

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 419**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01920325 .6**
96 Fecha de presentación: **13.03.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1276500**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2003**

54 Título: **BLOQUEO DE LA MIGRACIÓN DE LEUCOCITOS Y DE LA INFLAMACIÓN POR INTERFERENCIA CON CD99/HEC2.**

30 Prioridad:
13.03.2000 US 188804 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2011

73 Titular/es:
**CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
20 THORNWOOD DRIVE, SUITE 105
ITHACA, NY 14850, US**

72 Inventor/es:
**MULLER, William, A. y
SCHENKEL, Alan, R.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 419 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

Bloqueo de la migración de leucocitos y de la inflamación por interferencia con CD99/HEC2

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la inhibición de procesos inflamatorios, en particular, a la modulación de la migración transendotelial de leucocitos, y a composiciones para bloquear la migración transendotelial de leucocitos.

Antecedentes de la invención

Las referencias citadas a lo largo de esta memoria descriptiva con números se indican al final de los Ejemplos en la sección "REFERENCIAS"

10 Ciertos estudios previos (1-1.2) han demostrado un papel crucial de la molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales-1 [PECAM] en la migración transendotelial [MTE] de los neutrófilos [PMN], monocitos [Mo] y células asesinas naturales [NK]. Sin embargo, incluso en las circunstancias más favorables, los reactivos anti-PECAM bloquean únicamente un 80-90 % de la entrada de leucocitos. Aunque éste es un bloqueo de la inflamación tan bueno o mejor que el que se ha conseguido fijando como objetivo una sola molécula, el 10-20 % residual de leucocitos que no se bloquean puede representar una población clínicamente significativa en condiciones crónicas.

15 Además, hay al menos algunos modelos inflamatorios en los que parece no intervenir PECAM. Lo que es más importante para la presente invención es que puede haber etapas en la MTE que están mediadas por moléculas distintas de PECAM, que aún no se han descubierto.

Migración de leucocitos en la inflamación

20 La migración de leucocitos a un sitio de inflamación implica varias etapas mediadas por varias familias de moléculas de adhesión. Los presentes inventores se han centrado en la etapa de migración transendotelial [MTE] porque es la etapa en la que los leucocitos se destinan de forma irreversible a entrar en los tejidos inflamados. Los presentes inventores previamente han descrito el papel crítico de PECAM, expresada en las superficies de todos los Mo y PMN y concentrada en los bordes de las células endoteliales, en la MTE. En las condiciones mejor controladas, los reactivos anti-PECAM bloquean el 80-90 % de la MTE en modelos *in vitro* y en muchos modelos *in vivo*. Sin embargo, hay sistemáticamente al menos un 10-20 % de leucocitos que escapan a este bloqueo (1, 2, 4, 6, 8).

25 Además, se ha descrito al menos un modelo *in vivo* en el que los anticuerpos contra PECAM no tienen ningún efecto (9). La delección dirigida de PECAM da como resultado ratones sin defectos significativos en su respuesta inflamatoria aguda (26). Por lo tanto, existen mecanismos de MTE independientes de PECAM. El conocimiento de estos mecanismos conducirá a una mejor comprensión de la inflamación. La fijación como objetivo de estas rutas puede ser una ayuda útil para terapias antiinflamatorias centradas en PECAM.

30

Etapas diseccionables molecularmente en la migración de leucocitos

La respuesta inflamatoria es un arma de doble filo. La movilización de leucocitos a un foco de inflamación es crítica para la rápida resolución de infecciones y la restauración de daños tisulares debidas a una diversidad de lesiones. Por otra parte, la mayoría de las patologías humanas se deben a una inflamación que está mal dirigida o prolongada con el resultado de que se dañan tejidos del huésped. Los ejemplos comunes incluyen las artropatías inflamatorias, la fibrosis pulmonar y la aterosclerosis, que actualmente se considera una enfermedad inflamatoria crónica de la pared arterial (13). Por lo tanto, se ha dirigido mucha atención hacia la comprensión de la inflamación a nivel molecular con la esperanza de poder regularla mejor.

35

El proceso de migración de leucocitos se ha diseccionado en una serie de acontecimientos de adhesión secuenciales en el siguiente modelo de trabajo [véase la Figura 1]. La migración de leucocitos se puede dividir en estas etapas porque se dispone de reactivos que pueden bloquear cada una de estas etapas. Puede haber moléculas de adhesión adicionales que aún no se han descubierto que interaccionen en etapas intermedias o distales a éstas. De hecho, CD99 puede ser una molécula de este tipo.

40

Rodamiento. En la primera etapa, algunos de los leucocitos que entran en una vénula postcapilar en el área de inflamación dejan el torrente circulatorio y se adhieren ligeramente, provisionalmente y de forma reversible a las superficies de las células endoteliales en un proceso denominado acertadamente "rodamiento". La familia de selección de moléculas de adhesión y sus ligandos decorados con Lewis^x sialilados parecen ser los principales responsables de esta interacción inicial [revisado en (14, 15)]. Los leucocitos rodantes entran en contacto directo con el endotelio, exponiéndose a una diversidad de señales capaces de promover la siguiente etapa - activación de las integrinas específicas de leucocito. La unión de leucocitos a la propia E-selectina puede ser una señal suficiente (16). Como alternativa o adicionalmente, los leucocitos encadenados por las selectinas ahora están en una posición a activar por el factor de activación de plaquetas (17) u otros moduladores de lípidos (18), quimiocinas unidas a glucosaminoglicanos de la superficie endotelial (19), quimioatrayentes solubles (20) o ligandos que entrecruzan CD31 de leucocitos (3, 21, 22).

45

50

55 **Adhesión.** Tras la activación de sus integrinas al estado de unión de alta afinidad, los leucocitos detienen el

rodamiento y se adhieren fuertemente a la superficie endotelial. En el caso de los monocitos y linfocitos, que expresan integrinas tanto de la familia $\beta 1$ como de la familia $\beta 2$, el acoplamiento por cualquier integrina puede ser suficiente para promover la unión para una trans migración posterior (23). Los contra-receptores identificados para la adhesión mediada por integrina $\beta 1$ e integrina $\beta 2$ incluyen ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1, miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. Los leucocitos unidos fuertemente a la superficie luminal de las células endoteliales avanzan rápidamente a una unión intercelular, un proceso que requiere ciclos de adhesión y separación sucesivos, ya que los leucocitos se unen por sus extremos delanteros y se sueltan por su parte posterior.

Trans migración. Después de alcanzar la unión, insertan pseudópodos entre células endoteliales fuertemente yuxtapuestas y avanzan lentamente, de una forma ameboide, mientras que mantienen contactos fuertes con la célula endotelial. Esta etapa se denomina diapédesis, migración trans endotelial [MTE] o trans migración. La molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales-1 [PECAM, también conocida como CD31], una CAM de la superfamilia de las inmunoglobulinas (24), expresada en las superficies de los leucocitos y las plaquetas y concentrada en los bordes entre células endoteliales, está implicada en esta etapa. El contacto entre la PECAM de leucocitos y la PECAM endotelial es crucial para la trans migración de la inmensa mayoría de neutrófilos y monocitos *in vitro* (1) e *in vivo* (2, 8). Se puede inhibir la MTE *in vitro* e *in vivo* mediante la administración de agentes que interfieran con la interacción homofílica de la PECAM de leucocitos con la PECAM endotelial. Estos incluyen mAc que se unen al dominio 1 y/o 2 de PECAM y bloquean este sitio crítico, o quimeras de PECAM-IgG recombinantes solubles que contienen al menos el dominio 1, que inhiben competitivamente esta interacción (4, 6, 25). Por lo tanto, la trans migración dependiente de PECAM es una diana prometedor para una terapia antiinflamatoria.

En resumen, aunque los presentes inventores han aprendido mucho sobre las moléculas y mecanismos de rodamiento de leucocitos y adhesión a la superficie apical del endotelio (15, 46, 47), sigue habiendo un gran vacío en el conocimiento actual de la migración trans endotelial. La PECAM claramente desempeña un papel importante en la MTE para la mayoría de PMN y monocitos en la mayoría de los estados inflamatorios estudiados hasta la fecha. La función de la PECAM en la mediación de la trans migración sin afectar a la adhesión apical define la MTE como una etapa separada en la migración de los leucocitos. Sin embargo, aunque la PECAM es la única molécula que se ha identificado que desempeña un papel especial en la MTE, claramente no es la única molécula implicada en la MTE.

CD99

CD99 lo descubrieron y estudiaron independientemente cuatro grupos separados de investigadores. Los genetistas lo identificaron como el único gen pseudoautosómico humano conocido; su producto génico define el tipo sanguíneo Xg(a+). De forma similar al caso del grupo sanguíneo Duffy, los individuos Xg(a-) carecen de CD99 en sus glóbulos rojos (GR), pero lo expresan de forma apropiada en otros tipos celulares. Este gen está localizado en el extremo distal del brazo corto del cromosoma X, una región implicada en el emparejamiento con una región homóloga corta del cromosoma Y durante la meiosis. Debido a este fenómeno, el entrecruzamiento de estas regiones del cromosoma X e Y conduce a la duplicación de este gen en el cromosoma Y y a la herencia de este gen de forma similar a un rasgo autosómico, de aquí el nombre de "pseudoautosómico". En ratones se han identificado varios genes que se heredan de esta forma. CD99 es el único ejemplo en seres humanos hasta ahora.

La bibliografía sobre patologías quirúrgicas está repleta de referencias a CD99, desde que se descubrió que era un marcador fiable para distinguir el sarcoma de Ewing de otros tumores de "células pequeñas redondas y azules". Sin embargo, la función de la molécula en la superficie de estos tumores es completamente desconocida. Su función se caracteriza mejor en linfocitos T, donde se descubrió que era un ligando alternativo a CD2 para el fenómeno de formación de rosetas de glóbulos rojos de oveja. Además, se ha mostrado que el ligamiento de CD99 en timocitos y linfocitos T desempeña una función coestimuladora en ciertos modelos *in vitro*. Estas dos últimas funciones se analizarán con más detalle más adelante, ya que son las más relevantes para un papel de CD99 en la trans migración de leucocitos.

Uno de los problemas a los que se enfrenta la investigación de CD99 es que varios de los mAc de CD99 existentes solamente reaccionan con epítomos expresados por timocitos inmaduros; otros mAc reaccionan únicamente con ciertos tipos de leucocitos de sangre periférica debido a modificaciones postraduccionales de la molécula. De los pocos informes publicados sobre CD99 en leucocitos, ninguno usa el mismo tipo de célula o el mismo anticuerpo, lo que hace que las comparaciones sean difíciles. Por ejemplo, el sexto capítulo de International Leukocyte Typing Workshop sobre CD99 afirma que CD99 no se expresa en monocitos o plaquetas. Además, una de las publicaciones principales sobre CD99 afirma que la molécula no se expresa por los granulocitos.

El ADNc que codifica CD99 predice una proteína transmembrana de tipo I de 16,7 kd que atraviesa la membrana una vez. No hay sitios de N-glicosilación consenso, pero sí varios sitios de O-glicosilación, que representan 14 kd de su peso molecular aparente de 32 kd. De hecho, el tratamiento con O-glucanasa reduce su Mr a 18 kd (Aubrit y col., Eur. J. Immunol. 1989, 19:1431). Hay una región rica en prolina cerca del extremo amino maduro y un tramo de cinco repeticiones Gly-X-Y después de ésta. Sin embargo, no hay restos de prolina en estas repeticiones, lo que hace que sea extremadamente improbable que funcione como una proteína "tipo colágeno". CD99 no es miembro de ninguna familia de proteínas conocida, ni tampoco es remotamente homólogo a ninguna proteína conocida con la excepción de la homología del 48 % con PBDX, el producto de un gen localizado adyacente a CD99 en el

5 cromosoma X e implicado en la expresión de CD99 en eritrocitos (Ellis y col., Nature Genetic, 1994, 8:285). Sólo hay dos restos de metionina y un resto de cisteína (en el lado citoplásmico) en la molécula, lo cual es coherente con la dificultad en el marcaje metabólico usando estos aminoácidos (véase la página 37). Se predice que el único resto de tirosina citoplásmico es el primer aminoácido en la superficie citoplásmica de la membrana, lo que hace que sea poco probable que intervenga en cascadas de señalización de fosfotirosina conocidas.

10 Gelin, y col. (EMBO J. 1989, 8:3252) descubrieron que aunque la mayor parte de la adhesión espontánea de GR de oveja (y humanos) a linfocitos T humanos estaba mediada por interacciones CD2/LFA-3, tenía lugar una adhesión residual significativa en presencia de un bloqueo óptimo de CD2. Esto se debía a interacciones entre CD99 en el linfocito T y alguna o algunas otras moléculas en los GR. Como los GR normalmente expresan CD99, la forma de demostrar esto fue mostrar que a) el mAc anti-CD99 absorbido en los GR no bloqueaba la unión, mientras que el mismo mAc unido a los linfocitos T sí que lo hacía, y b) los linfocitos T normales formaban rosetas con GR Xg(a-) que no expresan CD99, además de hacerlo con GR Xg(a+), que sí lo expresan. Aunque el efecto de formación de rosetas era pequeño en comparación con el grado de formación de rosetas por CD2, esto demuestra que CD99 es capaz de realizar interacciones adhesivas de una manera heterofílica.

15 Los otros informes sobre CD99 que son potencialmente relevantes para este proyecto implican el entrecruzamiento de CD99 en las superficies de timocitos o linfocitos T. En la línea de linfocitos T Jurkat, el entrecruzamiento del mAc de CD99 unido a la superficie con un anticuerpo policlonal anti-ratón condujo a un rápido aumento (< 30 min) en la expresión en la superficie de LFA-I (CD11a/CD18) y la estimulación de la agregación homotípica dependiente de LFA-I/ICAM-1 (Hahn y col., J. Immunol. 1997; 159:2550). El mismo tratamiento de timocitos inmaduros (CD4⁺CD8⁺) condujo a un aumento rápido similar en la expresión de receptores de superficie de linfocitos T y de MHC de clase I, que se creía que procedían de reservas intracelulares (Choi y col., J. Immunol. 1998; 161:745). Los experimentos realizados usando linfocitos T de sangre periférica mostraron que un entrecruzamiento extensivo de CD99 (por mAc unido a plaquetas) proporcionaba una señal coestimuladora para el flujo de Ca⁺⁺ intracelular, la expresión de CD25 y la proliferación en condiciones de entrecruzamiento subóptimo por anti-CD3 (Waclavicek y col., J. Immunol. 1998, 161:4671; Wingett y col., Cell Immunol. 1999; 193:17). En todos estos casos, los efectos del mAc anti-CD99 eran pequeños en comparación con los conseguidos por la activación de moléculas coestimuladoras clásicas tales como CD28. Sin embargo, demuestran que CD99 es capaz de funcionar como una molécula de señalización, de forma directa o indirecta, tras el acoplamiento.

30 El documento WO-A-96/27613 desvela anticuerpos mono- o policlonales contra toda o parte de la región 63-75 de la proteína E2 (CD99), procedimientos para producirlos y el uso de los anticuerpos para preparar un fármaco para controlar o prevenir la proliferación de tumores. No se conocen ligandos para CD99. Como no es un miembro de ninguna familia molecular conocida, es imposible hacer primeras conjeturas sobre sus ligandos y mecanismos de acción basándose en la experiencia con miembros de familias relacionadas.

35 La presente invención arroja más luz sobre el proceso de transmigración, y sobre la función de CD99. Al hacer esto, esclarece un mecanismo inflamatorio importante y, por lo tanto, una estrategia para modular la inflamación.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las etapas de adhesión en la migración de leucocitos.

La Fig. 2 es un dibujo esquemático de dos ensayos *in vitro* de migración transendotelial.

40 La Fig. 3 muestra datos experimentales que indican el efecto del bloqueo de diversos antígenos, con anticuerpos, sobre la adhesión celular y la migración transendotelial.

La Fig. 4 es un dibujo esquemático que representa la proteína CD99 en la membrana plasmática; están indicadas sus modificaciones de carbohidratos y sus dominios de interacción con el ligando.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el porcentaje de migración de linfocitos T a través de una monocapa de HUVEC en un gel de colágeno.

