁵¹Cr fijado con un contador gamma.

5 6.1.5. *Precipitación inmune y precipitación inmune secuencial, mapeo péptido de la proteasa V8 y electroforesis en gel de poliacrilamida*

Se marcaron con yodo-125 células viables, de la manera ya descrita (Wayne y Carter, 1987), seguido de extracción con detergente Triton® X-100 al 1% v/v o detergente CHAPS al 0,3% en disolución salina de fosfato 50 mM tamporada a pH 7,2. En algunos casos se añadió CaCl₂ 1 mM al tampón de lisis. Se empleó fenil-metil-sulfonilfluoruro 1 mM, N-etilmaleimida 1 mM, 1 µg/ml de leupeptina y 1 µg/ml de inhibidor de tripsina de la soja como inhibidores de proteasa. La precipitación inmune y las precipitaciones inmunes secuenciales se llevaron a cabo de modo exacto al previamente descrito (Wayne y Carter, 1987, antes citado). El análisis de los péptidos se efectuó según el procedimiento básico de Cleveland y otros (1977, J. Biol. Chem., 252:1102-1106) con las modificaciones descritas (Wayne y Carter, 1987). Las placas de gel de poliacrilamida que contienen dodecilsulfato sódico (geles SDS-PAGE) se prepararon conforme al sistema básico de geles apilados según Laemli (1970, Nature 227:680-685).

6.1.6. *Preparación de fragmentos trípticos partiendo de fibronectina plasmática humana y síntesis de péptidos CS*

La fibronectina plasmática humana fue un generoso regalo de los Drs. Horowitz y R. Schulman (New York Blood Center, NY). La fibronectina se digirió con TPCCK-tripsina durante 90 minutos a 37°C y el producto de la digestión se fraccionó por cromatografía de afinidad e intercambio iónico, tal como se ha descrito previamente (García-Pardo y otros, 1987, Biochem. J., 241:923-928; García-Pardo y otros, 1989, Exp. Cell Res., 181: 426-431). Se sintetizaron dos péptidos, extendidos sobre los 48 restos iniciales de la región IIICS de la fibronectina humana (CS-1 y CS-2), y se acoplaron con IgG de conejo, tal como se ha descrito (Humphries y otros, 1986, y Humphries y otros, 1987, J. Biol. Chem., 262:6886-6892).

6.1.7. *Análisis por fluorescencia y expresión de los receptores*

La expresión de los ECMRs en células en suspensión se analizó por citometría de flujo de uno o dos colores mediante un clasificador celular de láser dual EPICS® 750 (Coulter, Hialeah, FL). La fluorescencia positiva se determinó en una escala logarítmica de 3 décadas y la intensidad de la fluorescencia (log FI) se expresó como el número medio de canales (0-255). Se determinó la fluorescencia de fondo de un control negativo de IgG de ratón no inmune para cada población celular y se restó. Las células adheridas se tripsinizaron y se dejaron recuperar durante 15 minutos a 37°C en presencia de suero antes de usarlas en la citometría de flujo. Para las mediciones de fluorescencia de unos o dos colores, se incubaron durante 30 minutos 10⁶ células en suspensión con IgG de cabra (20 µg/ml), purificada con Proteína G-Sefarosa, y luego durante 60 minutos a 4°C con anticuerpos de la primera fase, se lavaron en solución salina equilibrada de Hank que llevaba 10 mg/ml de HBSA y 0,02% de azida sódica (Hanks/BSA/SA) y se incubaron durante 60 minutos a 4°C en Hanks/BSA/SA con anti-IgG de ratón en conejo, conjugado con FITC. Se lavaron y se inmovilizaron en paraformaldehído frío (recién preparado) al 2% en PBS. Después, a las células teñidas con FITC e inmovilizadas se les añadió anticuerpo monoclonal purificado y biotinilado para fluorescencia de dos colores, hasta una concentración final de 1 µg/ml en Hanks/BSA/SA, y se incubó a 4°C durante 60 minutos. La inmovilización anterior con paraformaldehído al 2% tuvo poco efecto sobre la expresión de los receptores de integrina en los linfocitos. Las células inmovilizadas se lavaron e incubaron durante 30 minutos a 4°C en 0,5 ml de Hanks/BSA/SA que contenía estreptavidina conjugada con ficoeritrina (Bionetics) en dilución 1/50. Finalmente, las células teñidas se lavaron y se volvieron a inmovilizar en paraformaldehído al 2% en PBS, manteniéndose a 4°C en la oscuridad para analizarlas en el citómetro de flujo EPICS.

6.1.8. *Localización de receptores en las adhesiones focales*

Las células adherentes se tripsinizaron, se lavaron en RPMI suplementado con 1 µg/ml de BSA, más 100 µg/ml de inhibidor de tripsina de la soja, y se dejó que se adhirieran a cubreobjetos lavados con ácido, silanizados y recubiertos con fibronectina, laminina o colágeno (20 µg/ml), en ausencia de suero, durante 1-4 horas, tal como ha sido descrito (Carter y Wayner, en preparación). Terminada la incubación, se eliminaron las células no adheridas y las células adheridas se inmovilizaron en cacodilato sódico 100 mM, sacarosa 100 mM, CaCl₂ 4,5 mM y formaldehído al 2% durante 20 minutos. Se permeabilizaron con Triton® X-100 al 0,5% durante 5 minutos y luego se lavaron y bloquearon con suero de cabra al 25% en PBS. Las células permeabilizadas se tiñeron con anticuerpos de receptores específicos (60 minutos a temperatura ambiente), se lavaron y se incubaron con anti-IgG de ratón obtenido en cabra y conjugado con FITC, o bien con anti-IgG de conejo obtenido en cabra y conjugado con rodamina (45 minutos a temperatura ambiente), lavando de nuevo. Los cubreobjetos se invirtieron sobre portaobjetos para microscopia de reflexión-interferencia (IRM), tal como se ha descrito (Izzard, S.C. y Lochner, L.R., 1976, J. Cell, Sci., 21, 129-159).

6.1.9. *Tinción de tejidos*

La distribución de los receptores de integrina en los tejidos se midió por microscopia de fluorescencia con cortes criostáticos. Se prepararon unos cortes criostáticos (6 µm) de piel humana, de amígdala o de muestras de tumor incluidas en medio OCT, tras breve congelación en isopentano/nitrógeno líquido. Todos los cortes fueron inmovilizados en paraformaldehído al 4% en PBS, antes de incubarlos con anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios fluorescen-

ES 2 210 225 T3

tes, tal como se ha descrito (Carter y Wayner, 1988, J. Biol. Chem., 263:4193-4201). En los ensayos de control no se detectó fluorescencia de rodamina con los filtros de fluoresceína y viceversa.

6.2. Resultados

6.2.1. Identificación de un receptor alternativo de fibronectina

Los linfocitos T (Molt 4) cultivados, las células cultivadas K562, RD (rabdiosarcoma) y HT1080 (fibrosarcoma) y PBL recién obtenido (no mostrado) se adhirieron a superficies recubiertas con fibronectina (figura 1: barras blancas). Sin embargo, las células Molt 4 y RD expresaron niveles bajos o indetectables del receptor prototipo de fibronectina (integrina $\alpha_5\beta_1$) reconocido por el anticuerpo monoclonal P1D6 (figura 1: barras rayadas). Por consiguiente, la adherencia de las células Molt 4 y RD a la fibronectina no pudo ser totalmente inhibida por P1D6 (figura 1: barras negras). En cambio, el P1D6 pudo inhibir eficazmente la adherencia a la fibronectina de las células que expresaron niveles abundantes de $\alpha_5\beta_1$ (HT1080 y K562). Además, el péptido sintético RGDS no inhibió completamente la adherencia de los linfocitos T a la fibronectina plasmática (50-70% para las células Molt 4 o Jurkat, contra 80-90% para los fibroblastos y 100% para las células K562-1). Todos estos datos indican que algunas células, como los linfocitos T, expresan receptores de adhesión a la fibronectina distintos del $\alpha_5\beta_1$.

Hemos tratado de identificar otros supuestos receptores de fibronectina, preparando anticuerpos monoclonales de los linfocitos T cultivados y cribándolos por su capacidad de inhibir específicamente la adhesión de los linfocitos, pero no de los fibroblastos, a las superficies recubiertas con fibronectina. Siguiendo este procedimiento se identificaron varios anticuerpos monoclonales (P4C2, P3E3, P4G9) que inhibían la adherencia de los linfocitos T cultivados, pero no la de las células HT1080, a la fibronectina (tabla 3).

TABLA III

Inhibición específica de la adherencia de los linfocitos a la fibronectina plasmática mediante los anticuerpos monoclonales P3E3, P4C2 Y P4G9

Células	Adherencia a la fibronectina (% del control)				
	SP2	P1D6 ($\alpha_5\beta_1$)	P3E3	P4C2	P4G9
PBL	100%	43%	38%	10%	52%
Jurkat	100%	22%	33%	12%	48%
Molt 4	100%	18%	12%	8%	39%
HT1080	100%	5%	98%	93%	104%

La inmunoprecipitación partiendo de lisados con detergente Triton[®] X-100, preparados con células PBL (no representadas), Molt 4 o HT1080 (figura 2) marcadas superficialmente con ¹²⁵I, demostró que los anticuerpos monoclonales inhibidores (datos indicados para el P3E3) reaccionaban con una sola proteína presente en los extractos de linfocitos, que migraba a M 150.000 (p150), en presencia (no representado) o ausencia (figura 2) de agente reductor. En estas condiciones de precipitación inmune, la p150 carecía de una estructura aparente de subunidad α - β y no migró con ninguna de las subunidades α o β de los receptores de integrina $\alpha_2\beta_1$ o $\alpha_3\beta_1$ (figura 2). El antígeno resultante de la inmunoprecipitación a partir de los extractos con detergente Triton[®] X-100, preparados con linfocitos T agresores activados crónicamente con CD8+ (LAK) o con linfocitos CTL (no representados), contenía además de la p150 cantidades relativamente grandes de dos pequeñas proteínas, que migraron a M 80.000 y 70.000, en presencia (no representado) o ausencia (figura 2) de agente reductor. El mapeo peptídico de la proteasa V8 reveló que p80 y p70 eran fragmentos proteolíticos de p150 (no representado). Estas formas de bajo peso molecular se pudieron inmunoprecipitar a partir de células T activadas crónicamente, aun en caso de haber preparado los extractos con detergente en presencia de varios inhibidores de proteasa (leyenda de la figura 2). Los p80 y p70 estaban casi ausentes de los extractos preparados con células PBL en reposo, células leucémicas T (Molt 4, Jurkat) o B cultivadas, y células RD.