Descripción detallada

45 La presente invención se basa, en parte, en la identificación de una proteína de membrana de 30 kD expresada en los bordes entre células endoteliales confluentes así como en la superficie de leucocitos. Esta proteína se ha identificado como CD99. En el ensayo *in vitro* de los presentes inventores, un anticuerpo monoclonal [mAc] contra esta molécula bloquea selectivamente la MTE de monocitos y, en una menor medida, PMN, independientemente de su capacidad de adherirse a la superficie apical del endotelio. Considerando que los efectos publicados de los mAc anti-CD99 son cuantitativamente pequeños, es bastante posible que la función o funciones fisiológicas más importantes de CD99 puedan estar relacionadas con la transmigración de leucocitos, en la que el mAc hec2 bloquea la transmigración en más de aproximadamente un 90 %.

55 Dos modelos murinos de inflamación aguda en los que puede evaluarse el efecto del mAc bloqueante tanto cuantitativa como cualitativamente, pueden mostrar que el bloqueo producido por interferencia con estas moléculas

está a nivel de la MTE o la adhesión. El papel de CD99/HEC2 se evalúa en ratones de tipo silvestre así como en ratones en los que está bloqueada de forma máxima la PECAM. La actividad de CD99 también puede ensayarse en cualquiera de tres líneas de ratón en las que está ausente PECAM o no es funcional y, por lo tanto, la MTE se produce independientemente de PECAM. En estos ratones será más fácil identificar las rutas independientes de PECAM o alternativas. Los efectos del mAc bloqueante en estas nuevas moléculas se ensayan en ratones de tipo silvestre para determinar el efecto del bloqueo de estas moléculas por sí mismas; en ratones Tg8 que expresan constitutivamente PECAM-IgG circulante y tienen un bloqueo máximo de la función de PECAM; en ratones deficientes [knockout] en PECAM, que no tienen PECAM; y en ratones Tg5 y Tg11 que expresan constitutivamente niveles supraterapéuticos de PECAM-1 soluble y son refractarios a sus efectos, a pesar de tener niveles normales de PECAM en sus células endoteliales y leucocitos. Estos estudios proporcionan una mejor comprensión de las moléculas y mecanismos implicados en la migración transendotelial de leucocitos e identifican compuestos terapéuticos adicionales para terapias antiinflamatorias.

De esta manera, la presente invención ventajosamente se dirige a la MTE independiente de PECAM. Más específicamente, considera moléculas que funcionan en una fase o etapa diferente en la MTE que son totalmente independientes de PECAM, tales como CD99/HEC2. También considera moléculas que median la MTE residual que se produce cuando se bloquea PECAM, que pueden actuar en la misma fase o etapa que PECAM. CD99/HEC2 probablemente también interviene aquí; esta molécula es bien conocida, como se describe en la sección de antecedentes anterior.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "migración transendotelial" (MTE) se refiere al movimiento de los leucocitos desde la superficie apical a la lámina basal de las células endoteliales y más allá en respuesta a factores quimiotácticos (cuando dichos factores están presentes a una mayor concentración en la lámina basal que en la superficie apical de las células endoteliales). Los leucocitos migran entre las uniones formadas en el endotelio entre células endoteliales individuales. La Figura 1 ilustra esquemáticamente este proceso. En general, la MTE se produce cuando se activan las células endoteliales, por ejemplo, con TNF, IL-1 u otros mediadores proinflamatorios. La MTE también puede producirse endógenamente, y se producirá a un nivel menor, menos sólido a través de las células endoteliales como consecuencia de la adhesión de leucocitos incluso en ausencia de activación directa de las células endoteliales. De esta manera, la MTE se produce *in vivo* en focos inflamatorios; e *in vitro*, a través de células endoteliales cultivadas preferentemente después de la activación de las células endoteliales y/o la creación de un gradiente quimiotáctico. Los inventores han descubierto que el sistema *in vitro* reproduce las condiciones inflamatorias *in vivo* para estudiar la MTE con un alto grado de previsibilidad.

El término "leucocitos" incluye, pero sin limitación, leucocitos polimorfonucleares (es decir, neutrófilos), monocitos (que se diferencian en células dendríticas o macrófagos después de la transmigración a un sitio al que se unen), granulocitos (incluyendo eosinófilos y basófilos), células asesinas naturales y linfocitos, por ejemplo, linfocitos T, así como precursores de células dendríticas circulantes.

La expresión "célula endotelial" (o CE) tiene el significado habitual en la técnica. Las células endoteliales constituyen el endotelio, que se encuentra, entre otros sitios, en el lumen del tejido vascular (venas, arterias y capilares) a lo largo de todo el cuerpo. La "superficie apical" del endotelio es la superficie luminal, es decir, en contacto con la sangre. La lámina basal o membrana basal es la capa de matriz extracelular que separa el endotelio de la pared del vaso. En la mayoría de los casos de inflamación, los leucocitos migran a través de vénulas post-capilares cuya pared consiste en una capa discontinua de células de músculo liso vascular que separan el vaso del tejido al que abastecen.

La activación de células endoteliales puede deberse al contacto con mediadores estimuladores. Para los fines de la presente invención, la activación de células endoteliales se debe al contacto con citocinas proinflamatorias tales como, pero sin limitación, factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), particularmente IL-1 β .

La presente divulgación incluye la evaluación de la MTE mediada por CD99 y compuestos que son inhibidores candidatos de este proceso en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para los ensayos *in vitro*, las células endoteliales preferentemente se cultivan sobre una membrana permeable o gel de colágeno. *In vivo*, la MTE se produce en un sitio de inflamación, que puede inducirse (por ejemplo, con tratamiento con tioglicolato o aceite de crotón) o se debe a un estado inflamatorio natural (infección, herida, autoinmunidad).

Un "inhibidor de CD99" es una molécula que bloquea o reduce la unión de CD99 consigo mismo o con su compañero de unión heterofílico (es decir, el ligando de CD99 o receptor de CD99), es decir, impide la interacción de CD99 (por ejemplo, la unión) con el compañero de unión heterofílico u homofílico y la mediación de MTE. En una realización específica, una molécula de anticuerpo monoclonal anti-CD99 es dicho inhibidor. Como alternativa, un fragmento extracelular de CD99 (véase la Figura 4) es un inhibidor y, más particularmente, un inhibidor competitivo.

Un "fragmento extracelular de CD99" puede ser el dominio extracelular entero, es decir, desde el extremo N hasta aproximadamente el inicio del dominio transmembrana, o una parte más pequeña del mismo que comprende un dominio de interacción de CD99 con su compañero de unión (incluyendo construcciones químicas del dominio extracelular de CD99, por ejemplo, con una molécula de inmunoglobulina); un carbohidrato, particularmente un O-carbohidrato; o un ligando de lectina. De esta manera, los inhibidores adecuados pueden interactuar con carbohidratos de CD99; tales inhibidores pueden ser diversas lectinas. Como alternativa, pueden usarse

5 carbohidratos solubles o miméticos de carbohidratos para bloquear la lectina que interacciona con carbohidratos críticos en CD99. De forma similar, ciertos péptidos o peptidomiméticos pueden bloquear la interacción con un dominio de interacción de polipéptido de CD99. Además, ciertas combinaciones de los anteriores, en ciertas circunstancias, pueden resultar más eficaces para inhibir CD99. En una realización específica, dicho inhibidor es una molécula de anticuerpo anti-CD99, más específicamente, una molécula de anticuerpo monoclonal anti-CD99.

La expresión molécula de anticuerpo anti-CD99 incluye inmunoglobinas que reconocen homólogos de CD99/HEC2 de ratones, seres humanos u otras especies; también pueden usarse derivados de dichos anticuerpos con al menos la porción de unión al ligando de los homólogos de CD99/HEC2 mencionados, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monocatenarios, Fv, Fab, Fab', F[ab']₂, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y similares.

10 La expresión "estado inflamatorio" se refiere a un estado inflamatorio agudo o crónico, que puede deberse a infecciones o a causas no infecciosas. Diversos estados infecciosos incluyen meningitis, encefalitis, uveítis, colitis, dermatitis y síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos. Las causas no infecciosas incluyen traumatismos (quemaduras, cortes, contusiones, lesiones de aplastamiento), enfermedades autoinmunes y episodios de rechazo de órganos. De esta manera, en realizaciones específicas, un estado inflamatorio se debe a una afección
 15 seleccionada del grupo que incluye: aterosclerosis (arteriosclerosis); estados autoinmunes tales como esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico; polimialgia reumática (PMR), artritis reumatoide y otras formas de artritis inflamatoria, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva (escleroderma), espondilitis anquilosante, polimiositis, dermatomiositis, pénfigo, penfigoide, diabetes mellitus tipo I, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Goodpasture, enfermedad mixta de tejido conectivo, colangitis esclerosante,
 20 enfermedad inflamatoria del intestino incluyendo enfermedad de Crohn (enteritis regional) y colitis ulcerosa, anemia perniciosa, dermatosis inflamatoria; neumonitis intersticial usual (NIU), asbestosis, silicosis, berliosis, talcosis, las diversas formas de neumoconiosis, sarcoidosis (en el pulmón y en cualquier otro órgano), neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial linfoide, neumonía intersticial de células gigantes, neumonía intersticial celular, alveolitis alérgica extrínseca, granulomatosis de Wegener y formas relacionadas de angiítis (arteritis temporal y poliarteritis nodosa); dermatosis inflamatorias que no se consideran autoinmunes; hepatitis activa crónica; reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (por ejemplo, dermatitis por hiedra venenosa); neumonía u otra inflamación del tracto respiratorio debida a cualquier causa; Síndrome de Dificultad Respiratoria en Adultos (SDRA) de cualquier etiología; encefalitis, con edema inflamatorio; reacciones de hipersensibilidad inmediata incluyendo, pero sin limitación, asma, fiebre del heno, alergias cutáneas, anafilaxis aguda; enfermedades que implican la deposición aguda de complejos inmunes incluyendo, pero sin limitación, fiebre reumática, glomerulonefritis aguda y/o crónica debida a cualquier etiología, incluyendo específicamente glomerulonefritis postinfecciosa (por ejemplo, postestreptocócica), exacerbaciones agudas de lupus eritematoso sistémico; pielonefritis; celulitis; cistitis; colecistitis aguda; y afecciones que producen isquemia transitoria en cualquier sitio a lo largo del tracto gastrointestinal, vejiga, corazón u otro órgano, especialmente los propensos a ruptura; secuelas de transplante de órganos o aloinjertos de tejidos, incluyendo rechazo de aloinjertos en el periodo de tiempo agudo después del transplante del tejido u órgano
 35 alogénico y rechazo crónico de huésped contra injerto.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", siempre que se use en relación con las composiciones farmacéuticas de la invención o composiciones de vacuna de la invención, se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción adversa, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano. Preferentemente, como se usa en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o presentado en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser
 40 líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Preferentemente se emplean como vehículos, particularmente para soluciones inyectables, agua o solución acuosa, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin (18ª edición).

50 El término "aproximadamente" será conocido para los expertos en la materia a la luz de esta divulgación. Preferentemente, el término significa dentro de un 20 %, más preferentemente dentro de un 10 % y aún más preferentemente dentro de un 5 % de un valor o intervalo dado. Como alternativa, especialmente en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" preferentemente significa dentro de aproximadamente un log (es decir, un orden de magnitud), preferentemente dentro de un factor de dos de un valor dado, dependiendo de lo cuantitativa
 55 que sea la medida.

Una "secuencia codificante" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante de una proteína puede incluir un
 60 codón de iniciación (normalmente ATG) y un codón de terminación.

El término "gen", también denominado "gen estructural", significa una secuencia de ADN que codifica o corresponde

a una secuencia particular de aminoácidos que comprende todo o parte de una o más proteínas, y puede incluir o no secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen. La región transcrita de un gen puede incluir regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) e intrones además de la región traducida (codificante).

5 Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (en dirección 3'). Para los fines de definir la presente invención, la secuencia promotora está unida por su extremo 3' al sitio de inicio de la transcripción y se extiende cadena arriba (en dirección 5') incluyendo el mínimo número de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del nivel de fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente, por ejemplo, por mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

10 Una secuencia codificante está "bajo el control" de o "asociada operativamente con" secuencias de control de la transcripción y traducción en una célula, cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm, que después se somete a cortes y empalmes de ARN (si contiene intrones) y se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

15 Los términos "expresar" y "expresión" significan permitir o hacer que la información en un gen o secuencia de ADN se manifieste, por ejemplo, produciendo una proteína por activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un gen o secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un "producto de expresión" tal como un ARNm o una proteína. También puede decirse que el propio producto de expresión, por ejemplo, el ARNm o proteína resultante, se "expresa" por la célula. Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado. El término "intracelular" significa algo que está dentro de una célula. El término "extracelular" significa algo que está fuera de una célula. Una sustancia se "secreta" por una célula si aparece en una medida significativa fuera de la célula, desde algún sitio en o dentro de la célula. Las "condiciones que permiten la expresión" *in vitro* son condiciones de cultivo de temperatura (generalmente aproximadamente 37 °C), humedad (atmósfera húmeda), concentración de dióxido de carbono para mantener el pH (generalmente de aproximadamente un 5 % de CO₂ a aproximadamente un 15 % de CO₂), pH (generalmente de aproximadamente 7,0 a 8,0, preferentemente 7,5) y componentes del fluido de cultivo, que dependen del tipo de célula huésped. *In vivo*, las condiciones que permiten la expresión son principalmente la salud del animal transgénico no humano, que depende de una nutrición adecuada, agua, habitación y condiciones ambientales (ciclo de luz-oscuridad, temperatura, humedad y nivel de ruido). En cualquier sistema, la expresión puede depender de un sistema de control represor o inductor, como es bien conocido en la técnica.

20 El término "transfección" significa la introducción de una secuencia de ADN, ARN o gen "extraño" (es decir, exógeno o extracelular) en una célula huésped, de forma que la célula huésped exprese el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. El gen o secuencia introducida también puede denominarse gen o secuencia "clonada" o "extraña", puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como secuencias de inicio, terminación, promotoras, señal, de secreción u otras secuencias usadas por la maquinaria genética de una célula. El gen o secuencia puede incluir secuencias no funcionales o secuencias sin función conocida. Una célula huésped que recibe y expresa el ADN o ARN introducidos se ha "transfectado" y es "transfectante" o un "clon". El ADN o ARN introducido en una célula huésped puede proceder de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula huésped, o células de un género o especie diferente.

25 Las expresiones "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.; se analizan con más detalle más adelante.

30 Los vectores normalmente comprenden el ADN de un agente transmisible, en el que se ha insertado ADN extraño. Una forma común para insertar un segmento de ADN en otro segmento de ADN implica el uso de enzimas denominadas enzimas de restricción que escinden el ADN en sitios específicos (grupos específicos de nucleótidos) denominados sitios de restricción. Un "casete" se refiere a un segmento de ADN que puede insertarse en un vector o en otra pieza de ADN en un sitio de restricción definido. Preferentemente, un casete es un "casete de expresión" en el que el ADN es una secuencia codificante o segmento de ADN que codifica un producto de expresión que puede insertarse en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción del casete generalmente están diseñados para asegurar la inserción del casete en la fase de lectura apropiada. Generalmente, el ADN extraño se inserta en uno o más sitios de restricción del ADN del vector, y después se lleva por el vector a una célula huésped junto con el ADN del vector transmisible. Un segmento o secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también puede denominarse "construcción de ADN". Un tipo común de vector es un "plásmido" que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario, normalmente de origen bacteriano, que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede introducirse fácilmente en una célula huésped adecuada. Un vector plasmídico con frecuencia contiene ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para la inserción del ADN extraño. Se han descrito un gran número de vectores, incluyendo plásmidos y vectores fúngicos, para la replicación y/o expresión en una diversidad de huéspedes

eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitantes incluyen plásmidos pKK (Amersham Pharmacia Biotech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, WI), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, CA), o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), y muchas células huésped apropiadas, usando procedimientos desvelados o citados en la presente memoria o conocidos de otra forma por los expertos en la técnica relevante. Los vectores de clonación recombinantes con frecuencia incluirán uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

La expresión "célula huésped" significa cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, modifica, transforma, desarrolla, usa o manipula de cualquier forma, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo la expresión por la célula de un gen, una secuencia de ADN o ARN, una proteína o una enzima. Las células huésped pueden usarse adicionalmente para ensayos de exploración u otros ensayos; como se describe más adelante. La célula huésped puede encontrarse *in vitro*, es decir, en cultivos de tejidos, o *in vivo*, es decir, en un microbio, planta o animal.

La expresión "sistema de expresión" significa una célula huésped y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño llevado por el vector e introducido en la célula huésped. Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores de *Baculovirus*, y células huésped y vectores de mamífero. En una realización específica, la proteína se expresa en células COS-1 o CHO. Otras células adecuadas incluyen células NSO, células HeLa, 293T (células de riñón humano), mioblastos primarios de ratón y células NIH 3T3.