Las características bioquímicas de la p150 sugirieron que podía estar relacionada con el antígeno VLA 4 descrito por Hemler (Hemler y otros, 1987). Esto fue confirmado por la inmunoprecipitación secuencial con un anticuerpo monoclonal específico del VLA 4, B5-G10. La p150 fue reconocida como una subunidad de la superfamilia de las integrinas por su asociación con la β_1 , al llevar a cabo las precipitaciones inmunes tras haber solubilizado con detergente CHAPS (0,3%) los linfocitos T marcados superficialmente con ¹²⁵I, en presencia de Ca⁺⁺ 1 mM (figura 3). En estas condiciones se precipitó α_4 en forma de heterodímero con β_1 . La identidad de β_1 fue confirmada por mapeo peptídico de la proteasa V8. Se demostró que el heterodímero $\alpha_4\beta_1$, resultante de la precipitación inmune a partir de linfocitos T con los anticuerpos monoclonales inhibidores (P3E3, P4C2 y P4G9), era distinto del receptor prototipo de fibronectina $\alpha_5\beta_1$ precipitado con P1D6 por tres criterios. 1) Las cantidades relativas de $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$ presentes en los extractos de los linfocitos T con detergente eran distintas, con mayores niveles del $\alpha_4\beta_1$ (figura 3), lo cual concordaba con los datos obtenidos mediante citometría de flujo (figura 1). 2) En los ensayos de inmunoprecipitación secuencial, los anticuerpos monoclonales del $\alpha_4\beta_1$ no separaron previamente el $\alpha_5\beta_1$ (no representado). 3) Los mapas peptídicos de la proteasa V8 resultantes de las subunidades α_4 y α_5 precipitadas con los anticuerpos monoclonales P3E3 y P1D6 fueron claramente distinguibles (no representado). Asimismo, en las condiciones empleadas para solubilizar el

ES 2 210 225 T3

conjugado del $\alpha 4\beta 1$ (CHAPS al 0,3% y CaCl_2 1 mM) procedente de las células Jurkat (figura 3), otra proteína de alto peso molecular (p180) reaccionó también con los anticuerpos monoclonales o coprecipitó con el $\alpha 4\beta 1$. La p180 no se halló en los extractos preparados con el anticuerpo monoclonal P1D6 (figura 3), células no linfoides o extractos con detergente Triton[®] X-100 preparados en ausencia de Ca^{++} . La proporción de p180 a otras integrinas no se conoce. Como la $\alpha 4$ se pudo inmunoprecipitar sin la $\beta 1$ tras haber solubilizado las células T con Triton[®] X-100 en ausencia de Ca^{++} , esto reveló que los anticuerpos monoclonales inhibidores reconocieron los epítomos presentes en la subunidad $\alpha 4$ (figura 2).

6.2.2. Distribución de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ en células cultivadas y en los tejidos

Como se ha referido previamente (Hemler, antes citado), el $\alpha 4\beta 1$ estaba ampliamente distribuido en las células hematopoyéticas nucleadas (tabla IV).

TABLA IV

Distribución de los receptores de fibronectina $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ en células humanas

Células	$\alpha 4\beta 1$	Intensidad relativa de fluorescencia $\alpha 5\beta 1$
<u>Células hematopoyéticas</u>		
PBL	+++	+/- o -
LGL (CD3-, CD16+)	+++	+/- o -
Monocitos (CD16+)	++	++
Granulocitos	-	+
Plaquetas	-	+
Bazo	+++	+
Amígdala	+++	+
Todas (T o B)	+++	++
LGL leucémicas (CD3+, CD4+)	+++	+/-
AML	+++	++
BLCL	++	+
Molt 4 (CD3+, CD4+)	+++	+
Jurkat (CD3+, CD4+)	+++	++
YT (CD3-)	++	-
PHA blastos (CD4+)	++++	++
CTL (CD3+, CD8+)	++++	+++
LAK (CD3+, CD8+)	++++	+++
HL-60	++	+
U937	++	+
K562-1	-	++
<u>Fibroblastos</u>		
HFF (p5)	+	+
HT1080	+	++
RD	++	+
VA13	+	++
<u>Células epiteliales</u>		
OC-1	-	-
OVCAR-4 ⁷	-	-
T47D	-	+
QG56	-	+

La citometría de flujo de dos colores reveló que todas las subpoblaciones de linfocitos procedentes del bazo, de la amígdala y de la sangre periférica expresaban abundante $\alpha 4\beta 1$. Además, los monocitos de la sangre periférica, y las líneas celulares recién obtenidas de leucemias linfocíticas agudas (T o B), de todas las leucemias linfocíticas granulares grandes (LGL) y mieloides, y de los linfocitos T y B cultivados que examinamos expresaron abundante $\alpha 4\beta 1$ (tabla IV). Las plaquetas y granulocitos de la sangre humana normal fueron negativos para el $\alpha 4\beta 1$ (tabla IV). En cambio las únicas poblaciones hematopoyéticas que expresaron $\alpha 5\beta 1$ fueron las células T activadas, las plaquetas, monocitos y granulocitos, las células de leucemias linfocíticas agudas (T o B) y mieloides, y las células cultivadas

K562, HL-60 y U937. Algunas líneas de células T (Molt 4 o Jurkat) y B (ST-1) cultivadas expresaron bajos niveles de $\alpha 5\beta 1$ detectados por el anticuerpo monoclonal P1D6. En algunos individuos normales, una subpoblación de PBL fue positiva para la fluorescencia con P1D6 detectada por citometría de flujo. Estamos investigando la naturaleza de esta subpoblación de PBL que expresa el $\alpha 5\beta 1$. Las células TY y un linfoma de células T CD3 fueron completamente negativas para el P1D6 por citometría de flujo. Estos resultados demuestran que el principal receptor de fibronectina constitutivamente expresado por los linfocitos T en reposo es el $\alpha 4\beta 1$ y como ya habíamos anunciado (Wayner y otros, 1988), la expresión del $\alpha 5\beta 1$ en los linfocitos T está limitada a células leucémicas o a células de cultivo activadas. Curiosamente, la mayor parte de líneas celulares fibroblásticas expresaron niveles bajos de $\alpha 4\beta 1$, mientras que las células endoteliales de los grandes vasos (HUVES) y las células epiteliales cultivadas resultaron negativas para el $\alpha 4\beta 1$ por citometría de flujo.

En cuanto a los tejidos, el $\alpha 4\beta 1$ se hallaba en el bazo de adultos, en los ganglios linfáticos y en las amígdalas, y faltaba fundamentalmente en todos los demás tejidos que examinamos. Además, las cantidades relativas de los receptores de adhesión de fibronectina expresados por células de áreas específicas de tejido varían espectacularmente. Por ejemplo, los PBL y los linfocitos de amígdalas, zonas del córtex y del centro germinal expresaron grandes cantidades de $\alpha 4\beta 1$, pero casi nada de $\alpha 5\beta 1$. También se encontró $\alpha 4\beta 1$ en regiones epiteliales de tejido linfático adulto, aunque ello era debido a la infiltración de linfocitos en estas áreas, o bien no hubo una clara expresión de $\alpha 4\beta 1$ por las células epiteliales linfáticas.

6.2.3. *El $\alpha 4\beta 1$ se localiza en adhesiones focales dependientes de la fibronectina*

Hay una reorganización específica de los receptores de adhesión de la superficie celular para las adhesiones focales, cuando las células se cultivan sobre los ligandos apropiados, en ausencia de suero (revisado por Burridge y otros, 1988, Ann. Rev. Cell Biol., 4:487-525). Como algunos fibroblastos expresan $\alpha 4\beta 1$, investigamos si este receptor se distribuiría hacia las adhesiones focales, al usar fibronectina como sustrato de adhesión. Como puede verse en la figura 4 (A y C), los puntos principales de contacto focal, o adhesiones focales, se pudieron visualizar por microscopía de reflexión-interferencia (Izzard, S.C. y Lochner, L.R., 1976, J. Cell Sci., 21:129-159) cultivando células RD en fibronectina. Como nosotros y otros hemos reportado (Roman, J., La Chance, R., Broekelmann, T.J., Roberts, C.J., Wayner, E.A., Carter, W.G., y Macdonald, J., 1988, J. Cell Biol., 108:2529-2543), en ausencia de suero, el $\alpha 5\beta 1$ estaba concentrado en las adhesiones focales al cultivar células RD sobre superficies recubiertas de fibronectina (figura 4B, flechas) pero no de laminina. Análogamente, la tinción con anticuerpo monoclonal P4G9 (figura 4D, flechas) reveló que el $\alpha 4\beta 1$ también estaba concentrado en adhesiones focales al cultivar las células sobre superficies recubiertas de fibronectina pero no de laminina (no representado). Estos resultados demuestran una interacción específica del $\alpha 4\beta 1$ con la fibronectina presente en las adhesiones focales, la principal estructura adherente de las células cultivadas.

La presencia de ambos receptores en los contactos focales sugirió la posibilidad de que el $\alpha 4\beta 1$ y el $\alpha 5\beta 1$ se fijaran a distintas secuencias adherentes de la fibronectina. De hecho, esto se comprobó empleando simultáneamente P4C2 y P1D6 para inhibir la adhesión de las células a la fibronectina plasmática intacta. El empleo conjunto de P4C2 y P1D6 inhibió totalmente la adhesión de los linfocitos T, y parcialmente la adhesión de las células RD, a la fibronectina plasmática intacta (tabla V).