El término "heterólogo" se refiere a una combinación de elementos que no se producen de forma natural. Por ejemplo, ADN heterólogo se refiere a ADN que no se localiza naturalmente en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. Un elemento regulador de la expresión heterólogo es un elemento asociado operativamente con un gen diferente del gen con el que está asociado operativamente en la naturaleza. En el contexto de la presente invención, una secuencia codificante de proteínas es heteróloga para el ADN del vector en el que se inserta para la clonación o expresión, y es heteróloga para una célula huésped que contiene dicho vector, en la que se expresa, por ejemplo, una célula CHO.

De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Estas técnicas se explican con detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (en la presente memoria "Sambrook y col., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization*, B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985); *Transcription And Translation*, B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984); *Animal Cell Cultures*, R.I. Freshney, ed. (1986); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Procedimientos para producir moléculas de anticuerpo

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden producirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de inmunoglobulinas, en particular, por síntesis química o por expresión recombinante. Dicho ácido nucleico aislado que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de anticuerpo puede producirse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Pueden producirse fragmentos de anticuerpo, tales como Fab y F[ab']₂ por tratamiento proteolítico de anticuerpos enteros.

Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales contra CD99/HEC2 o un derivado o análogo del mismo. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales huésped, incluyendo pero sin limitación conejo, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc., por inyección con el polipéptido de CD99/HEC2, o un derivado (por ejemplo, fragmento o proteína de fusión) del mismo. En una realización, el polipéptido CD99/HEC2 o fragmento del mismo puede conjugarse con un soporte inmunogénico, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH). Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de huésped, incluyendo pero sin limitación adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el polipéptido de CD99/HEC2, o fragmento, análogo o derivado del mismo, puede usarse cualquier técnica que facilite la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (*Nature* 1975, 256:495-497), así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor y col., *Immunology Today* 1983, 4:72; Cote y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, 80: 2026-2030) y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96, 1985). En una realización

adicional de la invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales sin gérmenes (Publicación PCT N° WO 89/12690). De hecho, de acuerdo con la invención, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y col., J. Bacteriol., 1984, 159:870; Neuberger y col., Nature 1984, 312:604-608; Takeda y col., Nature 1985, 314: 452-454) por corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para un polipéptido de CD99/HEC2 junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada; dichos anticuerpos están dentro del alcance de la presente invención. Dichos anticuerpos quiméricos humanos o humanizados se prefieren para uso en la terapia de enfermedades o trastornos humanos (descritos más adelante), ya que los anticuerpos humanos o humanizados tienen mucha menos probabilidad que los anticuerpos xenogénicos de inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta alérgica, por sí mismos.

De acuerdo con la invención, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patentes de Estados Unidos N° 5.476.786, 5.132.405 y 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios específicos de polipéptido de CD99/HEC2. De hecho, estos genes pueden administrarse para la expresión *in vivo*. Una realización adicional de la invención usa las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse y col., Science 1989, 246:1275-1281) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por un polipéptido de CD99/HEC2, o sus derivados, o análogos.

Expresión de polipéptido de CD99/HEC2

Una vez que se ha clonado un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una parte de unión a ligando de CD99/HEC2, la secuencia codificante puede insertarse en un vector de expresión recombinante. Dicha modificación por ingeniería genética de la secuencia codificante puede realizarse por técnicas de ADN recombinante rutinarias conocidas en la técnica.

El ácido nucleico que codifica el polipéptido opcionalmente contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder que dirige la secreción de la molécula de proteína. En el caso específico de CD99, que es una glicoproteína transmembrana, se modificaría por ingeniería genética una forma secretada para codificar sólo la parte extracelular, o una o más regiones limitadas de la parte extracelular, para asegurar la secreción.

El vector de expresión después puede transferirse a una célula huésped *in vitro* o *in vivo* por técnicas convencionales y las células transfectadas pueden cultivarse por técnicas convencionales para producir CD99/HEC2. Por ejemplo, mediante la transfección transitoria del vector de expresión que codifica CD99/HEC2 en células COS, el cultivo de las células durante un periodo de tiempo apropiado para permitir la expresión, y después la captación del sobrenadante de las células COS, conteniendo dicho sobrenadante la proteína CD99/HEC2 expresada secretada.

Las células huésped usadas para expresar CD99/HEC2 pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli* o células eucariotas. En particular, es un sistema de expresión eficaz células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS, usadas junto con un vector en el que la expresión del CD99/HEC2 está bajo el control del elemento promotor del gen temprano inmediato principal del citomegalovirus humano.

Para expresar CD99/HEC2 pueden usarse diversos sistemas de vectores de expresión en huéspedes. Dichos sistemas de expresión en huéspedes representan vehículos mediante los cuales pueden producirse y posteriormente purificarse las secuencias codificantes de interés, pero también producen células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, presentar CD99/HEC2 *in situ*. Estos sistemas incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de CD99/HEC2; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes de CD99/HEC2; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti), que contiene secuencias codificantes de CD99/HEC2; sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293 y 3T3) que llevan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; o el promotor 7.5K de vaccinia virus).

La expresión de la proteína o polipéptido puede controlarse mediante cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica, pero estos elementos reguladores tienen que ser funcionales en el huésped seleccionado para la expresión. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión génica incluyen, pero sin limitación, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Patentes de Estados Unidos N° 5.385.839 y 5.168.062), la región promotora temprana de SV40 (Benoist y Chambon, Nature 1981, 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, y col., Cell 1980, 22:787-797), el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:1441-1445), las secuencias

reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster y col., Nature 1982, 296:39-42); vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de β -lactamasa (Villa-Komaroff, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75:3727-3731), o el promotor *tac* (DeBoer, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80:21-25); véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American 1980, 242:74-94; elementos promotores de levaduras u otros hongos tales como el promotor de Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor de PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de fosfatasa alcalina; y regiones de control de la transcripción que presentan especificidad de tejido hematopoyético, en particular, la región de control del gen de la beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram y col., Nature 1985, 315:338-340; Kollias y col., Cell 1986, 46:89-94), promotores del factor de diferenciación de células madre hematopoyéticas, promotor del receptor de eritropoyetina (Maouche y col., Blood 1991, 15:2557), etc.

En sistemas bacterianos, ventajosamente pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependiendo del uso deseado para la proteína CD99/HEC2 que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de CD99/HEC2, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Estos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 1983, 2:1791), en el que la secuencia codificante de CD99/HEC2 puede ligarse individualmente al vector en fase con la región codificante de lac Z de forma que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 1985, 13: 3101-3109; Van Hleeke & Schuster, J. Biol. Chem. 1989, 264:5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de factor Xa o trombina de forma que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto de GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus se desarrolla en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de CD99/HEC2 puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En células huésped de mamífero, pueden usarse varios sistemas de expresión basados en virus y no basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de CD99/HEC2 de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico después puede insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el anticuerpo en huéspedes infectados (véase, por ejemplo, Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81:3655-3659). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación tiene que estar en fase con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto entero. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden tener una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner y col., Methods in Enzymol. 1987, 153:516-544).

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Diferentes células huésped tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento post-traduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para un procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitación, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden obtenerse por ingeniería genética líneas celulares que expresen de forma estable CD99/HEC2. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, secuencias potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN extraño, las células modificadas por ingeniería genética pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y se desarrollen para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse ventajosamente para obtener por ingeniería genética líneas celulares que expresan el anticuerpo. Dichas líneas celulares obtenidas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en la exploración y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con el anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección incluyendo, pero sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., Cell 1977, 11:223), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1962, 48:2026), y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., Cell 1980, 22:817) que pueden emplearse en células tk-, hprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse la resistencia a antimetabólitos como base de la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77:3567; O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin y col., J. Mol. Biol. 1981, 150:1) e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., Gene 1984, 30:147).

Los niveles de expresión de CD99/HEC2 pueden aumentarse por amplificación de vectores (como revisión, véase Bebbington y Hentschel, The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning, Vol. Academic Press, New York. 1987). Cuando un marcador en el sistema del vector que expresa CD99/HEC2 es amplificable, el aumento del nivel de inhibidor presente en el medio de cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada con el gen de CD99/HEC2, también aumentará la producción de la proteína (Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 1983, 3:257).

Vectores virales y no virales

Los vectores útiles *in vitro* e *in vivo* son vectores virales, tales como lentivirus, retrovirus, herpes virus, adenovirus, virus adenoasociados, vaccinia virus, alfavirus, baculovirus y otros virus recombinantes con tropismo celular deseable. De esta manera, un gen que codifica una proteína funcional o mutante o fragmento de dominio polipeptídico de la misma puede introducirse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* usando un vector viral o mediante la introducción directa del ADN. La expresión en tejidos diana puede realizarse dirigiendo el vector transgénico a células específicas, tal como con un vector viral o un ligando de receptor, o usando un promotor específico de tejidos, o ambas cosas. En la Publicación PCT N° WO 95/28494 se describe la administración de genes dirigida.

Los vectores virales usados comúnmente para procedimientos de terapia y dirección *in vivo* o *ex vivo* son vectores basados en ADN y vectores retrovirales. En la técnica se conocen procedimientos para construir y usar vectores virales (véase, por ejemplo, Miller y Rosman, BioTechniques 1992, 7:980-990). Preferentemente, los vectores virales son defectuosos en la replicación, es decir, no pueden replicarse de forma autónoma en la célula diana. Preferentemente, el virus defectuoso en la replicación es un virus mínimo, es decir, conserva sólo las secuencias de su genoma que son necesarias para encapsidar el genoma para producir partículas virales.

Los vectores virales de ADN incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso tal como, pero sin limitación, el virus del herpes simple (HSV), papilomavirus, virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, virus adenoasociado (VAA) y similares. Se prefieren virus defectuosos, que carecen totalmente o casi totalmente de genes virales. Un virus defectuoso no es infeccioso después de introducirse en una célula. El uso de vectores virales defectuosos permitirá la administración a las células en un área localizada específica, sin preocuparse de que el vector pueda infectar a otras células. De esta manera, puede fijarse como objetivo específicamente un tejido específico. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, pero sin limitación, un vector de herpes virus 1 (HSV1) defectuoso (Kaplitt y col., Molec. Cell. Neurosci. 1991, 2:320-330), vector de herpes virus defectuoso que carece del gen de la glicoproteína L, u otros vectores de herpes virus defectuosos (Publicaciones PCT N° WO 94/21807 y WO 92/05263); un vector de adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col. (J. Clin. Invest. 1992, 90: 626-630; véase también La Salle y col., Science 1993, 259: 988-990); un vector de virus adenoasociado defectuoso (Samulski y col., J. Virol. 1987, 61:3096-3101; Samulski y col., J. Virol. 1989, 63:3822-3828; Lebkowski y col., Mol. Cell. Biol., 1988, 8:3988-3996); y un virus Sindbis (un tipo de alfavirus) (Publicación PCT N° WO 98/06237; Patente de Estados Unidos N° 5.091.309).

Diversas compañías producen vectores virales en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, Avigen, Inc. (Alameda, CA; vectores VAA), Cell Genesys (Foster City, CA; vectores retrovirales, adenovirales, VAA y lentivirales), Clontech (vectores retrovirales y baculovirales), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; vectores adenovirales y AAV), Genvec (vectores adenovirales), IntroGene (Leiden, Netherlands; vectores adenovirales), Molecular Medicine (vectores retrovirales, adenovirales, VAA y vectores de herpesvirus), Norgen (vectores adenovirales, Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; vectores lentivirales) y Transgene (Strasbourg, Francia; vectores adenovirales, vaccinia, retrovirales y lentivirales).

En otra realización, el vector puede introducirse *in vivo* por lipofección, como ADN desnudo, o con otros agentes que facilitan la transfección (péptidos, polímeros, etc.). Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84:7413-7417; Felgner y Ringold, Science 1989, 337: 387-388; véase Mackey, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85:8027-8031; Ulmer y col., Science 1993, 259: 1745-1748). En las Publicaciones de Patente PCT N° WO 95/18863 y WO 96/17823, y en la Patente de Estados Unidos N° 5.459.127, se describen compuestos lipídicos y composiciones útiles para la transferencia de ácidos nucleicos. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para conseguir la dirección (véase Mackey, y col., *supra*). Los péptidos dirigidos, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas, podrían acoplarse a liposomas químicamente.

También son útiles otras moléculas para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, Publicación de Patente PCT N° WO 95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión al ADN (por ejemplo, Publicación de Patente PCT N° WO 96/25508) o un polímero catiónico (por ejemplo, Publicación de Patente PCT N° WO 95/21931).

- 5 También es posible introducir el vector *in vivo* como un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudo para terapia génica pueden introducirse en las células huésped deseadas por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, uso de una pistola génica, o uso de un transportador de vectores de ADN (véase, por ejemplo Wu y col., J. Biol. Chem. 1992, 267: 963-967; Wu y Wu, J. Biol. Chem. 1988, 263: 14621-14624; Solicitud de Patente canadiense N° 2.012.311; Williams y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:2726-2730). También pueden usarse enfoques de liberación de ADN mediada por receptor (Curiel y col., Hum. Gene Ther, 1992, 3:147-154; Wu y Wu, J. Biol. Chem. 1987, 262:4429-4432). Las Patentes de Estados Unidos N° 5.580.859 y 5.589.466 desvelan la administración de secuencias de ADN exógenas, sin agentes que faciliten la transfección, en un mamífero. Recientemente, se ha descrito una técnica de transferencia de ADN *in vivo* de alta eficacia, con un voltaje relativamente bajo, denominada electrotransferencia (Mir y col., C.P. Acad. Sci. 1988, 321: 893; Publicaciones PCT N° WO 99101157; WO 99101158; WO 99/01175).

Uso terapéutico de inhibidores de CD99/HEC2

La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD99 que inhibe la migración transendotelial (MTE) de leucocitos mediada por CD99, para uso en un procedimiento de tratamiento de una afección inflamatoria.

- 20 En general, se prefiere la administración de anticuerpos de origen de una especie o de reactividad de especie que sea de la misma especie que la del sujeto. De esta manera, en la administración a seres humanos, los procedimientos terapéuticos de la divulgación usan una molécula de anticuerpo que preferentemente procede de un anticuerpo humano, pero puede ser un anticuerpo de una especie heteróloga tal como, por ejemplo, un ratón, que puede estar humanizado o no.
- 25 Para aumentar la eficacia de los productos terapéuticos de anticuerpo contenidos en la invención, estos tratamientos pueden administrarse junto con otras terapias que bloquean la función de otras moléculas implicadas en la migración transendotelial de leucocitos. Las moléculas distintas de CD99 implicadas en la migración transendotelial de leucocitos pueden incluir PECAM.

- 30 Los sujetos a los que es aplicable la presente invención pueden ser cualquier especie de mamífero o vertebrado incluyendo, pero sin limitación, vacas, caballos, ovejas, cerdos, aves de corral (por ejemplo, pollos), cabras, gatos, perros, hámsteres, ratones, ratas, monos, conejos, chimpancés y seres humanos). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Terapia génica

- 35 En una realización específica de la divulgación, se administran vectores que comprenden una secuencia que codifica una molécula de anticuerpo, como se describen, para tratar o prevenir un estado inflamatorio asociado con la función de CD99 en la migración transendotelial de leucocitos. En una realización específica de esta divulgación, la molécula de anticuerpo descrita anteriormente se expresa en el torrente sanguíneo del paciente en una forma soluble no unida a la membrana. Las moléculas de anticuerpos solubles se unen a la proteína CD99/HEC2 localizada en las membranas de los leucocitos o de las células endoteliales, previniendo de esta manera la unión intercelular de estos dos tipos celulares e inhibiendo la migración transendotelial de leucocitos mediada por CD99.

40 En esta realización de la divulgación, el vector terapéutico codifica una secuencia que produce extracelularmente (con una secuencia líder) un anticuerpo de la invención.

De acuerdo con la presente divulgación puede usarse cualquiera de los procedimientos para terapia génica disponibles en la técnica. A continuación se describen procedimientos ejemplares.

- 45 Como revisión general de los procedimientos de terapia génica, véase Goldspiel y col., Clinical Pharmacy 1993, 12:488-505; Wu y Wu, Biotherapy 1991, 3:87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993, 32: 573-596; Mulligan, Science 1993, 260:926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 1993, 62: 191-217; Mayo, TIBTECH 1993, 11:155-215). Se describen procedimientos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse en Ausubel y col., (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col., (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY. Anteriormente se han descrito vectores adecuados para terapia génica.

- 55 En un aspecto de la divulgación, el vector terapéutico comprende un ácido nucleico que expresa un anticuerpo de la invención en un huésped adecuado. En particular, dicho vector tiene un promotor unido operativamente a la secuencia codificante del anticuerpo. El promotor puede ser inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización de la divulgación, se usa una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias

codificantes de proteínas y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, proporcionando de esta manera la expresión intracromosómica de la proteína (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:8932-8935; Zijlstra y col., Nature 1989, 342:435-438).

- 5 La administración del vector en un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al vector o a un complejo de liberación, o indirecta, en cuyo caso, las células primero se transforman con el vector *in vitro* y después se transplantan al paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

10 En una realización específica de la divulgación, el vector se administra directamente *in vivo*, donde entra en las células del organismo y media la expresión de la proteína. Esto puede conseguirse por cualquiera de numerosos procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante su construcción como parte de un vector de expresión apropiado y su administración de forma que se vuelva intracelular, por ejemplo, por infección usando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont); o revestimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en biopolímeros (por ejemplo, polisacárido de poli-S-1-64-N-acetilglucosamina; véase la Patente de Estados Unidos N° 5.635.493), encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas; mediante su administración en asociación con un péptido u otro ligando que se sabe que entra en el núcleo; o mediante su administración en asociación con un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo Wu y Wu, J. Biol. Chem. 1987, 62:4429-4432), etc. En otra realización de la divulgación, puede formarse un complejo de ácido nucleico y ligando en el que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otra realización más de la divulgación, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación específica y expresión por una célula, mediante la dirección a un receptor específico (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT N° WO 92/06180, WO 92/22635, WO 92/20316 y WO 93/14188). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión por recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86:8932-8935; Zijlstra, y col., Nature, 1989, 342: 435-438). Estos procedimientos son adicionales a los analizados anteriormente junto con los "vectores virales y no virales".

20 Como alternativa, también pueden administrarse moléculas de anticuerpo, por ejemplo, por expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos monocatenarios dentro de la población de células diana usando, por ejemplo, técnicas tales como las descritas en Marasco y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:7889-7893).

30 La forma y cantidad de ácido nucleico terapéutico prevista para uso depende del tipo de enfermedad y de la gravedad del efecto deseado, estado del paciente, etc. y puede determinarse por un experto en la materia.

Formulaciones y administración

35 Las composiciones terapéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de cualquier manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables.

40 De esta manera, los anticuerpos de la presente invención o los ácidos nucleicos que los codifican y sus sales y disolventes fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración por inhalación (pulmonar) o insuflación (a través de la boca o la nariz), mediante administración transdérmica o mediante administración transmucosa incluyendo, pero sin limitación, la administración oral, bucal, nasal, oftálmica, vaginal o rectal.

45 Para la administración oral, los agentes terapéuticos pueden tomar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato cálcico ácido); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse por procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes, emulsiones o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituirse con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, saporíferos, agentes colorantes y agentes edulcorantes según sea apropiado.

50 Las preparaciones para administración oral pueden formularse de forma adecuada para proporcionar la liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal, los agentes terapéuticos pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas

de una manera convencional.

Para la administración por inhalación, los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención convenientemente se administran en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contenga una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los productos terapéuticos pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intradérmica) por inyección, por medio de, por ejemplo, una inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden prepararse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en viales o ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como excipientes, suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo seco, liofilizado (es decir, secado por congelación) para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua o solución salina estéril sin pirógenos, antes del uso.

Los productos terapéuticos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los productos terapéuticos también pueden formularse como una preparación de depósito. Estas formulaciones de actuación a largo plazo pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse en microesferas de ácido poli-glicólico/ácido láctico (PGLA) (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.100.669 y 4.849.222; y las Publicaciones PCT N° WO 95/11010 y WO 93/07861).

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse como composiciones separadas o como una sola composición con más de un anticuerpo unido por procedimientos convencionales de química o de biología molecular. Además, el valor de diagnóstico y terapéutico de los anticuerpos de la invención puede aumentarse mediante su uso en combinación con radionúclidos o con toxinas tales como ricina o con agentes quimioterapéuticos tales como metotrexato.

La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

En general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan conjuntamente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de diluyente estéril de forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o dispositivo de distribución que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un blíster. El envase o dispositivo de distribución puede ir acompañado de instrucciones para la administración. También puede prepararse una composición que comprende un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible, ponerse en el recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

Pueden usarse muchos procedimientos para introducir las formulaciones de la invención; éstos incluyen, pero sin limitación, la administración oral, intracerebral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal y mediante escarificación (raspado a través de las capas superiores de la piel, por ejemplo, usando una aguja bifurcada) o cualquier otra vía de administración convencional.

Dosis eficaz

Los compuestos y vectores descritos en la presente memoria pueden administrarse a un paciente a dosis terapéuticamente eficaces para tratar ciertas enfermedades o trastornos. Una dosis terapéuticamente eficaz se

refiere a la cantidad de un producto terapéutico suficiente para producir un efecto beneficioso para la salud en el sujeto tratado.

5 La dosis precisa del producto terapéutico incorporado en la presente invención, a emplear en la formulación, dependerá de la vía de administración y la naturaleza de la enfermedad del paciente y debe decidirse de acuerdo con el criterio del experto y las circunstancias de cada paciente de acuerdo con técnicas clínicas convencionales. El término "inhibir" o "inhibición" significa reducir en una cantidad medible. La capacidad de una composición terapéutica o vacuna de la invención de producir este efecto puede detectarse *in vitro*, por ejemplo, usando un ensayo de migración transendotelial como se ha descrito previamente. Otras pruebas experimentales de inhibición incluyen la observación de la inhibición de la inflamación *in vivo* en un modelo animal. De esta manera, pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales.

15 La toxicidad y eficacia terapéutica de los compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren productos terapéuticos que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse productos terapéuticos que presenten efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de liberación que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial en células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

20 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos de células y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} con una toxicidad baja o nula. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada. Para cualquier compuesto para uso en un procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición que corresponde a la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) como se determina en un cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Ensayos de trans migración *in vitro*

35 En un "ensayo de trans migración" típico en insertos de cultivo de tejidos, se ponen leucocitos en suspensión encima de una monocapa endotelial que crece sobre un filtro poroso encima de un pocillo inferior de quimioatrayente endógeno [hecho por el endotelio] o exógeno. Los leucocitos que terminan en la cámara inferior al final del ensayo se cuentan como trans migrados, y se dice que los reactivos que reducen su número bloquean la trans migración. Sin embargo, para llegar ahí, el leucocito tiene que unirse al endotelio, avanzar hasta la unión próxima, atravesar el endotelio por diapédesis, migrar a través de la lámina basal subendotelial, avanzar a través del soporte de filtro [normalmente muchas veces más grueso que el propio endotelio] y separarse del lado inferior del filtro. Se consideraría que bloquea la trans migración cualquier reactivo que bloquee cualquier etapa de este proceso.

40 La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de dos ensayos *in vitro* de migración transendotelial (no dibujado a escala). Como se muestra en el panel superior, se cultivan células endoteliales (C.E.) en geles de colágeno de tipo I hidratados recubiertos con fibronectina. Los componentes del medio de cultivo penetran en el gel poroso. El panel inferior muestra el crecimiento de C.E. en la superficie superior de un filtro poroso suspendido en un recipiente de cultivo de mayor tamaño. El medio de cultivo se pone en las cámaras interna y externa para alcanzar las superficies apical y basal de la monocapa, respectivamente. En el procedimiento de gel de colágeno preferido, los leucocitos adherentes que permanecen en la superficie apical pueden distinguirse visualmente de los que ya han trans migrado. También se han ideado procedimientos para desprender cualquier leucocito que permanezca unido a la superficie apical de la monocapa. En el procedimiento de cámara de filtro, el porcentaje de leucocitos añadidos a la cámara superior que aparece en la cámara inferior se calcula por recuento directo. Sin embargo, para contarse como "trans migrado", un leucocito tienen que 1] unirse a la superficie apical del endotelio, 2] migrar a la unión intercelular, 3] desplazarse por diapédesis entre las células endoteliales, 4] separarse de las células endoteliales y penetrar en su lámina basal, 5] avanzar a través del propio filtro, y 6] separarse del filtro y caer en la cámara inferior. Por lo tanto, los reactivos que bloqueen cualquiera de estas etapas bloquearán la lectura de trans migración en este sistema.

55 El ensayo de trans migración preferido para uso de acuerdo con la presente invención (es decir, el superior) distingue específicamente adhesión apical de trans migración (1, 45), y puede detectar incluso un bloqueo de células trans migradas a nivel de la lámina basal subendotelial (4).

Ensayos de migración transendotelial

Todas las células HUVEC, PMN, Mo y NK expresan PECAM en una distribución unimodal (5, 6, 11, 45). Los

presentes inventores no han podido distinguir mediante marcadores de superficie o morfología ninguna diferencia entre los leucocitos que se bloquean por reactivos anti-PECAM y los que no se bloquean. Por lo tanto, se usan ensayos funcionales para descubrir el papel de moléculas alternativas *in vivo*. Se cultivan HUVEC en geles de colágeno hidratados en medio 199 + 20 % de suero humano normal, como se describe (48) y el ensayo de migración transendotelial preferentemente se realiza como se ha publicado previamente (1, 45). La migración de monocitos puede realizarse en presencia o ausencia de estimulación con citocinas del endotelio. En el caso de experimentos para estudiar la MTE de neutrófilos, la monocapa de HUVEC se activa añadiendo 3 U.I./ml de IL-1 β al medio de cultivo durante cuatro horas antes del ensayo.

En resumen, se dejan sedimentar monocitos o neutrófilos, aislados recientemente a partir de sangre venosa de donantes sanos en gradientes de Ficoll/Hypaque en monocapas de HUVEC confluentes a 37 °C en presencia o ausencia de reactivos de ensayo. Preferentemente, los ensayos se realizan en medio 199 + 0,1 % de albúmina de suero humano, pero no hay diferencia cuando se realiza en medio completo (45). Después de un tiempo suficiente para la MTE del grupo de control [generalmente 1 hora], las monocapas se lavan vigorosamente con EGTA 1 mM para retirar cualquier leucocito que aún quede adherido por interacciones dependientes de cationes divalentes [selectinas o integrinas] y después se aclaran en solución salina tamponada con fosfato con cationes divalentes y se fijan en glutaraldehído al 2,5 % durante una noche. Esto refuerza el gel de colágeno de forma que sea más fácil de manipular cuando se retire de la bandeja de 96 pocillos. Estas monocapas se tiñen con Wright-Giemsa y se montan en portaobjetos para la observación directa con óptica de Nomarski.

La adhesión fuerte a la superficie apical de la monocapa endotelial es la etapa limitante de la velocidad en la migración de leucocitos (45), y tras la adhesión fuerte el proceso de migración se vuelve independiente de la tensión de cizallamiento (56). La ausencia de tensión de cizallamiento de fluido en el sistema de cultivo, por lo tanto, tiene poca relevancia fisiológica, y las predicciones hechas basándose en este modelo *in vitro* se han confirmado en varios modelos *in vivo* (2, 6, 8, 9, 12). La clave para este ensayo es observar los leucocitos *in situ* en relación con la monocapa de células endoteliales confluentes. Usando la óptica de Nomarski, se pueden distinguir por el plano de enfoque los leucocitos que están unidos a la superficie apical de la monocapa de los que han transmigrado. Entonces se puede cuantificar el número total de leucocitos asociados con la monocapa visualmente o por cuantificación de leucocitos marcados con fluorescencia (1, 45) para evaluar el efecto de un reactivo sobre la adhesión al endotelio. La trans migración se cuantifica como el porcentaje de los leucocitos que permanecen asociados con la monocapa que han migrado detrás de la monocapa. Por lo tanto, una medición de MTE es independiente del grado de adhesión a la monocapa y los efectos de anticuerpos u otros reactivos sobre la adhesión y MTE pueden evaluarse independientemente.

Evidentemente, si un leucocito no se adhiere a la superficie endotelial, no puede transmigrar. Se podría argumentar, por ejemplo, que la población de leucocitos que transmigran normalmente en presencia de anti-CD18 podría ser una subpoblación separada o podría ser, usando una ruta diferente, que los leucocitos "dependientes de CD18" [que no se unen en presencia de mAc] usados hubieran podido adherirse. Para solucionar este asunto, se pueden repetir estos experimentos modificando el procedimiento como se indica a continuación: Optimizar las condiciones de activación de citocinas de tal forma que haya múltiples receptores de adhesión expresados en la superficie endotelial [E- y P-selectina, ICAM-1, VCAM-1] de tal forma que el bloqueo de uno cualquiera particular no afecte notablemente a la adhesión apical de la población de leucocitos debido a la redundancia de las moléculas de adhesión. El ensayo de MTE se realizaría en estas condiciones. Si la adhesión se ve mínimamente afectada por la presencia del mAc de ensayo pero se reduce la MTE, se podría concluir que la molécula en cuestión jugaba un papel en la MTE que era independiente de su papel en la adhesión apical. A continuación se analizarán otras modificaciones del ensayo de MTE convencional haciendo referencia a situaciones particulares.

El papel de HEC2 en la migración transendotelial

¿Qué células llevan la proteína HEC crítica? En los experimentos proporcionados más adelante, el mAc hec2 estaba presente durante la MTE y, por lo tanto, los resultados no distinguían si el bloqueo en la MTE se debía a la unión de hec2 a los monocitos, al endotelio o a ambos. Pueden usarse fragmentos Fab y F[ab']₂ purificados de hec2 preunido selectivamente a leucocitos o células endoteliales para determinar sobre qué célula es crítico el antígeno. Esto evita problemas potenciales con anticuerpos que llevan moléculas Fc intactas que se unen a los leucocitos a través de sus receptores de Fc de alta afinidad, o del cambio de las monocapas de células endoteliales a complejos inmunes y la estimulación de la adhesión de leucocitos a través de receptores de Fc de baja afinidad a mAc unidos al endotelio. Los experimentos de dosis-respuesta determinarán las concentraciones de bloqueo óptimas. Estos experimentos se repiten en PMN.

Para mostrar que el leucocito CD99/HEC2 es crítico para la MTE, se incuban monocitos o PMN en suspensión durante 30 minutos a 4 °C con concentraciones de saturación de fragmentos Fab de hec2 [como se determinan por citometría de flujo], y después se lavan para liberarse del mAc no unido. Los leucocitos se añaden a monocapas de HUVEC no tratadas y el ensayo de MTE se realiza como es habitual. Como control positivo, se podría realizar el ensayo de MTE en la presencia continuada de concentraciones óptimas de hec2, condiciones que se sabe que bloquean la MTE. Si los fragmentos Fab de hec2 unidos a los leucocitos solos bloquean la MTE tan eficazmente como el Fab añadido a los dos tipos celulares simultáneamente, se podría interpretar que esto significa que la proteína CD99/HEC2 en el leucocito era crítica. Sin embargo, esto no descarta un papel para la proteína HEC2

5 endotelial. Si el hec2 añadido sólo a los leucocitos bloqueaba la MTE muy poco, esto sería consistente con que la célula endotelial que lleva la proteína CD99/HEC2 crucial posiblemente se unía a una molécula diferente en el leucocito. Si el hec2 añadido a los leucocitos bloqueaba parcialmente, se sospecharía que es crítica la proteína CD99/HEC2 tanto en los leucocitos como en las células endoteliales, pero se unen a diferentes moléculas en las células yuxtapuestas. Independientemente de cuál sea el resultado, los experimentos adicionales ensayan las hipótesis alternativas.

10 Para mostrar que la proteína HEC2 endotelial es crítica para la MTE, se incuban monocapas HUVEC confluentes con fragmentos Fab o F[ab']₂ de hec2 en condiciones determinadas por inmunofluorescencia y citometría de flujo para producir una tinción máxima y saturada de HEC2 en las uniones. [Para mAc contra PECAM y VE-cadherina, los presentes inventores han descubierto que es suficiente 1 hora a 4 °C, pero puede ponerse directamente]. El mAc no unido se retira por lavado, se añaden Mo o PMN no tratados y el co-cultivo se calienta a 37 °C para el ensayo de MTE. De nuevo, preferentemente se procesan controles positivos en la presencia continuada de concentraciones óptimas de hec2. Si el bloqueo en la MTE producido cuando se añade hec2 sólo a las células endoteliales es tan grande como el control positivo cuando se exponen los dos tipos de células al mAc, se podría concluir que la proteína HEC2 en las células endoteliales es crítica. Un bloqueo deficiente en estas condiciones sugeriría que la proteína HEC2 presente en el endotelio no es importante en estas condiciones. De nuevo, un nivel intermedio de bloqueo sugeriría que están implicadas proteínas HEC2 tanto de leucocitos como de células endoteliales, que quizás se unen a diferentes moléculas.