TABLA V

Efecto combinado de los anticuerpos monoclonales P1D6 Y P4C2 en la adhesión de los linfocitos T y de las células RD a la fibronectina

Células	Anticuerpo	Especificidad	Adherencia (% de control \pm SD)
RD	IGG	-	100%
	P1D6	$\alpha 5\beta 1$	81 \pm 11
	P4C2	$\alpha 4\beta 1$	99 \pm 7
	P1D6 + P4C2		36 \pm 8
Jurkat	IGG	-	100%
	P1D6	$\alpha 5\beta 1$	26 \pm 9
	P4C2	$\alpha 4\beta 1$	38 \pm 14
	P1D6 + P4C2		0

Curiosamente, a diferencia de los linfocitos T, ni el P1D6 ni el P4C2 por separado fueron buenos inhibidores de la adhesión de las células RD a la fibronectina plasmática intacta. La adhesión de las células RD a la fibronectina solo pudo inhibirse eficazmente mediante el P1D6 y el P4C2 usándolos conjuntamente.

6.2.4. *El $\alpha 4\beta 1$ actúa como receptor para un sitio de unión alternativo en la fibronectina independiente del RGD*

Los resultados precedentes (tabla III, tabla V, figura 1, figura 4) indicaban claramente que en la unión de algunas células a la fibronectina plasmática intervenían dos receptores de la superficie celular independientes, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$. Se ha documentado bien que en la fibronectina el ligando para el $\alpha 5\beta 1$ es el dominio de unión celular de 80 kDa, portador de la secuencia RGD (Pytela, R., Pierschbacher, M.D. y Ruoslahti, E., 1985, Cell, 40:191-198). Para determinar qué región de la fibronectina interactúa con el $\alpha 4\beta 1$, examinamos la adherencia de linfocitos T cultivados a varios fragmentos proteolíticos de fibronectina plasmática (véase figura 5A y B), así como el efecto de los anticuerpos monoclonales P1D6 y P4C2 sobre la adherencia de los linfocitos a estos fragmentos. Tal como se muestra en la figura 6, las células Jurkat, YT y Molt 4 se unen mucho más eficazmente a un fragmento de 38 kDa portador del dominio de heparina (Hep) II, que a un fragmento portador de RGD (80 kDa). Las células Jurkat y Molt 4 también se unen, según la dosis, a otro dominio de Hep II que lleva un fragmento de 58 kDa. No obstante, la máxima fijación celular al fragmento de 58 kDa alcanzó solo el 30% de la lograda por el fragmento de fibronectina de 38 kDa. Esto indica que el fragmento de 38 kDa contiene un sitio de unión de gran afinidad para los linfocitos T. Los linfocitos T no se adhirieron al fragmento N-terminal de 29 kDa que contiene el dominio Hep I de la fibronectina plasmática. En general, las células PBL recién obtenidas mostraron un modelo de unión similar a la de las células Jurkat o Molt 4 y la capacidad de las células PBL recién obtenidas para fijarse al fragmento de 80 kDa estaba relacionada con la expresión de $\alpha 5\beta 1$. Otras líneas de células hematopoyéticas como las K562 (figura 6) mostraron una clara preferencia por el fragmento de fibronectina plasmática de 80 kDa, mientras que las células RD expresaron una adhesión promiscua a todos los fragmentos de fibronectina plasmática ensayados, excepto al fragmento N-terminal de 29 kDa. El RGDS (1 mg/ml) inhibió parcialmente (50%) la adherencia de células Jurkat a la fibronectina intacta y totalmente (100%) su adherencia al fragmento de 80 kDa. La adherencia de las células Jurkat al fragmento de 38 kDa no resultó afectada por el RGDS (hasta 1 mg/ml).

Como hemos demostrado previamente (tabla 3 y figura 1), los anticuerpos monoclonales de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ inhibieron parcialmente la adherencia de los linfocitos T a la fibronectina plasmática intacta (figura 7, parte superior). Tal como cabía esperar, el P1D6 inhibió completamente la adherencia de las células T al fragmento de 80 kDa que contiene la secuencia de unión RGD (figura 7, en medio). El P1D6 no inhibió la adherencia de los linfocitos T a los fragmentos de 38 kDa (figura 7, parte inferior) o de 58 kDa. En cambio, el P4C2 inhibió completamente la adherencia de los linfocitos T al fragmento de 38 kDa y no tuvo ningún efecto en la adherencia al fragmento de 80 kDa (figura 7). Asimismo, el P4C2 pudo inhibir la adherencia de los linfocitos T al fragmento de 58 kDa, que también lleva Hep II. En cualquier caso, otras líneas celulares de linfocitos T que expresan tanto el $\alpha 4\beta 1$ como el $\alpha 5\beta 1$ (por ejemplo, células Jurkat) se comportan exactamente igual que las células Molt 4 (figura 7). Como se ha visto en la tabla 4, las células K562 expresan solo el $\alpha 5\beta 1$. La adherencia de las células K562 a los fragmentos de 38 kDa (figura 6) y de 58 kDa fue muy reducida, en comparación con su adherencia al fragmento de 80 kDa (figura 6). El P1D6 pudo inhibir completamente la adherencia de estas células a la fibronectina plasmática intacta (figura 1) o al fragmento de 80 kDa. Por otro lado, las células YT, que no expresan $\alpha 5\beta 1$ (tabla IV), se adhieren de modo insuficiente a la fibronectina plasmática intacta y al fragmento de 80 kDa (figura 6). Estas células tardan 2-3 veces más que las células Jurkat o Molt 4 en adherirse a las superficies recubiertas de fibronectina plasmática. Las células YT, sin embargo, se adhieren eficazmente, en función de la dosis, al fragmento de 38 kDa (figura 6) y esta adherencia pudo ser inhibida completamente por el P4C2. Estos datos indican una correlación directa entre la expresión del $\alpha 4\beta 1$ y la capacidad de unión a los fragmentos de fibronectina plasmática que contienen las regiones Hep II y IIICS. Además, estos datos demuestran inequívocamente que el $\alpha 4\beta 1$ actúa como el receptor para este dominio alternativo de unión celular.

6.2.5. *El $\alpha 4\beta 1$ es el receptor de los linfocitos para los CS-1*

La región IIICS presente en la cadena A de la fibronectina plasmática (figura 5) contiene al menos dos sitios responsables de la adhesión celular a la fibronectina (Humphries y otros, 1986, J. Cell Biol., 103:2637-2647; Humphries y otros, 1987, J. Biol. Chem., 262:6886-6892; Humphries y otros, 1988, J. Cell Biol., 106:1289-1297). Utilizando una serie de péptidos sintéticos solapados, extendidos por toda la región IIICS (péptidos CS), Humphries y sus colaboradores demostraron que los péptidos CS-1 (N-terminales) llevan unas secuencias de adhesión reconocidas por células de melanoma de ratón (Humphries y otros, 1986, 1987). Nosotros hemos demostrado aquí que el fragmento de 38 kDa contiene un sitio de adhesión muy afín, reconocido por los linfocitos T humanos, y que el $\alpha 4\beta 1$ es el receptor que interviene en la adhesión de los linfocitos T al fragmento de 38 kDa. Este fragmento no contiene el sitio CS-5, pero sí que lleva la región CS-1 completa (García-Pardo y otros, 1987, Biochem. J., 241:923-928), que ha sido definida como un sitio de adhesión muy afín para las células de melanoma (Humphries y otros, 1987, J. Biol. Chem., 262:6886-6892). Por tanto, era interesante determinar si los linfocitos T reconocían la CS-1 y se fijarían a ella, y si el $\alpha 4\beta 1$ era el receptor implicado en esta interacción.

Los linfocitos T (células Jurkat o Molt 4) reconocen y se unen a superficies de plástico recubiertas de CS-1 (conjugado de IgG de conejo) (tabla VI). Los linfocitos T (Jurkat) no se fijan a superficies recubiertas de CS-2 (conjugado de IgG de conejo) ni a superficies de plástico recubiertas con el IgG de conejo solo. Además, los anticuerpos monoclonales del $\alpha 4\beta 1$ (P4C2) inhibieron completamente la adherencia de los linfocitos T a la CS-1, mientras que los anticuerpos del $\alpha 5\beta 1$ (P1D6) no tuvieron ningún efecto (tabla VI). Tal como hemos demostrado antes, los anticuerpos del $\alpha 4\beta 1$ inhibieron total y específicamente la adhesión de los linfocitos T al fragmento de 38 kDa (tabla VI), mientras que los anticuerpos del $\alpha 5\beta 1$ inhibieron específicamente la adhesión al fragmento de 80 kDa que contiene el RGD.

ES 2 210 225 T3

TABLA VI

Inhibición de la adherencia de los linfocitos T al péptido CS-1 con anticuerpos monoclonales del $\alpha 4\beta 1$

Ligando	IgG	Anticuerpo P4C2	P1D6
80 kDa	8580 \pm 214	7154 \pm 398	202 \pm 105
38 kDa	22680 \pm 1014	114 \pm 78	24917 \pm 352
CS-1	44339 \pm 513	841 \pm 555	42897 \pm 728
CS-2	2576 \pm 214	535 \pm 258	435 \pm 168

6.3. Discusión

Empleando la tecnología de los anticuerpos monoclonales (Wayner, E.A., Carter, W.G., Piotrowicz, R. y T.J. Kunicki, 1988, *J. Cell Biol.*, 10:1881-1891) hemos identificado un nuevo receptor de fibronectina, el $\alpha 4\beta 1$. Los anticuerpos monoclonales P3E3, P4C2 y P4G9 reconocieron los epítomos de la subunidad $\alpha 4$ e inhibieron la adherencia de linfocitos T de sangre periférica y de cultivo a un fragmento tríptico de 38 kDa de la fibronectina plasmática que contenía el dominio de Heparina II carboxi-terminal y parte del segmento conector de tipo III (IIICS). El ligando para el $\alpha 4\beta 1$ en el IIICS fue la región CS-1, antes definida como un sitio de adherencia para las células de melanoma. Los anticuerpos monoclonales definidos funcionalmente para $\alpha 4$ inhibieron parcialmente la adhesión de los linfocitos T a la fibronectina plasmática intacta y no tuvieron efecto en su fijación a un fragmento tríptico de 80 kDa portador de la secuencia adherente RGD. Los anticuerpos monoclonales (P1D6 y P1F8) del receptor de fibronectina antes descrito, $\alpha 5\beta 1$, inhibieron totalmente la adhesión de los linfocitos T al fragmento de 80 kDa, pero no afectaron a su fijación al fragmento de 38 kDa o al CS-1. Tanto el $\alpha 4\beta 1$ como el $\alpha 5\beta 1$ se localizaron en las adhesiones focales, cuando se cultivaron los fibroblastos que expresan estos receptores sobre superficies recubiertas de fibronectina. Estos hallazgos demostraron una interacción específica de ambos receptores con la fibronectina en los contactos focales.