20 La presencia de HEC2 tanto en leucocitos como en células endoteliales sugiere que la proteína HEC2 de los leucocitos puede interactuar de una forma homofílica con la proteína HEC2 del endotelio. Si puede conseguirse un bloqueo óptimo de MTE por unión del mAc a leucocitos o células endoteliales, y no hay un bloqueo aditivo cuando el mAc se añade a ambos, esto sugeriría que la proteína HEC2 de los leucocitos interactúa directamente con la proteína HEC2 de las células endoteliales, de una manera homofílica similar a PECAM-1. Esto puede ensayarse directamente con la proteína clonada.

25 Hay explicaciones alternativas para el bloqueo incompleto en MTE en estos experimentos. La más común es la endocitosis o destrucción del mAc unido a las células durante el ensayo de tal forma que caiga hasta niveles insuficientes para bloquear la MTE. Si hay un bloqueo incompleto cuando el mAc se une previamente a células en los ensayos anteriores, esta posibilidad puede ensayarse alterando el ensayo de MTE como se indica a continuación: después de la preunión de hec2 al tipo celular deseado, el mAc no unido se retira por lavado y las células se mantienen a 4 °C. Se añaden leucocitos a las monocapas de HUVEC en hielo y se dejan sedimentar en frío. En estas condiciones, el anticuerpo no se metaboliza cuando los leucocitos sedimentan en la superficie de la monocapa. En frío, no se adhieren firmemente. Cuando la mayoría de las células han sedimentado, el recipiente de cultivo se calienta rápidamente a 37 °C en la incubadora y los leucocitos se adhieren firmemente y transmigran en 5-10 minutos. La microscopía de inmunofluorescencia demuestra que la inmensa mayoría de mAc aún están presentes en las células al final de este periodo de tiempo. Esta adaptación del procedimiento permite estudiar los efectos del mAc añadido antes de que se metabolice.

30 Otra explicación para la incapacidad de hec2 de bloquear la MTE cuando se añade únicamente un tipo celular es que el epítipo de CD99/HEC2 reconocido por el mAc hec2 no es el usado por ese tipo celular. Por ejemplo, si el extremo amino de HEC2 endotelial interactúa con un epítipo de la proteína CD99/HEC2 de leucocitos que está próximo a la membrana, y el epítipo de hec2 está en el extremo amino de CD99/HEC2, sería de esperar que la adición de hec2 a HUVEC bloqueara la MTE, pero la adición de hec2 solo a leucocitos no lo haría.

45 También puede evaluarse la posición de CD99/HEC2 en el orden de acontecimientos de adhesión con respecto a PECAM. Cuando se bloquea la función de PECAM, los leucocitos permanecen fuertemente adherentes al endotelio en los bordes celulares incluso en presencia de EDTA. Esto sugiere que se unen por moléculas distintas de las interacciones de integrina/ICAM dependientes de cationes divalentes. Probablemente CD99/HEC2 es la molécula a la que se unen. Si los leucocitos se unieran a través de CD99/HEC2, se liberarían cuando se añade el mAc bloqueante. Esto se ajusta a los datos en los que hec2 bloqueaba parcialmente la adhesión de Mo y PMN. Si CD99/HEC2 funcionara en una etapa distal a PECAM, no habría ningún efecto de la adición de mAc en esta etapa.

50 Para mostrar esto, se realizan varias series de experimentos en los que primero se detienen leucocitos en MTE por el mAc anti-PECAM. En la primera serie, posteriormente se añade hec2 o mAc de control de isotipo en presencia continuada de anti-PECAM. Si se liberan leucocitos unidos, HEC2 es probablemente la molécula que se une a los leucocitos frente al bloqueo de PECAM. La incapacidad de liberar leucocitos podría deberse a una diversidad de factores. Por lo tanto, se realiza una segunda serie de experimentos en los que, después de la detención de la MTE por mAc anti-PECAM, los reactivos anti-PECAM se retiran por lavado y se añade hec2 o mAc de control. Después de la retirada del mAc anti-PECAM por lavado, la MTE se reanuda normalmente y se completa en 30-90 minutos (1) en ausencia de inhibidores adicionales. Si HEC2 funcionara en una etapa próxima a PECAM, no sería de esperar que se viera ningún bloqueo, y la MTE se completaría normalmente. Sin embargo, si HEC2 estuviera implicada en una etapa distal a PECAM, sería de esperar que continuara la detención de la MTE.

60 Puede realizarse una tercera serie de experimentos análoga a la segunda en los que se invertiría el orden de aplicación del mAc. Como hec2 bloquea significativamente la adhesión además de la MTE, estos experimentos se

realizan en condiciones en la que se inducen moléculas de adhesión apical por citocinas para mantener los leucocitos sobre la superficie endotelial en presencia de hec2. La MTE primero se detiene por la aplicación de mAc hec2, y después se añade mAc anti-PECAM posteriormente a la eliminación por lavado de hec2. En estos experimentos, el mAc anti-PECAM no impediría la MTE posterior cuando hec2 se retira por lavado si funcionara de forma proximal a HEC2, pero la bloquearía si PECAM funcionara distalmente. Como los leucocitos bloqueados por reactivos anti-PECAM permanecen fuertemente adherentes a las células endoteliales, la repetición de la primera serie de experimentos con el orden de reactivos invertido no sería instructiva, pero podría realizarse como un control interno.

Caracterización de CD99/HEC2

Se obtuvieron indicios de la función completa e importancia de esta molécula a partir de varios ensayos sencillos (45, 48, 57-59). Estos estudios bioquímicos e inmunológicos complementan los datos derivados de la clonación y secuenciación de la molécula.

Velocidad de biosíntesis y renovación de esta proteína

En experimentos de pulso y persecución se marcan metabólicamente monocapas de HUVEC pretratadas durante una hora en medio sin metionina ni cisteína, con ³⁵S-metionina y cisteína durante una hora seguido de una "persecución" en medio no radiactivo. A diversos puntos de tiempo, las células se lisan y se someten a inmunoprecipitación con hec2 y mAc de control para recuperar los antígenos HEC2 y de control. Éstos se analizan por SDS-PAGE y se someten a autorradiografía (48). La velocidad de síntesis y modificación postraducciona se determina en relación con otros marcadores de la membrana endotelial tales como PECAM-1, VE-cadherina [moléculas funcionales] e ICAM-1 o MHC de clase I [expresado de forma difusa en el plasmalema] por densitometría de los autorradiogramas, o directamente por escisión de las bandas radiactivas del gel (58, 59). La velocidad de renovación puede determinarse directamente en experimentos separados en los que se marcan metabólicamente HUVEC hasta el estado estacionario, y después se extrae el medio radiactivo. Se realiza inmunoprecipitación de los lisados celulares en puntos de tiempo durante dos días y se analiza como se ha indicado anteriormente para determinar la presencia de marcadores de células de control y HEC2 radiactivo.

Formas alternativas de CD99/HEC2

Se lisan células endoteliales, monocitos, PMN, plaquetas y linfocitos y se someten a sondas por transferencia de Western con un anticuerpo anti-CD99/HEC2, por ejemplo, hec2. Este enfoque ha identificado una molécula de 30 kD tanto por transferencia de Western como por inmunoprecipitación de HUVEC. Sin embargo, las HUVEC cultivadas en diferentes condiciones [por ejemplo, estimulación con citocinas] pueden expresar formas de corte y empalme alternativo de HEC2 que está glicosilado de una manera diferente que las células en condiciones de reposo. Este descubrimiento sugeriría que HEC2 tendría funciones diferentes [o potenciadas] en estas condiciones que pueden ensayarse directamente realizando el ensayo de MTE en esas condiciones de citocinas. Los leucocitos pueden expresar una molécula estructuralmente diferente que lleva el mismo epítipo de hec2. Si es así, la molécula puede tener diferentes interacciones o rutas de señalización en esos tipos celulares y más de un clon de ADNc.

Asociación con otras moléculas

En las condiciones de extracción en las que los presentes inventores usaron Nonidet P-40 al 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato, seguido de lavados de los inmunoprecipitados en NP-40 al 0,5 % + SDS al 0,1 %, no se co-purificó ninguna otra molécula con HEC2 a partir de los lisados de HUVEC. La precipitación inmune de lisados de leucocitos o CE en diferentes condiciones de detergentes puede revelar una asociación con otras moléculas que pueden transducir señales o asociarlo al citoesqueleto. Estas moléculas se identifican basándose en la reactividad con anticuerpos disponibles en el mercado contra moléculas estructurales y de señalización conocidas, y se generará una primera hipótesis sobre las rutas de transducción de señales o elementos del citoesqueleto con los que interacciona HEC2.

Cambios en la expresión de CD99/HEC2 en respuesta a citocinas inflamatorias

La implicación de HEC2 en la inflamación sugiere esto. La expresión de ICAM-1 aumenta cuando las HUVEC se estimulan por IL-1β o TNFα (45, 60). Los niveles de PECAM no aumentan frente al tratamiento con citocinas, pero el tratamiento con IFNγ produce una redistribución de PECAM fuera de la unión hacia la superficie apical de la célula (61). En un ensayo específico, se tratan monocapas de HUVEC confluentes con citocinas relevantes para la inflamación [por ejemplo, IL-1β, 3-10 U.I./ml durante 6 a 24 horas; IFNγ, 100 U.I./ml durante 1 a 3 días] y se emplea inmunofluorescencia para evaluar un cambio en la expresión o distribución. Pueden usarse moléculas de adhesión que responden a citocinas conocidas [por ejemplo, ICAM-1 y MHC de clase II o PECAM, respectivamente] como controles positivos. Los cambios en los niveles de expresión son cuantificables, por ejemplo, por citometría de flujo.

La identificación de cambios relevantes *in vitro* proporciona pruebas de que también se producen *in situ*. Puede usarse histoquímica de inmunoperoxidasa para determinar la expresión y distribución celular en el sistema vascular en tejidos inflamados de diversos órganos del cuerpo humano y comparar con su expresión en el sistema vascular de tejidos normales correspondientes. Se dispone de una amplia diversidad de "tejidos residuales" para alquilar, por

ejemplo, procedentes de muestras de anatomía patológica y de autopsias, o piel de pacientes con psoriasis. Pueden compararse la piel con lesiones y sin lesiones de la misma persona al mismo tiempo, y biopsias tomadas durante el transcurso del tiempo.

El mecanismo de acción de HEC2

5 La secuencia de aminoácidos prevista de la molécula proporciona una indicación de sus funciones potenciales (Figura 4). La "observación de secuencias" proporciona un sitio de partida para la experimentación. La molécula clonada se expresa en una diversidad de células de mamífero para determinar la función o funciones que la molécula transmite a estas células, por ejemplo, de forma similar a experimentos con las moléculas de adhesión de las uniones PECAM (7, 49, 53, 65) y VE-cadherina (29). Tienen una importancia particular las formas solubles de CD99/HEC2, es decir, el dominio extracelular de la parte de unión a ligando de la misma, que pueden usarse como inhibidores de la función de CD99/HEC2. En un aspecto específico, se preparan quimeras CD99-Ig, análogas a la construcción quimérica PECAM-Ig analizada más adelante.

15 Como la adición de *hec2* a CE retrasaba la formación de monocapas confluentes, una hipótesis razonable es que HEC2 tiene funciones adhesivas. Como se expresa tanto en leucocitos como en el endotelio, se podría sospechar que media interacciones homofílicas entre estas células. Esto se ensayará tanto en ensayos a corto plazo [ensayos de agregación de células T] como en ensayos a largo plazo [cultivo] como se ha descrito previamente (7, 29, 49, 53, 65).

20 Las células L son una línea celular de fibroblastos murinos que muestra poca tendencia a unirse espontáneamente entre sí. La expresión de moléculas de adhesión exógenas por transfección les transmite las propiedades adhesivas de esas moléculas. Se resuspenden de forma no enzimática células L transfectadas con ADNc de HEC2 por breve incubación en EDTA 10 mM, se lavan y se resuspenden en tampón a 10^6 células/ml. Un ml de esta suspensión se pone en cada pocillo de una bandeja de cultivo de 24 pocillos y se pone en un agitador giratorio a 90 rpm. A tiempo cero y a diversos puntos de tiempo hasta una hora, la agregación se detiene añadiendo glutaraldehído a una concentración final del 2 %. Si las células L que expresan HEC2 en su superficie se unen entre sí, formarán agregados que se cuantifican en un hemocitómetro. En dicho ensayo se ensayan fácilmente la dependencia de la temperatura y la dependencia de cationes divalentes de la adhesión. Se añaden inhibidores potenciales de la adhesión a tiempo cero y se cuantifica su efecto sobre la adhesión. En particular, el mAc *hec2*, que bloquea la trans migración de leucocitos, bloquearía la adhesión.

30 Como tanto las CE como los leucocitos tienen HEC2, es razonable proponer la hipótesis de que la adhesión es homofílica. Es decir, una molécula de HEC2 en una célula se une a una molécula de HEC2 en la célula yuxtapuesta. Para ensayar esta hipótesis, se mezclan dos poblaciones de células L. Se mezclan transfectantes de HEC2 en el ensayo de agregación con un número igual de células parentales marcadas con fluorescencia. Al final del ensayo, los agregados se examinan con el microscopio de fluorescencia. Si la unión es homofílica, en los agregados deben estar sólo los transfectantes de HEC2, que no serían fluorescentes. Si la unión es heterofílica [HEC2 se une a otra molécula endógenamente expresada en la superficie de las células L], entonces se verán agregados mixtos de células marcadas y no marcadas (65). El ensayo después se repite con las poblaciones marcadas cambiadas.

35 Estos ensayos demuestran que las células L transfectadas con CD99 se agregan de una manera homofílica que es dependiente de cationes divalentes y bastante insensible a la temperatura en el intervalo de 4° - 37° .

40 Estos ensayos se repiten mezclando transfectantes de HEC2 con leucocitos o células endoteliales, que supuestamente contienen ligandos para HEC2. En este caso, sería de esperar que los transfectantes de HEC se unieran a los leucocitos o células endoteliales de una manera que se bloqueara por la adición de *hec2* a los transfectantes, pero no a los leucocitos o CE.

45 En ensayos a largo plazo, las células transfectadas se mezclan con fibroblastos no transfectados en cultivo, que de nuevo se distinguen por un marcador exógeno. Las células se co-cultivan durante varios días y después se tiñen con *hec2* para determinar la distribución. Si la unión es homofílica en las uniones, entonces HEC2 se concentrará solo en los límites que forman las células transfectadas entre sí y no en los límites que forman con células no transfectadas.

50 Si la interacción entre HEC2 en las células endoteliales y los leucocitos es heterofílica, esto eleva la posibilidad de que haya ligandos únicos en los leucocitos para HEC2 endotelial y en células endoteliales para HEC2 de leucocito. Los ligandos de HEC2 en leucocitos y células endoteliales pueden identificarse mezclando transfectantes de HEC2 con grandes números de leucocitos radiomarcados y ECV-304, respectivamente. Las células se lisan en condiciones de detergente suave y los lisados se pasan sobre una columna de *hec2*-Sepharose. Esto unirá HEC2 y su ligando acoplado. El material unido se eluye y procesa en SDS-PAGE. Las bandas radiactivas representan ligandos de HEC2 candidatos. Estas bandas se cortan de los geles y se someten a secuenciación de proteínas.

Función de HEC2 en la MTE

El mAc *hec2* bloquea al menos dos funciones. La adición del mAc a cultivos de HUVEC confluentes retrasa la formación de una monocapa confluyente. La adición del mAc a co-cultivos de células endoteliales-leucocitos bloquea

la MTE. De esta manera, la adhesión del mAc a las células previene la interacción de HEC2 con una molécula en la célula yuxtapuesta [o se secreta en solución] o estimula una acción. CD99/HEC2 puede actuar como una molécula de adhesión, y/o puede ser responsable de la señalización de calcio inicial requerida para la MTE. Puede usarse el clon de ADNc de CD99/HEC2 para confirmar estas funciones.

- 5 Se sabe que se requiere un aumento en el calcio libre intracelular en las células endoteliales para la MTE (66). El bloqueo de este momento inhibirá la trans migración, pero no la adhesión de PMN, en las células endoteliales (66). Puede usarse Fluo3 [Molecular Probes, Eugene, OR], u otros reactivos sensibles a Ca^{++} para determinar si tiene lugar una entrada de calcio intracelular poco después del acoplamiento de leucocitos/CE. En una realización específica, se lavan monocapas de HUVEC confluentes para eliminar el suero y se incuban con Fluo3-AM [3,3 mM solubilizado en Pluronic F-127 y DMSO] en suero bovino inactivado térmicamente durante 40 minutos a temperatura ambiente. Esto se difunde al interior de las células en las que las esterasas citoplásmicas escinden el éster metílico de acetoxi, haciendo que la membrana sea impermeable al colorante. Se añade sulfpirazona [0,25 mM] o probenecid [2,5 mM] para bloquear los transportadores de aniones orgánicos que bombean el colorante al exterior de la célula y al interior de los endosomas (67). Una elevación en el calcio intracelular produce un aumento espectacular en la fluorescencia de Fluo3, que puede cuantificarse en el instrumento Cytofluor® de los presentes inventores, visualizarse por microscopía de fluorescencia, o detectarse por citometría de flujo en el canal de FITC.

- 10 Cuando los leucocitos migran a través de estas monocapas de HUVEC cargadas con Fluo3, hay un aumento de fluorescencia debido a un aumento en el calcio libre citosólico $[Ca^{++}]_i$. Este flujo de calcio puede bloquearse por el mAc hec2; si es así, HEC2 es responsable de generar esta señal. La implicación directa de HEC2 en la señalización de calcio puede ensayarse diseñando condiciones en las que los transfectantes de HEC2 reproducen el mismo fenómeno. Si las interacciones homofílicas de HEC2 entre leucocitos y el endotelio estimulan la elevación en $[Ca^{++}]_i$, entonces el entrecruzamiento de HEC2 en HUVEC por mAc podría estimularla también.

Clonación del equivalente murino y fabricación del mAc de bloqueo

- 25 Los efectos de hec2 sobre la MTE de monocitos y PMN en el ensayo *in vitro* proporciona información sobre el papel de HEC2 en la MTE. Para ensayar esto *in vivo*, se generan anticuerpos bloqueantes contra el homólogo murino y se obtienen ratones deficientes en HEC2. La molécula de CD99/HEC2 murina se reivindica como una proteína recombinante producida, y se usa para generar anticuerpos monoclonales, por ejemplo, en ratas, conejos o hámsteres. Como alternativa, pueden generarse anticuerpos contra péptidos de CD99/HEC2 murinos a partir del dominio extracelular.

- 30 Las bibliotecas murinas se exploran con el clon humano de longitud completa de los presentes inventores, basándose en regiones homólogas para hibridar con una rigurosidad razonable. Esta es la manera en la que se clonó PECAM-1 murino basándose en el clon humano (53).

- 35 Pueden generarse anticuerpos policlonales contra CD99/HEC2 humano en conejos que presentan reacción cruzada con el antígeno hec2 murino. Si es así, la forma murina de la molécula podría clonarse usando este anticuerpo para explorar bibliotecas de expresión de ADNc de células endoteliales o leucocitos murinos. El clon de ADNc murino se secuencian y subclona en vectores de expresión de mamífero. Las células transfectadas se someten a los mismos ensayos que identificaron las funciones de la forma humana para confirmar su identidad como proteína CD99/HEC2 murina, reconociendo que los ligandos y la ruta de traducción de señales podrían diferir entre especies.

- 40 En una realización específica, se usan fibroblastos de rata transfectados de forma estable que expresan altos niveles de la proteína murina para inmunizar ratas de la misma clase MHC que los fibroblastos. De esta manera, la proteína extraña principal en las células será HEC2 murino. Se generarían hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales por fusión de linfocitos B esplénicos con células de mieloma de rata usando procedimientos convencionales (68, 69). Éstos se exploran seleccionando los clones cuyos sobrenadantes se unen a los fibroblastos transfectados usados para la inmunización pero no a los fibroblastos de rata parentales. La inmunización con antígeno expresado en las células es una forma más eficaz para obtener mAc que bloqueen la función en células intactas que la inyección de antígeno purificado en adyuvante de Freund. Los hibridomas se ensayan con respecto a su capacidad de bloquear funciones *in vitro* de las células transfectadas así como de unirse al antígeno murino auténtico en leucocitos y en endotelio. Los hibridomas clonados se expanden y se prepara IgG purificada para los estudios *in vivo*.

Ensayos de trans migración en ratones defectuosos en PECAM

- 50 Los presentes inventores han producido recientemente ratones transgénicos que expresan constitutivamente PECAM murina soluble como una proteína quimérica PECAM-IgG dimérica. Los ratones de la línea Tg8₂₀ que tienen concentraciones circulantes de 20 µg/ml (que corresponden a los niveles alcanzados por dosis de PECAM-IgG administrada de forma exógena que bloquean la inflamación a un nivel máximo) están sanos en el entorno limpio de la instalación para los animales, pero tienen una respuesta inflamatoria aguda severamente debilitada. Sólo movilizan un 10-20 % de los PMN y monocitos con respecto a sus compañeros de camada de tipo silvestre. Esto sugiere que un huésped normal no se vuelve tolerante a los niveles terapéuticos de este reactivo anti-PECAM. Estos ratones son valiosos para estudiar el papel de PECAM en la inflamación crónica y el efecto de la interferencia

crónica con la función de PECAM sobre la respuesta inflamatoria. Estos ratones también demuestran que la expresión de un inhibidor de la inflamación (es decir, PECAM-IgG) a niveles terapéuticos no inhibe respuestas inflamatorias basales tales como la reparación de heridas subclínicas y no vuelve a los ratones inmunodeficientes. De esta manera, es probable que pudieran administrarse niveles terapéuticos de reactivos anti-CD99 crónicamente sin efectos adversos sobre células implicadas en la respuesta inflamatoria.

Diverso laboratorios han establecido que PECAM desempeña un papel crítico en la MTE de neutrófilos [PMN], monocitos [Mo] y células asesinas naturales [NK]. Los inhibidores de la función de PECAM bloquean la inmensa mayoría de MTE tanto *in vitro* (1, 4, 6, 7) como *in vivo* en varios modelos diferentes (2, 8-11). Sin embargo, incluso en las condiciones más óptimas, los presentes inventores nunca han podido bloquear MTE más del 80-90 % usando anticuerpos monoclonales o policlonales, quimeras PECAM-IgG solubles o combinaciones de los mismos (4, 6). Incluso el ratón transgénico de PECAM-IgG Tg8₂₀ expuesto constitutivamente a concentraciones terapéuticas máximas [20 mg/ml] sigue movilizando el 10-20 % de sus leucocitos en respuesta a un estímulo inflamatorio agudo. Estos datos sugieren que normalmente existen rutas independientes de PECAM y son responsables de esta migración de leucocitos residual frente al bloqueo máximo de PECAM. En algunas condiciones inflamatorias, particularmente crónicas, esta MTE residual puede ser suficiente para producir síntomas clínicos frente a una terapia anti-PECAM máximamente eficaz. Por lo tanto, es importante identificar estas rutas alternativas de MTE, determinar cómo funcionan y cuál es la mejor manera de inhibirlas.

En un modelo de inflamación aguda en el que se estimuló la migración de neutrófilos por la aplicación del péptido quimiotáctico formil-metionil-leucil-fenilalanina [fMLP] directamente en el mesenterio de ratas, el anticuerpo anti-PECAM no bloqueó la extravasación de PMN, mientras que el mismo anticuerpo bloqueaba la extravasación de PMN cuando se usaba IL-1 β para activar el endotelio de vénulas mesentéricas (9). De esta manera, al menos hay un estímulo que inducirá la migración de leucocitos independiente de PECAM en animales de tipo silvestre. Los ratones homocigotos para una delección dirigida de PECAM-1 no muestran ningún defecto significativo en una diversidad de modelos inflamatorios agudos (26). Estos ratones, por definición, usan mecanismos alternativos para la MTE.

Se ha demostrado que la terapia anti-PECAM bloquea la MTE en el mesenterio (2, 6, 8, 9), el pulmón (8), la piel (8, 11), el miocardio (10, 12) y probablemente la córnea (27). Sin embargo, esto deja abierta la posibilidad de que en otros lechos vasculares el papel de PECAM sea menos importante. La mayor parte de la migración de leucocitos en sitios de inflamación aguda se realiza a través de vénulas postcapilares. En el pulmón, sin embargo, la migración tiene lugar a través de capilares. En la aterosclerosis y muchas formas de arteritis, la migración de leucocitos tiene lugar a través del endotelio arterial.

Un obstáculo formidable en la caracterización de CD99/HEC2 *in vivo* es que en ratones de tipo silvestre, los reactivos anti-PECAM bloquean la transmigración igual de bien. Dados los errores típicos intrínsecos en los experimentos animales, cuando anti-PECAM bloquea el 85 \pm 10 % de la migración de leucocitos, puede ser muy difícil identificar un bloqueo en el \sim 15 % residual. Por consiguiente, se han desarrollado dos tipos de ratones diferentes para estudiar la ruta o rutas de transmigración independientes de PECAM. En estos ratones, todas las MTE tienen lugar a través de rutas independientes de PECAM. Los ratones con una delección dirigida del gen de PECAM-1 tienen un número normal de leucocitos y únicamente tienen un defecto muy pequeño en su respuesta inflamatoria. Estos ratones se han desarrollado en ausencia de PECAM, de forma que tienen que usar moléculas de adhesión alternativas para la MTE. Además, se han desarrollado dos líneas independientes de ratones transgénicos [Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀] que expresan constitutivamente niveles supratrapéuticos de la quimera PECAM-IgG soluble, que circula en su sangre a 500-2000 μ g/ml. Aunque la proteína transgénica que expresan es perfectamente activa cuando se transfiere a ratones de tipo silvestre, estos ratones son paradójicamente resistentes a sus efectos antiinflamatorios. Como estos ratones tienen niveles normales de PECAM endógena en sus leucocitos y células endoteliales, tienen que estar usando rutas independientes de PECAM para la MTE.

El fenotipo inflamatorio normal de los "knockout" de PECAM sugiere que las rutas independientes de PECAM pueden expandirse cuantitativamente para soportar niveles normales de MTE. Los resultados obtenidos con los ratones transgénicos Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀₀ sugieren que niveles muy elevados de reactivos anti-PECAM circulantes pueden desensibilizar al huésped a lo largo del tiempo frente a sus efectos antiinflamatorios. Estos ratones transgénicos se usan para caracterizar con más detalle las rutas de CD99/HEC2 de la MTE.

Exploración y Química

De acuerdo con la presente divulgación, las secuencias de nucleótidos derivadas del gen que codifica CD99/HEC2 y las secuencias peptídicas derivadas de CD99/HEC2 son dianas útiles para identificar fármacos que sean eficaces para tratar afecciones inflamatorias. Las dianas de los fármacos incluyen, sin limitación (i) ácidos nucleicos aislados derivados del gen que codifica CD99/HEC2; (ii) péptidos y polipéptidos aislados derivados de polipéptidos de CD99/HEC2; péptidos y polipéptidos aislados derivados de compañeros de unión a CDE99/HEC2; grupos carbohidrato encontrados en CD99/HEC2; y miméticos de molécula pequeña o análogos de los mismos.

En particular, la identificación de CD99/HEC2 como un mediador importante de la MTE permite el desarrollo de ensayos de exploración, particularmente para la exploración de alto rendimiento de moléculas que regulan positiva o negativamente la actividad de CD99/HBC2. Por consiguiente, la presente invención contempla procedimientos para

identificar ligandos específicos de CD99/HEC2 usando diversos ensayos de exploración conocidos en la técnica.

Puede usarse cualquier técnica de exploración conocida en este campo para seleccionar agonistas o antagonistas de CD99/HEC2. La presente invención contempla selecciones de ligandos de molécula pequeña o análogos de ligando y miméticos, así como selecciones de ligandos naturales que se unen y agonizan o antagonizan CD99/HEC2 *in vivo*. Dichos agonistas o antagonistas pueden interferir, por ejemplo, en las propiedades de adhesión o propiedades de MTE de CD99/HEC2, con efecto resultantes sobre la función de CD99/HEC2. Por ejemplo, pueden explorarse bibliotecas de productos naturales usando ensayos de la invención para encontrar moléculas que agonizan o antagonizan la actividad de CD99/HEC2.

El conocimiento de la secuencia primaria de CD99/HEC2 y las similitudes de esa secuencia con proteínas de función conocida, pueden proporcionar una indicación inicial en cuanto a los inhibidores o antagonistas de la proteína. La identificación y exploración de antagonistas se facilita adicionalmente determinando características estructurales de la proteína, por ejemplo, usando cristalografía de rayos X, difracción de neutrones, espectrometría de resonancia magnética nuclear y otras técnicas para la determinación de la estructura. Estas técnicas proporcionan el diseño racional o la identificación de agonistas y antagonistas.

Otro enfoque usa bacteriófagos recombinantes para producir bibliotecas grandes. Usando el "procedimiento de fago" (Scott y Smith. *Science* 1990, 249:386-390; Cwirla, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 6378-6382; Devlin y col., *Science* 1990, 49:404-406), pueden construirse bibliotecas muy grandes (10^6 - 10^8 entidades químicas). Un segundo enfoque usa procedimientos principalmente químicos, de los cuales son ejemplos el procedimiento de Geysen (Geysen y col., *Molecular Immunology* 1986, 23:709-715; Geysen y col. *J. Immunol. Meth.* 1987, 102:259-274; y el procedimiento de Fodor y col. (*Science* 1991, 251:767-773). Furka y col. (14^o Congreso Internacional de Bioquímica, 1988, Volumen n^o 5, Abstract FR:013; Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1991, 37:487-493), Houghton (Patente de Estados Unidos N^o 4.631.211) y Rutter y col. (Patente de Estados Unidos 5.010.175) describen procedimientos para producir una mezcla de péptidos que pueden ensayarse como agonistas o antagonistas.

En otro aspecto, pueden usarse bibliotecas sintéticas (Needels y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90:10700-4; Ohlmeyer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 10922-10926; Publicaciones PCT N^o WO 92/00252 y WO 9428028) y similares para seleccionar ligandos de CD99/HEC2 de acuerdo con la presente invención.

Los compuestos de ensayo se seleccionan en bibliotecas grandes de compuestos sintéticos o naturales. Actualmente se usan numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de compuestos basados en sacáridos, péptidos y ácidos nucleicos. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles en el mercado en Maybridge Chemical Co. (Trevillet. Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), y Microsource (New Milford, CT). Se dispone de una biblioteca química rara en Aldrich (Milwaukee, WI). Como alternativa, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de bacterias, hongos, extractos de plantas y animales en, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (NC), o se pueden producir fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos naturales y producidos sintéticamente se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales (Blondelle y col., *Tib Tech* 1996, 14:60).

Procedimientos de exploración *in vitro*

Los agentes candidatos se añaden a cultivos de células *in vitro* de células endoteliales, o a CD99/HEC2 purificada (preferentemente en una forma soluble estable, por ejemplo, expresada como una construcción quimérica CD99/Ig) y se evalúa su capacidad de unirse a CD99 (particularmente para una exploración primaria para identificar compuestos candidatos) o, más preferentemente, su capacidad para inhibir la unión de leucocitos a CD99/HEC2. En sistemas de cultivo de células endoteliales, puede evaluarse la capacidad de inhibir la MTE.

Anteriormente se han descrito varios sistemas *in vitro* adecuados.

Procedimientos de exploración *in vivo*

Pueden usarse células intactas o animales enteros que expresan un gen que codifica CD99/HEC2 en procedimientos de exploración para identificar y caracterizar adicionalmente fármacos candidatos. Cualquiera de los modelos animales o modelos de animales transgénicos descritos anteriormente son adecuados para la selección de antagonistas de CD99/HEC2.

En una serie de realizaciones, se establece una línea celular permanente. Como alternativa, se programan transitoriamente células (incluyendo, sin limitación, células de mamífero, insecto, levadura o bacterianas) para expresar un gen *CD99/HEC2* por introducción del ADN o ARNm apropiado, por ejemplo, usando los sistemas de vectores descritos anteriormente. La identificación de compuestos candidatos puede conseguirse usando cualquier ensayo adecuado, incluyendo sin limitación (i) ensayos que miden la unión selectiva de los compuestos de ensayo a CD99/HEC2, (ii) ensayos que miden la capacidad de un compuesto de ensayo para modificar (es decir, inhibir o aumentar) una actividad o función medible de CD99/HEC2 y (iii) ensayos que miden la capacidad de un compuesto para modificar (es decir, inhibir o aumentar) la actividad de transcripción de secuencias derivadas de las regiones promotoras (es decir, reguladoras) del gen CD99/HEC2.