Recientemente, Bernardi y otros, 1987, *antes citado*; Liao y otros, 1987, *Exp. Cell Res.*, 171:306-320; Liao y otros, 1989, *Exp. Cell Res.*, 181:348-361 reportaron que algunas líneas celulares de linfocitos B se fijan a una región de la fibronectina plasmática situada dentro del dominio Hep II carboxi-terminal. Liao y otros, 1987, *antes citado* identificaron un receptor parecido a integrina en las células B. Sin embargo, no queda claro si la proteína que describieron era $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ o $\alpha 5\beta 1$. Bernardi y otros, 1987, *antes citado* también identificaron receptores de fibronectina expresados por linfocitos B. Curiosamente, en este estudio, las células B que se fijaban a fragmentos portadores de Hep II expresaron un receptor similar al $\alpha 4\beta 1$, mientras que las células que se fijaban al dominio de unión celular portador de RGD expresaron un receptor similar al $\alpha 5\beta 1$. No obstante, con estos datos tampoco se pudo identificar claramente el receptor implicado en la fijación. En conjunto, los resultados de estos informes precedentes y los presentes hallazgos aportan pruebas evidentes de i) la existencia de un dominio de adhesión alternativo en la región carboxi-terminal de la fibronectina plasmática y ii) el papel que juega el $\alpha 4\beta 1$ como receptor para este sitio de adhesión alternativo. Será interesante determinar las secuencias exactas de aminoácidos, responsables de la interacción del $\alpha 4\beta 1$ con la fibronectina. Dado que ni los fragmentos de 38 o 58 kDa ni el CS-1 contienen una secuencia RGD (Kornblihtt y otros, 1985, *antes citado*; García-Pardo, 1987, *antes citado*; Humphries y otros, 1986, *antes citado*; y Humphries y otros, 1987, *antes citado*), es evidente que el análisis del ligando para el $\alpha 4\beta 1$ identificará una nueva secuencia de aminoácidos, importante para la adhesión celular a la fibronectina. Como el fragmento de 38 kDa no contiene CS-5 (García-Pardo, 1987, *antes citado*), la secuencia mínima de aminoácidos responsable de la adhesión de los linfocitos T al 38 kDa, y por consiguiente el ligando para el $\alpha 4\beta 1$ en dichas células, no es arg-glu-asp-val o REDV (Humphries y otros, 1986, *antes citado*).

Como en $\alpha 2\beta 1$, la subunidad $\alpha 4$ está débilmente asociada con la subunidad $\beta 1$. Los datos aquí presentados (figura 2) y nuestros hallazgos anteriores (Wayner, E.A. y Carter, W.G., 1987, *antes citado*, y Wayner y otros, 1988, *antes citado*), demuestran que los anticuerpos monoclonales definidos funcionalmente para $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ interactúan de manera selectiva con epítomos presentes en las subunidades α , en base a la inmunoprecipitación de $\alpha 2$ o $\alpha 4$ sin $\beta 1$, tras la disociación de las subunidades. Estos resultados indican que solo la subunidad α determina la especificidad de la unión al ligando para cada complejo α - β . Esta idea la confirman las observaciones aquí presentadas de que $\alpha 5$ y $\alpha 4$, ambas complejadas con $\beta 1$, intervienen en la adhesión a diferentes puntos de la fibronectina, con lo cual no se sugiere que la subunidad β no tenga importancia en la fijación, sino que la especificidad de la interacción receptor-ligando viene determinada por α o por un complejo α - β único.

Es curioso que, si bien las células LAK expresaron gran cantidad de $\alpha 4\beta 1$ en la superficie celular, no parecía ser un receptor funcional; el P1D6 inhibió totalmente la adhesión de las células LAK a la fibronectina. Esto podría ser debido a que las células LAK expresan una forma degradada de $\alpha 4$ (véase la figura 2). Además, como están activadas, las células LAK sobreexpresan $\alpha 5\beta 1$ en comparación con la sangre periférica en reposo o con las células T leucémicas (tabla VIII). En otras células que expresan mayores cantidades del $\alpha 5\beta 1$ que del $\alpha 4\beta 1$ (K562-1 y HT1080) es dominante la adhesión vía $\alpha 5\beta 1$ al dominio de 80 kDa portador de RGD (ver células K562-1, figura 6). Esto implica que la regulación de la expresión del receptor determina la capacidad de una célula para reconocer y fijarse a distintos sitios de la fibronectina. Además, también podría ser que la coexpresión de los dos receptores de fibronectina

incrementara la avidéz de la unión celular, por ejemplo, las células Jurkat y RD expresan una adhesión bastante promiscua a la fibronectina en comparación con las células YT, que solo expresan $\alpha 4\beta 1$.

La regulación de la adherencia celular a la fibronectina es potencialmente compleja, incluso en las condiciones más simples posibles, suponiendo que el $\alpha 5\beta 1$ y el $\alpha 4\beta 1$ funcionan independientemente entre sí y no se solapan durante la interacción con los dos sitios de fijación a la fibronectina. El cambio de este estado sencillo ofrece oportunidades para una regulación fina y sensible de la adherencia celular. Al nivel menos complejo, esta regulación puede catalogarse aproximadamente como i) procesos que controlan la síntesis y/o la exposición de los sitios de fijación en el ligando y ii) regulación de la expresión funcional de los receptores. Se dispone de ejemplos corrientes de regulación a ambos niveles, incluyendo la observación de que los linfocitos y los antígenos específicos inducen la expresión de $\alpha 5\beta 1$ en los linfocitos T, seguida de una mayor adherencia de las células a la fibronectina (Wayner y otros, 1988, antes citado). Además, el control del empalme del mRNA en la región IIICS de la fibronectina (Kornblihtt y otros, 1985, antes citado) durante la curación o la inflamación de heridas puede imponer la especificidad de la unión receptor-ligando en las células T en reposo o activadas. Las variaciones del estado sencillo son interesantes, pero requieren experimentación adicional, para identificar al menos el gran número de mecanismos potenciales.

En conclusión, dichos hallazgos demuestran claramente que los linfocitos T cultivados emplean dos receptores independientes durante la fijación a la fibronectina y que i) el $\alpha 5\beta 1$ es el receptor para el dominio de unión celular portador de RGD, y ii) el $\alpha 4\beta 1$ es el receptor para una región de unión celular carboxi-terminal que lleva los dominios Heparina II y IIICS. Asimismo, estos datos demuestran que los linfocitos T expresan una clara preferencia por una región molecular heterogénea en el IIICS (CS-1), generada por empalme alternativo del pre-mRNA de la fibronectina, y que el $\alpha 4\beta 1$ es el receptor para este sitio adherente.

7. Ejemplo

La adherencia de los linfocitos al endotelio activado tiene lugar mediante la fijación del receptor de integrina $\alpha 4\beta 1$ al CS-1 de la región IIICS alternativamente empalmada de la fibronectina

Los ensayos siguientes demostraron el papel del receptor $\alpha 4\beta 1$ y de su ligando CS-1 como mediadores en la adhesión de los linfocitos T a células endoteliales de grandes vasos, cultivadas, y a células endoteliales que se han activado con varias citocinas relacionadas con la respuesta inflamatoria, incluyendo la IL-1 y los factores de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y beta ($TNF\beta$). Además se demostró la capacidad de los anticuerpos monoclonales y de los fragmentos peptídicos para bloquear la adherencia de los linfocitos al endotelio mediante el receptor $\alpha 4\beta 1$.

7.1. Materiales y métodos

7.1.1. Reactivos

Los reactivos empleados fueron los descritos en la sección 6.1.1, véase arriba.

7.1.2. Células y cultivo celular

Las células Jurkat (células T de leucemia humana) se obtuvieron del Dr. Paul Conlon (Immunex. Corp., Seattle, WA), las células Ramos (células B de leucemia humana) del American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las líneas celulares B LAD (adhesión deficiente de leucocitos) y ST-1 se prepararon por transformación vírica de Epstein-Barr de linfocitos B humanos. La línea celular LAD se desarrolló partiendo de las células B de un paciente con una deficiencia en la familia de integrinas $\beta 2$ de los receptores de adherencia y se obtuvo del Dr. John Harlan (Harborview Medical Center, Seattle, WA). Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVES) se compraron a Cell Systems, Seattle, WA y se mantuvieron en medios definidos, adquiridos también a Cell Systems (CS-100®).

7.1.3. Activación de HUVES con citocinas inflamatorias

Se incubaron HUVES con IL-1 β (1 ng/ml) o, en algunos ensayos, con $TNF\alpha$ (10 ng/ml) durante 6-24 horas. Al final de esta incubación se lavaron los monocapas de HUVE y se usaron en el ensayo de adherencia.

7.1.4. Síntesis de péptidos CS

Se sintetizaron péptidos derivados de la región CS-1 de la fibronectina plasmática y se purificaron por HPLC siguiendo los procedimientos estándar del Dr. James Blake, del Oncogen Corp., Seattle, WA. El péptido CS-1 se conjugó con albúmina de suero de conejo o KLH, también según los procedimientos estándar del Dr. James Blake. El péptido de control RGDS se adquirió a Península Laboratories (Belmont, CA).

7.1.5. Anticuerpos monoclonales

En este laboratorio se desarrollaron los siguientes anticuerpos: P1H5, que reconoce el receptor $\alpha 2\beta 1$ (Wayner y otros, 1987, *J. Cell Biol.*, 105:1873-1884; Wayner y otros, 1988, *J. Cell Biol.*, 107:1881-1891); P1B5, que reconoce el receptor $\alpha 3\beta 1$ (antes citado); P1D6, que reconoce el receptor prototípico de fibronectina $\alpha 5\beta 1$ descrito por Pytela y otros, 1985 (*Cell*, 40:191-198); P4C10, que reconoce la subunidad $\beta 1$; y P4H9, que reconoce la subunidad $\beta 2$ (CD18),

ES 2 210 225 T3

mediante métodos descritos completamente en Wayner y otros (1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884) y Wayner y otros (1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891) y resumidos en la tabla II.

7.1.6. Ensayo de adherencia a las células endoteliales

Se incubaron (del modo arriba descrito) células endoteliales de vena umbilical humana (HUVes) en placas de 48 pocillos. Para medir la adhesión de los linfocitos a los cultivos monocapa de HUVE, los linfocitos se marcaron con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (50 μl Ci/ml durante 2-4 horas), se lavaron y luego se incubaron 10^5 linfocitos con monocapas HUVE, en presencia o ausencia de anticuerpos inhibidores o péptidos derivados de CS-1. Se dejó durante 30 minutos a 37°C que se adhirieran los linfocitos. A continuación se eliminaron las células no adheridas, lavando con PBS, y las células adheridas se disolvieron en SDS/NaOH. Se cuantificaron los cpm de ^{51}Cr fijado en un contador gamma. En algunos ensayos, las células endoteliales se activaron, antes de la prueba de adherencia, con IL-1 β (1 ng/ml) o con TNF- β (10 ng/ml) durante 6-24 horas en medios CS-100[®] definidos (Cell Systems, Seattle, WA).

7.2. Resultados

7.2.1. Fenotipo superficial de los linfocitos de pacientes normales y pacientes con LAD

Para establecer qué mecanismo utilizan los linfocitos durante la extravasación, primero determinamos el fenotipo superficial de linfocitos normales y linfocitos LAD respecto a los receptores de integrina. Estos datos se incluyen en la tabla VII y demuestran claramente que las células LAD poseen un fenotipo superficial de célula normal respecto a las integrinas que contienen $\beta 1$. Como era de esperar, las células B procedentes del paciente con LAD fueron negativas para $\beta 2$, lo cual sugiere de modo convincente que los linfocitos LAD usan las integrinas portadoras de $\beta 1$ durante su adherencia y paso a través del endotelio.

TABLA VII

Análisis por fluorescencia de la expresión de receptores de integrina por linfocitos normales y LAD

Receptor	Anticuerpo	Jurkat (T)	Intensidad de fluorescencia ^a			LAD
			Ramos (B)	ST-1		
β_2	P4H9	+	+	++	-	
β_1	P4C10	+++	++	+	+	
α_2	P1H5	++	+	++	+	
α_3	P1B5	-	-	-	-	
α_4	P4G9	+++	++	++	++	
α_5	P1D6	+	+/-	+/-	+/-	

^a La intensidad de fluorescencia se determinó mediante una escala logarítmica de tres décadas y se expresa en unidades arbitrarias, en que cada signo más indica 50 unidades de 0-255 (número de canales). Un más/menos indica un desplazamiento definido y reproducible sobre el fondo (< 50 unidades).

TABLA VIII

Adherencia de linfocitos T y B a monocapas HUVE en reposo y activadas

Línea celular	Adherencia (cpm) ^a	
	Basal	IL-1 β
LAD (B)	29360	94580
ST-1 (B)	11572	143860
Ramos (B)	1088	11168
Jurkat (T)	74196	352028
YT (T)	43396	189384

^a cpm = cuentas por minuto. Los datos son de un solo ensayo representativo.

7.2.2. Capacidad de los linfocitos para adherirse a células endoteliales en reposo y activadas

Se ensayó la capacidad de unos linfocitos marcados con cromo, procedentes de varias líneas celulares, para adherirse a células endoteliales en reposo o activadas (tabla VIII). Si bien se encontró que todas las líneas celulares ensayadas se adherían en cierto grado al endotelio en reposo, se observó que la adhesión de los linfocitos T y B al

endotelio activado con IL-1 o TNF era mucho mayor, hasta unas diez veces más. La adhesión al endotelio de los linfocitos de pacientes con LAD no resultó muy distinta de la observada para las líneas celulares ST-1 obtenidas de células B normales (ST-1). No se vio ninguna diferencia entre las líneas celulares, al comparar su adherencia al endotelio activado con IL-1 o TNF.

5

7.2.3. Efectos de los anticuerpos anti-receptor en la adherencia de los linfocitos al endotelio

Al investigar la capacidad los linfocitos marcados con cromo para adherirse al endotelio en presencia de sobrenadantes de hibridoma, se encontró que solo inhibían la adherencia los anticuerpos monoclonales dirigidos a $\alpha 4\beta 1$ o $\beta 1$; los anticuerpos monoclonales dirigidos a otros receptores, tales como el receptor prototipo de fibronectina y el receptor $\alpha 3\beta 1$, no mostraron casi ningún efecto inhibitorio (tabla IX). En presencia de los anticuerpos monoclonales P4C2 (dirigido al $\alpha 4\beta 1$) y P4C10 (dirigido a $\beta 1$), la adhesión de los linfocitos marcados al endotelio fue totalmente suprimida. Curiosamente, la adherencia de las células LAD también fue inhibida por el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 1$ [P4C2], lo cual indica que el receptor CD18 no intervenía en las propiedades de adhesión observadas. Además, aunque los linfocitos expresan $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ (tabla VIII) y $\beta 2$ (no representado), los anticuerpos de estos receptores no inhibieron la adhesión de los linfocitos a las HUVEs basales o activadas (véase tabla IX). Estos datos demuestran que la expresión en la superficie de un receptor de integrina y su fijación a un anticuerpo inhibitorio no causa necesariamente la inhibición de la adherencia de linfocitos al endotelio. Esto implica que el $\alpha 4\beta 1$ juega un papel específico de mediador en la adhesión de los linfocitos al endotelio, como primer paso de la extravasación. Además, como los anticuerpos contra $\alpha 4\beta 1$ inhibían la adherencia de los linfocitos a las células endoteliales, esto sugirió que el ligando para $\alpha 4\beta 1$, la secuencia de aminoácidos EILDVPST (tabla XII), también podía intervenir en la diapédesis de los linfocitos mediante la fijación del $\alpha 4\beta 1$ a esta secuencia, presente en un ligando expresado en la superficie del endotelio.

TABLA IX

Efecto de los anticuerpos monoclonales inhibidores en la adherencia de los linfocitos a monocapas HUVE (activados con IL-1 β)

25

Línea celular	Anticuerpo	Especificidad	Adherencia (cpm)	
			Basal	+IL-1 β
LAD (B)	SP2	-	19542	104672
	P1D6	$\alpha_5\beta_1$	15688	113696
	P1B5	$\alpha_2\beta_1$	19064	90912
	P4C2	$\alpha_4\beta_1$	6458	38132
	P4C10	β_1	6360	52552
Ramos (B)	SP2	-	972	12157
	P1D6	$\alpha_5\beta_1$	808	11196
	P1B5	$\alpha_2\beta_1$	124	10028
	P4C2	$\alpha_4\beta_1$	456	3688
	P4C10	β_1	604	3152
Jurkat (T)	SP2	-	83924	372159
	P1D6	$\alpha_5\beta_1$	83956	417588
	P1B5	$\alpha_2\beta_1$	66580	489952
	P4C2	$\alpha_4\beta_1$	23108	136632
	P4C10	β_1	36892	230416

65

ES 2 210 225 T3

7.2.4. Función del CS-1 como ligando para $\alpha_5\beta_1$ en la adherencia de los linfocitos al endotelio

Usando varios péptidos, se evaluó la capacidad del CS-1 sintético y de péptidos derivados, para inhibir la adherencia de los linfocitos marcados con cromo a células endoteliales activadas. El péptido CS-1 sintético fue un inhibidor fuerte de la adherencia de los linfocitos T o B a monocapas de células endoteliales basales o activadas (tablas X y XI). Curiosamente, la secuencia EILDVPST fue también el mínimo péptido requerido para inhibir la adhesión de los linfocitos a HUVEs en reposo o activadas (tablas X y XI). En algunos casos, como con la línea celular Ramos B, la adhesión de estas células a las HUVEs pudo suprimirse totalmente con el péptido EILDVPST. En los ensayos de control (tabla XI), la secuencia RGDS, que es el ligando para el receptor prototipo de la fibronectina, $\alpha_5\beta_1$, no inhibió la adherencia de los linfocitos a las HUVEs en reposo o activadas.

TABLA X

Efecto del CS-1 y de péptidos derivados de CS-1 en la adherencia de los linfocitos a HUVEs

Línea celular	Péptido #	Secuencia	Adherencia (cpm)	
			Basal	+IL-1 β
LAD (B)	293A	no relacionada	20856	74096
	344	CS-1	17500	26172
	350	VPST	ND ^a	42728
	352	EILDVPST	ND	29484
	354	GPEILDVPST	ND	27219
Ramos (B)	293A	no relacionada	4856	11132
	344	CS-1	1660	2828
	350	VPST	ND	4568
	352	EILDVPST	ND	2584
	354	GPEILDVPST	ND	2265
Jurkat (T)	293A	no relacionada	58084	129864
	344	CS-1	29568	75772
	350	VPST	ND	127544
	352	EILDVPST	ND	93056
	354	GPEILDVPST	ND	89721

^aND = no determinada

ES 2 210 225 T3

TABLA XI

Efecto del CS-1 y de péptidos derivados de CS-1 o del RGDS en la adherencia de los linfocitos a HUVEs

	Línea celular	Péptido #	Secuencia	Adherencia (cpm)	
				Basal	+IL-1 β
5					
10	Jurkat (T)	-	-	161092	314848
15		-	RGDS	298688	357616
		344	CS-1	82404	248976
20		350	VPST	203716	322208
		351	LDVPST	166948	326200
25		352	EILDVPST	84456	234796
30	LAD (B)	-	-	44860	71408
		-	RGDS	70652	102076
		344	CS-1	22976	51560
35		350	VPST	38176	98860
		351	LDVPST	39700	92792
40		352	EILDVPST	29964	58784
45	Ramos (B)	-	-	2724	12936
		-	RGDS	16920	28104
50		344	CS-1	1844	5160
		350	VPST	4168	15320
55		351	LDVPST	3532	15092
		352	EILDVPST	1696	4964
60					
65					

ES 2 210 225 T3

TABLA XII

Inhibición de la adherencia de los linfocitos a la fibronectina con péptidos derivados de CS-1-B-12

	Péptido	Secuencia	Inhibición
5	CS-1		+++
	A13	DELPLQLVTLPHPN	-
10	B12	LHGPEILDVPST	+++
	350	VPST	-
	351	LDVPST	-
	352	EILDVPST	+++
15	354	GPEILDVPST	+++

7.3. Discusión

Las observaciones experimentales (ver sección 6 arriba) indicaron totalmente que el sitio de unión de gran afinidad por los linfocitos T en la fibronectina plasmática estaba localizado en la región CS-1 del dominio IIICS. La región CS-1 consta de 25 aminoácidos (figura 9). Por tanto era importante determinar la secuencia mínima de péptidos, responsable de la fijación del receptor de linfocitos $\alpha 4\beta 1$ a la fibronectina. Como etapa inicial dividimos el péptido CS-1 en dos péptidos más pequeños, A13 y B12 (figura 9), y examinamos si uno de ellos podía competir con la fibronectina para fijar el $\alpha 4\beta 1$, inhibiendo por lo tanto la adherencia de los linfocitos a la fibronectina. Los datos indican claramente que la actividad inhibitoria reside en el péptido B12, derivado de la porción carboxi-terminal del CS-1. En la etapa siguiente investigamos la capacidad de péptidos cada vez más largos, derivados de la porción carboxi-terminal del B12, para inhibir la adherencia de los linfocitos a superficies recubiertas de fibronectina y CS-1 (conjugado con RSA). Estos datos demuestran que, tocante a la adhesión de los linfocitos a la fibronectina plasmática y al CS-1, la secuencia mínima de aminoácidos requerida para fijar $\alpha 4\beta 1$ es EILDVPST.