Ensayos in vivo usando animales transgénicos

Pueden prepararse mamíferos transgénicos para evaluar los mecanismos moleculares de CD99/HEC2 como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, para evaluar compuestos para uso en terapia humana, los animales se "humanizan" con respecto a CD99/HEC2. Dichos animales proporcionan modelos excelentes para seleccionar o ensayar candidatos de fármacos. El término "transgénico" normalmente se refiere a un animal cuya línea germinal y células somáticas contienen el transgén de interés, es decir, CD99/HEC2. Sin embargo, pueden crearse animales transgénicos transitorios por introducción *ex vivo* o *in vivo* de un vector de expresión de la invención. Los dos tipos de animales "transgénicos" se contemplan para uso en la presente invención, por ejemplo, para evaluar el efecto de un compuesto de ensayo sobre la actividad de CD99/HEC2.

De esta manera, pueden prepararse mamíferos "knock-in" para CD99/HEC2 humana, o CD99/HEC2, o ambas, para evaluar la biología molecular de este sistema con más detalle de lo que sería posible con seres humanos. También es posible evaluar compuestos o enfermedades en animales "knockout", por ejemplo, para identificar un compuesto que pueda compensar un defecto en la actividad de CD99/HEC2. Las dos tecnologías permiten la manipulación de unidades individuales de información genética en su posición natural en un genoma celular y examinar los resultados de esa manipulación en el efecto de fondo de un organismo diferenciado terminalmente.

Aunque la mayoría de las veces se emplean ratas y ratones, así como conejos, como animales transgénicos, particularmente para estudios de laboratorio de la función de proteínas y regulación de genes *in vivo*, puede emplearse cualquier animal en la práctica de la invención.

Un mamífero "knock-in" es un mamífero en el que un gen endógeno se ha sustituido por un gen heterólogo (Roemer y col., *New Biol.* 1991, 3:331). Preferentemente, el gen heterólogo se introduce ("knocked-in") en un locus de interés, el sujeto de evaluación (en cuyo caso el gen puede ser un gen indicador; véase Elefanty y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:11897) de la expresión o función de un gen homólogo, asociándose de esta manera la expresión del gen heterólogo a la transcripción a partir del promotor apropiado. Esto puede conseguirse por recombinación homóloga, transposones (Westphal y Leder, *Curr. Biol.* 1997, 7:530, 1997), usando sitios de recombinación mutantes (Araki y col., *Nucleic Acids Res.* 1997, 25:868) o PCR (Zhang y Henderson, *Biotechniques* 1998, 25: 784). Véase también, Coffman, *Semin. Nephrol.* 1997, 17:404; Esther y col., *Lab. Invest.* 1996, 74:953; Murakami y col., *Blood Press. Suppl.* 1996, 2:36.

Un "mamífero knockout" es un mamífero (por ejemplo un ratón) que contiene dentro de su genoma un gen específico que se ha inactivado por el procedimiento de dirección génica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.777.195 y N° 5.616.491). Un mamífero knockout incluye tanto un knockout heterocigoto (es decir, un alelo defectuoso y un alelo de tipo silvestre) como un mutante homocigoto. La preparación de un mamífero knockout requiere introducir primero una construcción de ácido nucleico que se usará para suprimir la expresión de un gen particular en un tipo celular indiferenciado denominado célula madre embrionaria. Esta célula después se inyecta en un embrión de mamífero. El embrión de mamífero con la célula integrada después se implanta en una madre de acogida durante toda la gestación. Zhou, y col. (*Genes and Development* 1995, 9:2623-34) describe ratones knockout para PPCA.

El término "knockout" se refiere a la supresión parcial o completa de la expresión de al menos una parte de una proteína codificada por una secuencia de ADN endógeno en una célula. La expresión "construcción knockout" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está diseñada para reducir o suprimir la expresión de una proteína codificada por secuencias de ADN endógenas en una célula. La secuencia de ácido nucleico usada como construcción knockout normalmente está compuesta por (1) ADN de alguna parte del gen (secuencia de exón, secuencia de intrón y/o secuencia promotora) a suprimir y (2) una secuencia marcadora usada para detectar la presencia de la construcción knockout en la célula. La construcción knockout se inserta en una célula y se integra con el ADN genómico de la célula en tal posición que previene o interrumpe la transcripción de la secuencia de ADN nativa. Dicha inserción normalmente se produce por recombinación homóloga (es decir, regiones de la construcción knockout que son homólogas a secuencias de ADN endógenas hibridan entre sí cuando la construcción knockout se inserta en la célula y se recombinan de forma que la construcción knockout se incorpora en la posición correspondiente del ADN endógeno). La secuencia de ácido nucleico de la construcción knockout puede comprender 1) una secuencia completa o parcial de uno o más exones y/o intrones del gen a suprimir, 2) una secuencia promotora completa o parcial del gen a suprimir, o 3) combinaciones de los mismos. Normalmente, la construcción knockout se inserta en una célula madre embrionaria (célula ME) y se integra en el ADN genómico de la célula ME, normalmente por el procedimiento de recombinación homóloga. Esta célula ME después se inyecta y se integra con el embrión en desarrollo. Sin embargo, la divulgación no requiere ningún procedimiento particular para preparar un animal transgénico.

En general, para la recombinación homóloga, el ADN tendrá una longitud de al menos aproximadamente 1 kilobase (kb) y preferentemente 3-4 kb, proporcionando de esta manera suficiente secuencia complementaria para la recombinación cuando se introduce la construcción. Las construcciones transgénicas pueden introducirse en el ADN genómico de las células ME, en el pronúcleo masculino de un ovocito fertilizado por microinyección, o por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.736.866 y 4.870.009, y por Hogan y col., *Transgenic Animals: A Laboratory Manual*, 1986, Cold Spring Harbor.

Puede usarse un animal de acogida transgénico para criar otros animales transgénicos; como alternativa, un animal de acogida transgénico puede clonarse para producir otros animales transgénicos.

5 Pueden prepararse animales knockout regulados usando diversos sistemas, tales como el sistema represor de tet (véase la Patente de Estados Unidos N° 3.654.168) o el sistema Cre-Lox (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.959.317 y N° 5.801.030).

Exploración de alto rendimiento

10 Los agentes de acuerdo con la invención pueden identificarse por exploración en ensayos de alto rendimiento, incluyendo sin limitación ensayos basados en células o ensayos sin células. Los expertos en la materia apreciarán que pueden usarse diferentes tipos de ensayo para detectar diferentes tipos de agentes. Se han creado varios procedimientos de ensayos automáticos en los últimos años para permitir la exploración de decenas de miles de compuestos en un corto periodo de tiempo. Dichos procedimientos de exploración de alto rendimiento son particularmente preferidos. El uso de ensayos de exploración de alto rendimiento para ensayar agentes se facilita en gran medida por la disponibilidad de grandes cantidades de polipéptidos purificados, como se proporciona por la invención.

Ejemplos

La presente invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos de la invención y no limitantes de la misma.

Ejemplo 1: CD99/HEC2: Una nueva molécula implicada en la migración transendotelial

20 Usando la misma estrategia que usaron los presentes inventores para inducir mAc contra PECAM-1 (48) y VE-cadherina (29) (Ejemplo 2), se ha inducido un mAc murino [hec2] contra otra proteína de la unión de las células endoteliales humanas. El antígeno, denominado temporalmente HEC2, se expresa en las uniones de monocapas de células endoteliales de vena umbilical humana [HUVEC] confluentes. En particular, HEC2 se concentra en los bordes intercelulares de las células endoteliales. Se fijaron monocapas de HUVEC confluentes replicadas, se permeabilizaron y se tiñeron con mAc de ratón contra PECAM, VE-cadherina/cadherina 5 [VE-CAD5], HEC2 o ICAM-1. La unión se visualizó usando un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Cy3. La tinción de HEC2 se concentra en los bordes laterales de las células endoteliales, de forma similar a las moléculas de unión conocidas, PECAM y VE-cadherina. Por otra parte, el mAc contra el antígeno de la superficie apical ICAM-1 produce una tinción difusa en la superficie, demostrando que la concentración de tinte en los bordes no es un artefacto del procedimiento de tinción de los presentes inventores.

30 HEC2 se expresa *in situ* en el endotelio arterial y venoso de cordón umbilical. En la piel se expresa en el endotelio de las arteriolas, capilares y vénulas, así como en los macrófagos estrellados de la dermis. El antígeno no se expresa en las células del músculo liso vascular, fibroblastos, queratinocitos y epitelio de conductos eccrinos.

35 El análisis citométrico de flujo de sangre periférica detectó HEC2 en PMN, monocitos y linfocitos. También se expresa por la línea de células endoteliales ECV-304, plaquetas y megacariocitos. Se incubaron leucocitos purificados y células ECV-304 resuspendidas de forma no enzimática con mAc contra los antígenos indicados, se lavaron, se incubaron con IgG de conejo anti-ratón conjugada con FITC y se sometieron a un análisis de citometría de flujo. Las células mononucleares de sangre periférica [PBMC] contienen tanto linfocitos como monocitos, que no se seleccionaron por separado. En todos los casos se observa un patrón de tinción unimodal.

40 Tanto la precipitación inmune como la transferencia de Western revelan una molécula con un peso molecular aparente de 30 kD en condiciones reductoras y no reductoras. Como tal, no parece ser ninguna molécula de las uniones conocida. El supuesto equivalente humano de JAM migra como dos formas moleculares distintas de 38 y 48 kD en el mismo gel (36). La ocludina tiene un Mr de 60 kD y los miembros de la familia de la claudina tienen pesos moleculares de aproximadamente 22-23 kD. Para obtener datos del peso molecular de HEC2, se separaron lisados de células endoteliales por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se sometieron a análisis de inmunotransferencia por duplicado con mAc contra HEC2 o contra PECAM. Los patrones de pesos moleculares se procesaron en la calle 3, indicando el Mr en kilodaltons. El mAc hec2 reconoce una molécula de 30 kD.

45 Se marcaron metabólicamente células endoteliales en reposo con 35S-metionina y cisteína durante una noche. El lisado celular se dividió y sometió a precipitación inmune usando mAc contra PECAM, MHC de clase II [control negativo], HEC2, y molécula de adhesión de las uniones humanas [JAM]. Los precipitados se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras y se analizaron por autorradiografía. Se identifica una molécula que corre a 30 kD por el mAc hec2.

50 Cuando se añade mAc hec2 a una monocapa subconfluente de HUVES, retrasa la formación de una monocapa confluente. Sin embargo, no tiene ningún efecto sobre la integridad de la monocapa cuando se añade al medio de cultivo después de que las células hayan llegado a la confluencia. A este respecto, es similar a hec7 y otros mAc
55 contra PECAM (49, 50).

En múltiples experimentos, el mAc hec2 bloqueó la MTE de monocitos en más de un 90 % (Figura 3). También se redujo la transmigración de PMN, pero en menor medida. Este bloqueo se produjo en ausencia de reactivos anti-PECAM, indicando que PECAM no tenía que inhibirse para ver el efecto de CD99 sobre la MTE. Esto sugiere que PECAM y CD99 funcionan en distintas etapas de la MTE. Cuando se combinaron tanto hec2 como anticuerpo anti-PECAM, esencialmente se anuló la transmigración de monocitos (véase la Figura 3D). El mAc hec2 también bloqueaba la adhesión de Mo a CE (Figuras 2A y 3B). Sin embargo, el bloqueo en MTE era un fenómeno distinto, separado y cuantitativamente mayor.

Como se muestra en la Figura 3, CD99/HEC2 y CD11/CD18 desempeñan papeles nuevos en la migración transendotelial de monocitos. Se incubaron monocitos con monocapas de HUVEC en reposo y se realizaron ensayos de MTE por los procedimientos convencionales de los presentes inventores. En estos ensayos, estaba presente mAc [10 mg/ml] durante el tiempo de co-cultivo de forma que los dos tipos de células se expusieran a él. Después, las monocapas se lavaron exhaustivamente antes de contar las células totales [adhesión, células/campo de alta potencia] y el porcentaje de células restantes que transmigraron [% de transmigración]. El mAc contra CD18 bloquea la adhesión significativamente, como lo hace el mAc contra ICAM-1 y HEC2 (Figura 3A). Obsérvese que el mAc contra PECAM no tiene ningún efecto sobre la adhesión de Mo. Cuando cada uno de los anticuerpos indicados se combinó con el mAc anti-PECAM a 10 mg/ml, el anti-CD18 no bloqueaba la adhesión mejor (Figura 3B). La combinación de mAc contra ICAM-1 y mAc contra ICAM-2 [ICAM 1+2] bloquea la adhesión casi tan bien como anti-CD18.

El porcentaje de las células que quedaban con la monocapa que transmigraba lo redujo significativamente el mAc contra PECAM y HEC2, pero no otro mAc (Figura 3C). Cuando el mAc se combinó con el mAc anti-PECAM, la combinación de anti-PECAM y anti-HEC2 bloqueaba la MTE casi completamente (Figura 3D). Los números mostrados son medias \pm E. T. M. de 5 a 27 réplicas de 2 a 7 experimentos con cada mAc. Un bloqueo se consideró significativo si $p < 0,05$, pero en la mayoría de los casos fue $< 0,01$.

Ejemplo 2: Generación del anticuerpo monoclonal hec2

Se preparó anticuerpo monoclonal hec2 de acuerdo con los siguientes procedimientos.

Aislamiento de células de endotelio de vena umbilical humana (HEC). Se recogieron cordones umbilicales de partos sin complicaciones de mujeres sanas antes de que hubieran transcurrido dos días desde el nacimiento en PBS que contenía glucosa estéril. Las HEC se aislaron por técnicas convencionales (Muller y col., J. Exp. Med., 1989; 170:399) a partir de venas umbilicales canuladas usando colagenasa a 75 U/ml. Se cultivaron células recogidas de cada cordón como cultivos primarios separados en matraces de cultivo de tejidos de 25 cm² revestidos con fibronectina de plasma humano a $>1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los cultivos se lavaron para eliminar las células no adherentes 4 horas después del cultivo inicial y se devolvieron al cultivo en medio completo. Los cultivos aislados a partir de los cordones >20 cm de longitud generalmente alcanzaron la confluencia en 3-5 días.

Cultivo de HEC. El medio de cultivo consistía en suero humano normal al 20 % en medio 199. No se añadieron factores de crecimiento exógenos. El medio se suplementó con penicilina y estreptomina (100 U/ml y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente). El medio se reemplazó cada 3 días. Los cultivos se sometieron a pases en la confluencia por recolección en tripsina/EDTA. Se reunieron aislados primarios sanos para los pases, y se dividieron generalmente a relaciones de 1:2 a 1:4. Los subcultivos se desarrollaron en plástico de cultivo de tejidos revestido con fibronectina humana (EC-fn) o sobre geles de colágeno deshidratados polimerizados (EC-col) revestidos con fibronectina.

Geles de colágeno. Se mezcló Vitrogen (Collagen Corp.) con medio 199 10x y NaOH 0,1 N y el pH se ajustó hasta la neutralidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los recipientes de cultivo de tejidos se revistieron con volúmenes apropiados de la solución estéril enfriada (1,0 ml para una placa de 35 mm, 8,0 ml para una placa de 100 mm). El colágeno se dejó gelificar en el incubador de cultivo de tejidos durante hasta 1 hora; después se añadió M199 estéril a las placas.

Tinción con nitrato de plata. La tinción con nitrato de plata de monocapas de CE fijadas con formaldehído o vivas se realizó como se describe (Muller y col., J. Exp. Med., 1989; 170:399).

Producción de mAc. Se cultivaron HEC hasta la confluencia en geles de colágeno hidratados. Un cultivo de ensayo demostró una fuerte tinción con AgNO_3 de uniones intercelulares. Las HEC se resuspendieron de forma no enzimática agitando suavemente los matraces de cultivo en EDTA 10 mM en HBSS. Las células recuperadas se lavaron y resuspendieron en PBS de Dulbecco (DPBS). Se inmunizaron ratones CD2F₁ hembra por inyección de 6×10^5 HEC vivas en 0,25 ml de DPBS en la vena de la cola. Los ratones posteriormente se reforzaron por una inyección intravenosa de 4×10^5 células preparadas de forma similar 1 y 4 meses después. 4 días después del último refuerzo, se retiró el bazo de un ratón. Una suspensión estéril de células de bazo se fusionó con células de mieloma NS-1 a una relación de 10:1 usando polietilenglicol por procedimientos convencionales (Muller y col., J. Exp. Med., 1989; 170:399). Se cultivaron 3×10^4 células en cada pocillo de una bandeja de 96 pocillos y se dejaron crecer en medio HAT con FCS al 20 %.