Los leucocitos polimorfonucleados (neutrófilos) de los pacientes con carencia de fijación de leucocitos (LAD) tienen un defecto en la expresión de la subunidad de integrina $\beta 2$ y, por consiguiente, no pueden utilizar los receptores que contienen $\beta 2$ (LFA-1, Mac-1 o p150/95) para adherirse al endotelio vascular. Así pues, los neutrófilos de estos pacientes no dejan la corriente sanguínea para pasar a los tejidos periféricos. Sin embargo los linfocitos LAD experimentan diapédesis para atravesar el endotelio y pueden hallarse en los tejidos procedentes de pacientes afectados de este trastorno. Esto, por tanto, implica que los linfocitos usan un mecanismo distinto al de las integrinas portadoras de $\beta 2$ durante su paso de la corriente sanguínea hacia los tejidos periféricos. La siguiente serie de ensayos comprende nuestras tentativas para entender completamente el mecanismo usado por los linfocitos de la sangre periférica durante la diapédesis.

Los ensayos arriba descritos han demostrado claramente el importante papel que juega el receptor $\alpha 4\beta 1$ en la adherencia de los linfocitos a las células endoteliales vasculares.

Se demostró por análisis de fluorescencia que todas las líneas de células linfocitarias ensayadas expresaban $\alpha 4\beta 1$ y/o $\alpha 5\beta 1$, y se adherían a células endoteliales de vena umbilical humana, cultivadas. Se halló que esta adherencia solo la bloqueaban los anticuerpos monoclonales dirigidos al $\alpha 4\beta 1$, y que los anticuerpos dirigidos hacia otros receptores no poseían esencialmente ningún efecto inhibitorio, revelando la importancia del receptor $\alpha 4\beta 1$ en la interacción adherente entre los linfocitos y el endotelio.

Además se encontró que el CS-1 sintético y los péptidos derivados (tablas 9, 10 y 11) inhibían la adherencia de linfocitos al endotelio. Se halló que la secuencia de aminoácidos EILDVPST era particularmente importante para la interacción. Debe recalarse que no se ha determinado si el receptor de los linfocitos $\alpha 4\beta 1$ interactúa realmente con la fibronectina en la superficie de las células endoteliales. También es posible que el $\alpha 4\beta 1$ reconozca el péptido EILDVPST o bien una secuencia parecida, en el contexto de otra proteína diferente de la fibronectina.

8. Depósito de líneas celulares

Se han depositado las siguientes líneas celulares en el ATCC de Rockville, MD, y se les han asignado los siguientes números de registro:

Línea celular	Número de registro
P4C2	HB-10215
P4G9	HB-10213
P3E3	HB-10212
P4C10	HB-10214

ES 2 210 225 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo, o de un fragmento o derivado del mismo, que se fija al receptor $\alpha 4\beta 1$ e inhibe la adherencia de las células hematopoyéticas nucleadas a las células del endotelio vascular, para la preparación de una composición farmacéutica de uso en mamíferos, destinada a la supresión de una respuesta inmune.
2. El uso según la reivindicación 1, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en que el anticuerpo se fija a la subunidad $\alpha 4$ del receptor $\alpha 4\beta 1$.
4. El uso según la reivindicación 2 ó 3, en que el anticuerpo monoclonal es el P4C2, producido por el hibridoma depositado en el banco de la American Type Culture Collection con el número de registro HB 10215.
- 15 5. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en que el anticuerpo se fija a la subunidad $\beta 1$ del receptor $\alpha 4\beta 1$.
6. El uso según la reivindicación 2 ó 5, en que el anticuerpo monoclonal es el P4C10, producido por el hibridoma depositado en el banco de la American Type Culture Collection con el número de registro HB 10214.
- 20 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el fragmento del anticuerpo es un Fab, Fab' o F(ab')₂.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el derivado del anticuerpo es un anticuerpo quimérico o una región recombinante de unión al antígeno.
- 25 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la supresión de la respuesta inmune es un tratamiento para la alergia, el asma o un estado inflamatorio crónico de la piel.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la composición farmacéutica está formulada para administración subcutánea, intramuscular, intravascular, intravenosa, intraarterial, intranasal, oral, intraperitoneal, intratraqueal o intratecal.
- 30 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la célula hematopoyética nucleada es un linfocito o un monocito.
- 35 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el mamífero es humano.
13. Proceso de preparación de una composición farmacéutica para suprimir una respuesta inmune en un mamífero, **caracterizado** porque como constituyente esencial de dicha composición farmacéutica se utiliza un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo, tal como está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 40

45

50

55

60

65

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

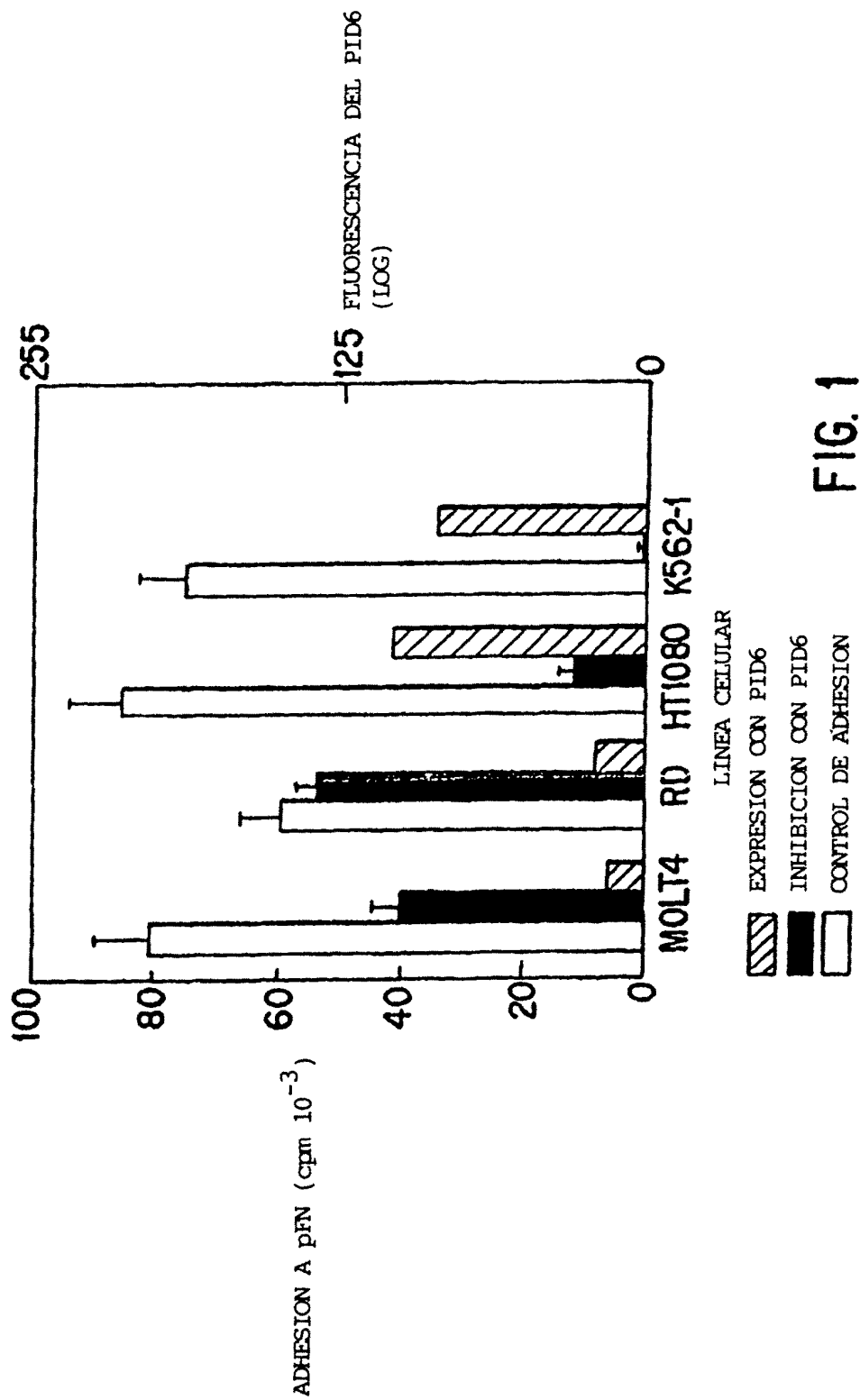


FIG. 2

NO REDUCIDO

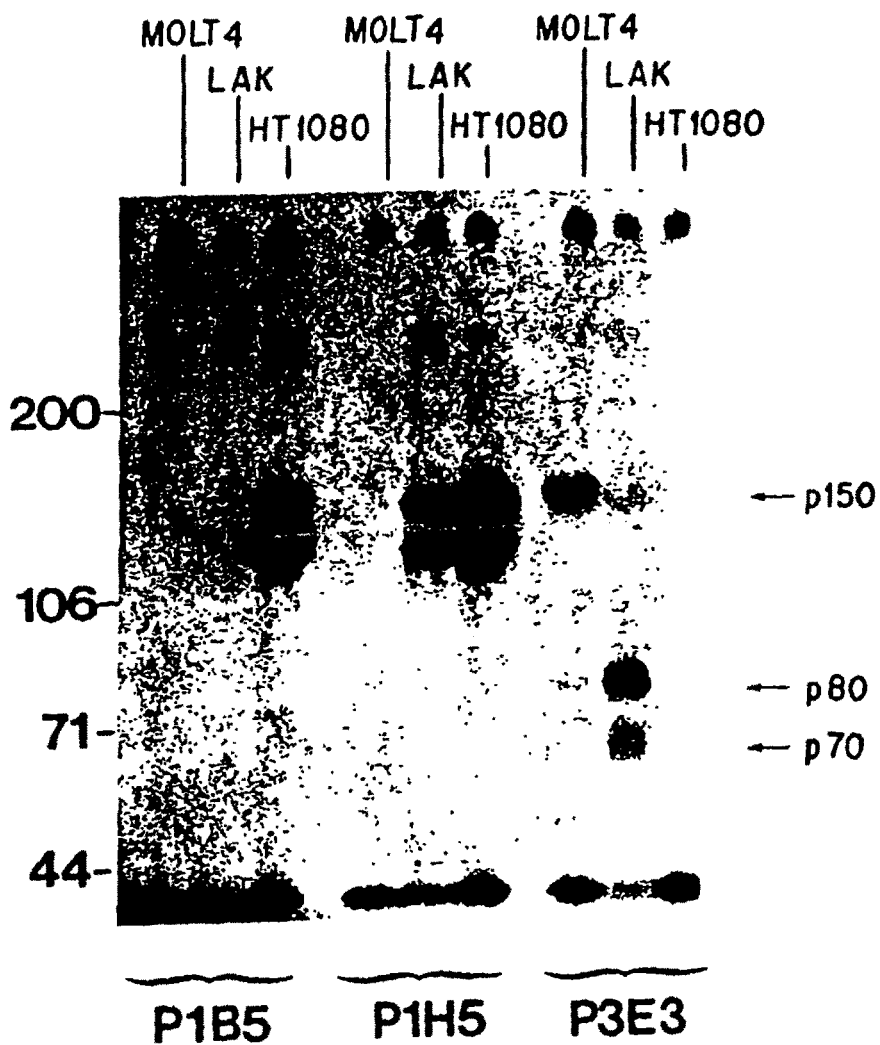


FIG. 3

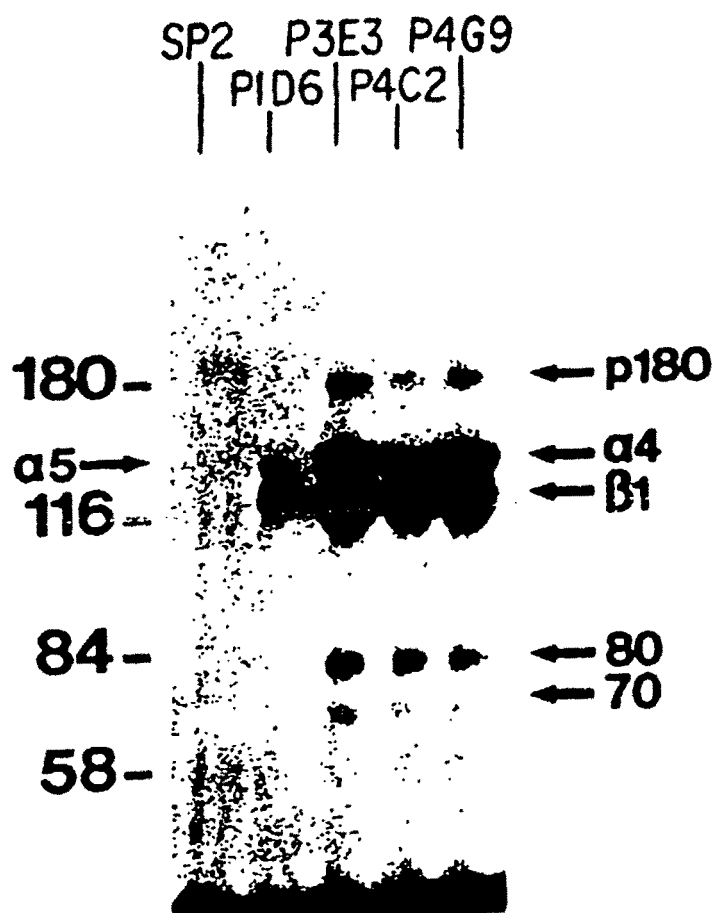


FIG. 4 A



FIG. 4 B

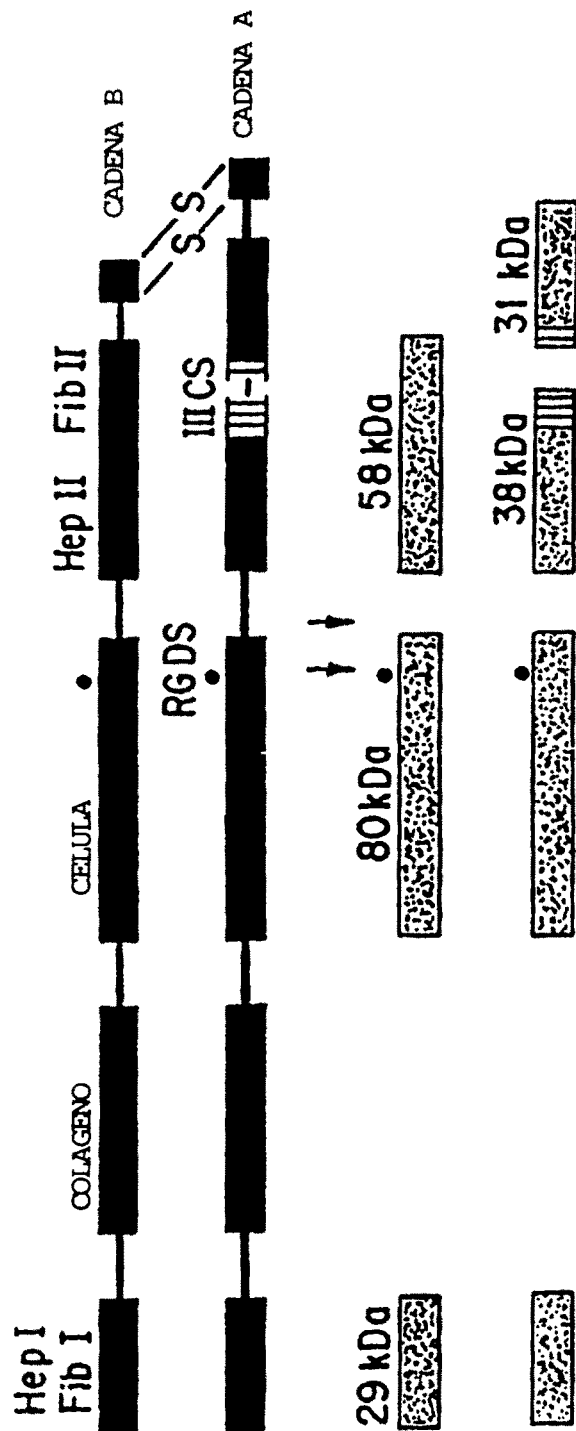


FIG. 4 C



FIG. 4 D





ESTRUCTURA DE LOS DOMINIOS DE LA FIBRONECTINA PLASMATICA

FIG.5A

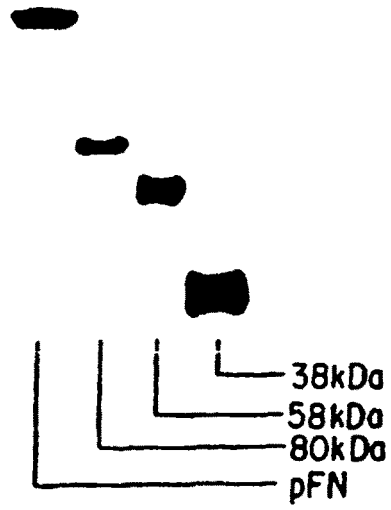


FIG. 5 B

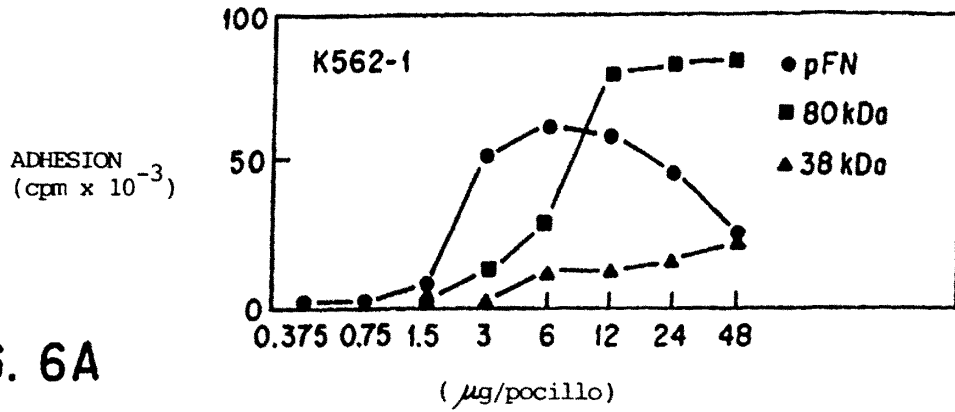


FIG. 6A

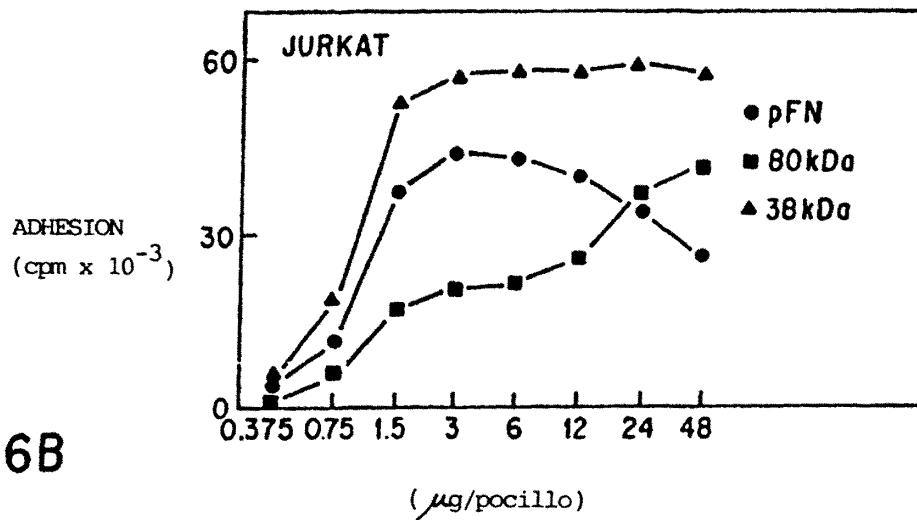


FIG. 6B

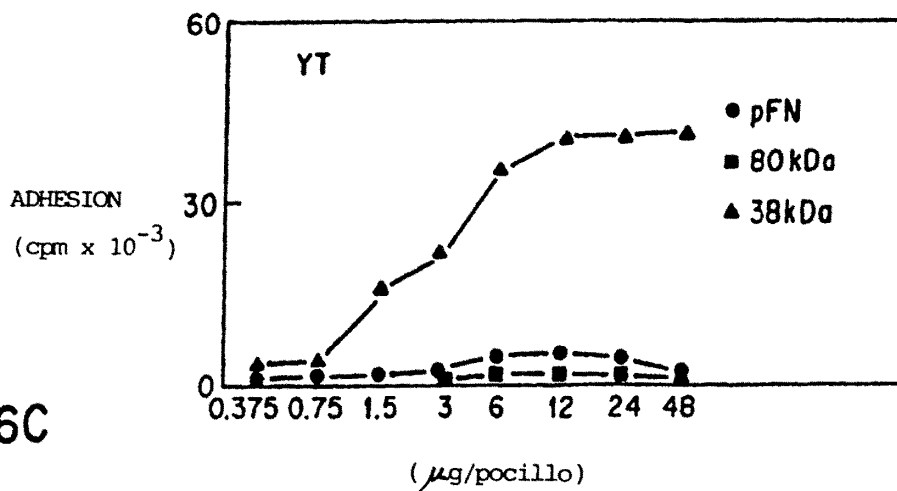
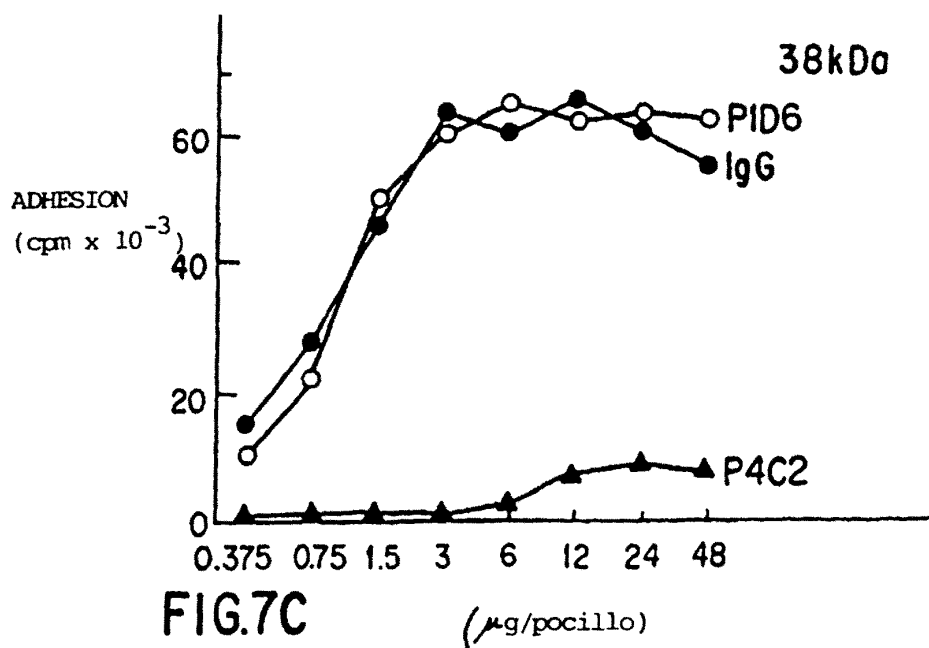
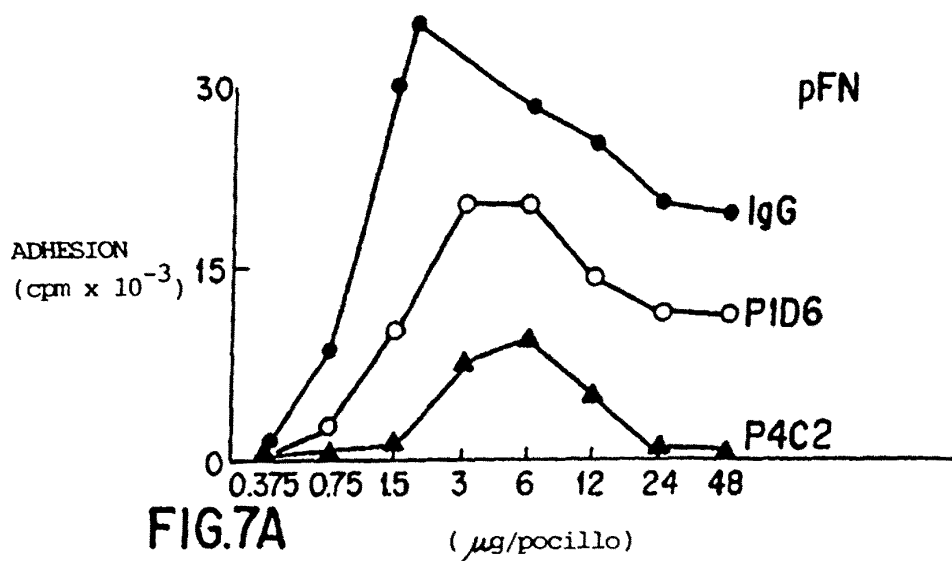


FIG. 6C



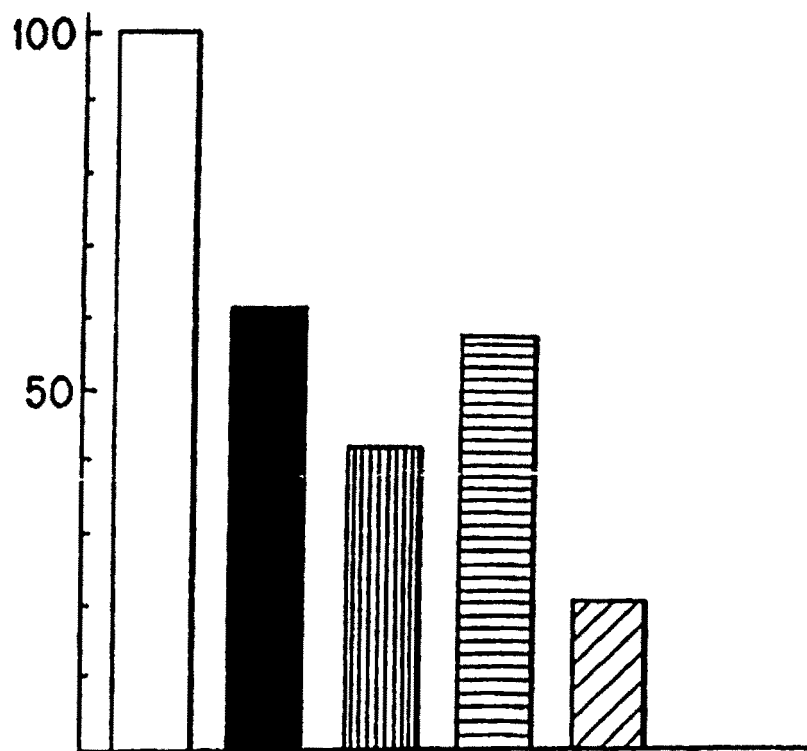


FIG. 8

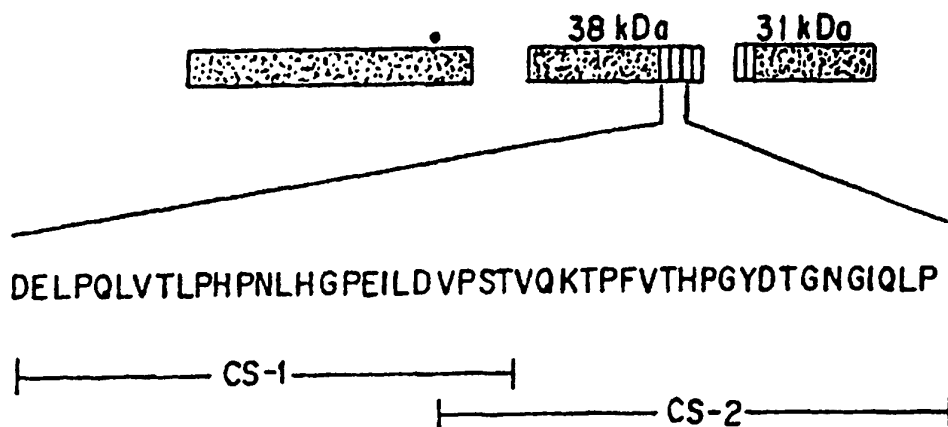


FIG. 9A

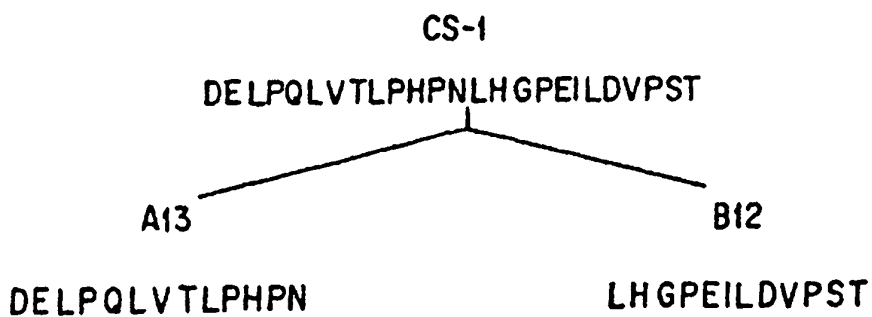


FIG. 9B