Los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma en crecimiento se exploraron por inmunoperoxidasa

simultáneamente en monocapas de EC-col y EC-fn confluentes derivadas del mismo cultivo de patente y por lo demás tratadas de forma idéntica. Los sobrenadantes que tiñeron EC-col intensamente en la región de las uniones intercelulares, pero tiñeron EC-fn con un patrón de superficie difuso, se seleccionaron para la clonación. Los hibridomas se clonaron en capas de alimentación de timocitos CD2F₁ y se volvieron a explorar como se ha indicado anteriormente.

El clon hec2 se adaptó al crecimiento en suero bovino suplementado con hierro al 10 % (HyClone Laboratories, Logan, UT) en medio RPMI.

La isotipificación se realizó en sobrenadantes de cultivo por ELISA usando un kit de sub-isotipificación monoclonal de ratón (HyClone Laboratories). El mAc indicado aquí es una IgG1.

10 **Ejemplo 3: HEC2 es CD99**

Se repitieron ensayos de MTE usando IgG hec2 purificada y se obtuvo el mismo bloqueo. Hec2 generalmente no es tóxico o inhibidor de la migración de leucocitos, ya que no tiene ningún efecto sobre la transmigración inversa (basal-apical) de células dendríticas derivadas de monocitos en estos cultivos si se administra a las células cultivadas después de MTE.

15 En primer lugar, los presentes inventores demostraron que HEC2 es CD99 por la capacidad de hec2 de eliminar todo el antígeno inmunorreactivo en un lisado de células endoteliales que se reconocería por un mAc de CD99 disponible en el mercado (clon 013, Signet Labs, Dedham, MA) y viceversa. A continuación, se transfectaron células COS por un clon de CD99 (Hahn y col., 1997, J. Immunol., 1:159(5):2250-8). Las células transfectadas, pero no las células de control, se reconocieron por hec2 así como por el mAc de CD99 disponible en el mercado según se determinó por citometría de flujo e inmunofluorescencia.

20 Específicamente, se transfectaron de forma transitoria células Cos por electroporación con un clon de ADNc de CD99 en pcDNA3 (Hahn y col., J. Immunol., 1997, 159:2550). El día tres, las células transfectadas o las células Cos de control se retiraron de forma no enzimática de las placas con EDTA, se lavaron y se incubaron con mAc de CD99 comercial (clon 013, Signet Labs, Dedham, MA) o hec2, se lavaron y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón marcada con FITC antes del análisis por FACS®. Las células Cos de control no se unen al mAc de CD99 comercial o a hec2, respectivamente. El dieciséis por ciento de las células Cos transfectadas tienen una tinción positiva con el CD99 comercial, mientras que aproximadamente el 25 % de las células transfectadas tienen una tinción positiva con hec2, llevando una fluorescencia de superficie incluso superior. Las células transfectadas no mostraron ninguna tinción por encima del efecto de fondo cuando se sondaron con suero de ratón normal y el anticuerpo secundario.

25 También se tiñeron células Cos transfectadas en cubreobjetos con hec2 seguido de IgG de cabra anti-ratón conjugada con FITC y se examinaron por microscopía de inmunofluorescencia. Las células transfectadas muestran un patrón de tinción de la membrana plasmática brillante que destaca en contraste a las células vecinas no transfectadas.

30 Se han transfectado células L con este clon. Los transfectantes estables se han seleccionado para los experimentos. Se ha explorado una biblioteca de expresión de leucocitos humanos con respecto a la existencia de otros clones de ADNc (sometidos a corte y empalme alternativo). Hay un informe de una de estas formas, pero no se ha confirmado por otros investigadores. Este clon se usa para explorar una biblioteca de ADNc de fago λ de timocitos murinos para el equivalente murino de esta molécula, que aún no se ha descrito.

40 **Ejemplo 4: desarrollo de ratones transgénicos deficientes en PECAM y ratones knockout para PECAM**

Se usó el clon de PECAM murino (53) para obtener ratones con una delección dirigida del gen de PECAM (26). Los ratones homocigotos para la delección CD31 son viables y nacen con la frecuencia mendeliana esperada. No presentan defectos vasculares evidentes y permanecen sanos y fértiles con una duración de vida normal. Los recuentos de plaquetas y leucocitos totales circulantes son similares a sus compañeros de camada de tipo silvestre. Los ratones knockout para PECAM tienen aproximadamente la mitad del número de PMN circulantes que sus compañeros de camada de tipo silvestre, pero pueden responder a un estímulo inflamatorio con una neutrofilia intensa.

En varios modelos de inflamación aguda, no hubo diferencias significativas entre los knockout y los compañeros de camada de tipo silvestre en los números o tipos de leucocitos movilizados a los sitios. El único defecto observado en la respuesta inflamatoria indicada hasta la fecha es uno sutil: los neutrófilos que se dirigen a un sitio de inflamación quedan atrapados temporalmente entre la superficie inferior del endotelio de la vénula y la lámina basal subendotelial (26). Esto recuerda al fenotipo conseguido con el bloqueo selectivo del dominio 6 PECAM de leucocito (4, 7); sin embargo, en los knockout el retraso es transitorio, ya que en 4 horas han entrado en el sitio de inflamación el número normal de leucocitos (26). Esto implica que el retraso en la migración a través de la lámina basal se compensa por alguna otra etapa de la migración.

55 Como estos ratones carecen de PECAM-1 pero movilizan números normales de leucocitos a vísceras inflamadas a la misma velocidad que los ratones de tipo silvestre, tienen que haber ampliado el uso de rutas de migración independientes de PECAM para compensar su ausencia de PECAM. Estos ratones serán modelos excelentes en los

que estudiar la MTE de CD99/HEC2, ya que el papel de CD99 en la MTE puede estudiarse en ausencia de una fuerte influencia de PECAM-1.

Ratones que expresan PECAM-Ig

5 Se generaron tres líneas fundadoras usando la construcción transgénica que contenía el promotor de ApoA1. Los ratones de las tres líneas eran del mismo tamaño y peso que sus compañeros de camada de tipo silvestre. Estaban sanos y eran fértiles y tenían relaciones normales de descendencia masculina y femenina. Los ratones se mantuvieron en un entorno limpio [pero sin SPF] y no fueron susceptibles a infecciones nosocomiales [datos no mostrados]. La PCR cuantitativa demostró que el transgén se expresaba en el hígado y pulmón, con menores niveles en el riñón. La cepa Tg11 mostró expresión en el tejido esplénico, que no se detectó en los ratones Tg8 de menor secreción. Los ratones no mostraron tendencias espontáneas a hemorragias y sus perfiles hematológicos fueron similares a los de sus compañeros de camada de tipo silvestre.

15 Los ratones secretaban PECAM-IgG murina intacta a la circulación. Los ratones homocigotos de la línea Tg8₂₀ tenían niveles plasmáticos de aproximadamente 20 µg/ml. Los ratones de las líneas Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀ generalmente expresaban entre 500 y 2.000 µg/ml. Los mayores niveles de PECAM-IgG circulantes en Tg11 se correlacionaban con un aumento de los niveles de mensajero para el transgén, especialmente en el hígado y pulmón, pero no con la intensidad de la señal de hibridación en la transferencia de Southern. La inmunotransferencia del suero transgénico demostró que la PECAM-IgG se desplazaba como una sola banda de 230 kD, el tamaño esperado de la forma dimerizada intacta. Estos ratones se describen con más detalle en Liao, y col., 1999, J. Immunol., 163(10):5640-8.

20 **La expresión de PECAM endógeno en los leucocitos murinos no cambió por la expresión del transgén.** De forma similar, los leucocitos expresaban niveles de tipo silvestre de CD11a, CD11b y CD18. Incluso en ratones que expresaban altos niveles de PECAM-IgG, la proteína transgénica no se unía de forma estable a los leucocitos, como se ha descubierto previamente para leucocitos humanos y PECAM-IgG humana *in vitro*, supuestamente reflejando el bajo número de moléculas de PECAM en estas células (6). Esto también demuestra que la proteína transgénica no estaba circulando unida a través de receptores de Fc de leucocitos. Los experimentos de control demostraron que la IgG humana podría detectarse fácilmente si efectivamente se uniera por los FcR de leucocitos murinos. Cuando se incubó IgG humana agregada con calor con sangre de ratón, se unió a los leucocitos y se mantuvo unida durante la preparación para el análisis FACS. Debido a la presencia de PECAM-IgG en el plasma, los tejidos no pudieron sondarse de forma precisa por inmunoperoxidasa para determinar si la expresión de PECAM endógena se alteraba en células endoteliales de los ratones transgénicos. Sin embargo, la PCR cuantitativa de pulmón, bazo, riñón e hígado no mostró ninguna diferencia significativa en los niveles de mensajero de PECAM endógeno [por microgramo de ARN total] entre los ratones de tipo silvestre, Tg8₂₀ o Tg11₁₀₀₀. No se detectó ninguna diferencia en el patrón de tinción o intensidad de tinción entre la línea de tipo silvestre y ninguna línea transgénica cuando se sondaron usando anticuerpos contra ICAM-1, ICAM-2 o VCAM-1. Específicamente en el riñón, ICAM-2 se expresaban por las células endoteliales de todos los vasos, incluyendo capilares glomerulares. La tinción de ICAM-1 en riñones era débil; la tinción de VCAM-1 estaba presente de forma focal y débil en el endotelio de alguno de los microvasos de mayor tamaño, pero estaba ausente en los capilares peritubulares y glomerulares. De esta manera, con la excepción de la presencia de PECAM-IgG circulante, los ratones transgénicos no parecían diferentes de sus compañeros de camada de tipo silvestre en condiciones basales.

40 **La migración de leucocitos se suprime en ratones Tg8₂₀.** Los ratones FVB/n de tipo silvestre y todas las cepas de ratones transgénicos tenían números similares de células mononucleares y prácticamente ningún PMN residente en sus cavidades peritoneales cuando no se estimulaban. Cuando los ratones FVB/n de tipo silvestre se expusieron a una inyección intraperitoneal de caldo de tioglicolato y se sacrificaron 18 horas después, se observó un exudado inflamatorio espectacular que incluía grandes números de neutrófilos así como monocitos. Por el contrario, los compañeros de camada Tg8₂₀ de edad similar mostraron un notable debilitamiento de la respuesta inflamatoria. Los ratones Tg8 heterocigotos que tenían niveles de mPECAM-IgG circulantes de 10 µg/ml mostraron una reducción del 50 % en los números de PMN; los monocitos se redujeron casi hasta los niveles basales. En ratones Tg8₂₀ homocigotos que producían 20 µg/ml, la infiltración de PMN se bloqueó en más de un 80 %. El nivel de mPECAM-IgG en plasma fue similar a los niveles que se consiguieron en experimentos en los que se descubrió que la mPECAM-IgG administrada exógenamente bloqueaba la migración de PMN a las cavidades peritoneales de ratones de tipo silvestre en un 80 % (6). Los recuentos de leucocitos circulantes en ratones Tg8₂₀ que recibieron caldo de tioglicolato se elevaron a las 18 horas, como se había visto previamente con ratones de tipo silvestre que recibían reactivos anti-PECAM frente a una exposición a tioglicolato (2, 6), lo cual es coherente con la idea de que los leucocitos podían movilizarse normalmente, pero no podían entrar en el sitio de inflamación.

55 El bloqueo de la inflamación fue al nivel de la migración transendotelial, como se ha descubierto previamente (2, 6). Las secciones histológicas de tejidos en los ratones Tg8 mostraron PMN y Mo concentrados intravascularmente en vénulas postcapilares, muchos aparentemente unidos a la superficie endotelial, pero incapaces de transmigrar como ocurre con el mAc anti-PECAM murino (2) o mPECAM-IgG administrada exógenamente (6).

60 Se obtuvo un resultado sorprendente cuando se evaluaron las líneas de alta producción de ratones transgénicos. Los ratones Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀ que secretan constitutivamente niveles supratrapéuticos de mPECAM-IgG son paradójicamente resistentes a sus efectos. La respuesta al tioglicolato intraperitoneal fue prácticamente igual que

para los ratones de tipo silvestre a las 3, 6 y 18 horas. Se bloqueó la peritonitis en respuesta al caldo de tioglicolato, como era de esperar, en estas cepas por anticuerpos contra CD11a y CD11b. Esto indica que estos ratones estaban usando integrinas $\beta 2$ de leucocitos para adherirse a la pared vascular y/o para la transmigración.

5 **Los ratones Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀ producen mPECAM-IgG funcional.** La incapacidad de la proteína transgénica de bloquear la migración de leucocitos en los ratones de alta producción no se debía a defectos en la propia proteína transgénica: el suero o la proteína transgénica purificada de estos ratones transferida a ratones de tipo silvestre bloqueaba la inflamación bien, y de una forma dependiente de la dosis.

10 Muchos quimioatrayentes, quimiocinas y anticuerpos cuyas acciones se basan en el entrecruzamiento de sus ligandos presentan una curva de dosis-respuesta con forma de campana. Si el efecto bloqueante de PECAM-IgG presentaba dichas propiedades, era posible que los altos niveles de mPECAM-IgG en el plasma de ratones Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀ estuvieran más allá del punto inhibidor óptimo y, de hecho, ya no fueran eficaces. Como alternativa, si PECAM-IgG se uniera consigo misma a altas concentraciones produciendo agregados en los que los sitios de unión de PECAM ya estaban ocupados, podría esperarse una reducción en la eficacia según la concentración se elevara por encima de un cierto umbral. Para investigar esto en un sistema que los presentes inventores pudieran manipular mejor, se realizaron experimentos *in vitro* usando leucocitos y endotelio humano y PECAM-IgG humana. Para ver si había una respuesta a la dosis bifásica a PECAM-IgG *in vitro*, los presentes inventores realizaron un ensayo de transmigración exponiendo monocitos a concentraciones de 1 mg/ml a 1 mg/ml de PECAM-IgG. Los resultados demuestran que el bloqueo constante por PECAM-IgG se mantiene desde 10 $\mu\text{g/ml}$ [50 nM] hasta la dosis máxima. Por lo tanto, es poco probable que la incapacidad de leucocitos de Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀ de bloquearse por las altas concentraciones de mPECAM-IgG circulante en su plasma se deba a una menor respuesta a estas concentraciones.

15 Los ratones Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀ representan un sistema excepcional en el que estudiar rutas de transmigración alternativas a PECAM. Estos ratones no usan PECAM, aunque sus leucocitos y células endoteliales llevan niveles normales de dicha proteína. Como ninguno de sus leucocitos se bloquea por mPECAM-IgG, pueden usar diferentes rutas alternativas que la usadas por el 10-20 % de leucocitos de tipo silvestre que no se bloquean por mPECAM-IgG exógena (6) o el 10-20 % de leucocitos en los ratones Tg8₂₀ que transmigran frente a niveles inhibidores constantes de mPECAM-IgG, o el 100 % de leucocitos de ratones "knockout" para PECAM que nunca han visto PECAM. CD99 puede ser crucial para una etapa de la MTE separada de PECAM. Como alternativa, CD99 puede jugar un papel en la MTE residual que es independiente de PECAM. En cualquier caso, sería instructivo determinar su papel en estos ratones en los que puede estudiarse independientemente de la función de PECAM.

30 **Ejemplo 5: estudios en ratones transgénicos de CD99/HEC2**

El papel de HEC2 en la MTE se ensaya en dos modelos separados de inflamación aguda en los que se puede distinguir un bloqueo en la adhesión de leucocitos al endotelio de un bloqueo en la MTE. Los ensayos son el ensayo de peritonitis con caldo de tioglicolato y el ensayo de inflamación de oído con aceite de croton. En cada ensayo, el efecto del bloqueo de la molécula se evalúa cuantitativamente para determinar la selectividad del papel sobre la diapédesis. El papel de estas moléculas en ratones de tipo silvestre se examina para ver qué efecto tiene sobre la inflamación su bloqueo únicamente. Su papel en ratones Tg8₂₀, en los que la función de PECAM está bloqueada de forma máxima, se evalúa para ver si complementan el bloqueo de PECAM, o requieren el bloqueo de PECAM para funcionar. Su papel en ratones Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀ se evalúa para ver cómo funcionan en condiciones en las que no actúa PECAM, y en ratones knockout para PECAM para ver cómo funcionan en ausencia de PECAM. Estas dos últimas condiciones pueden producir papeles para moléculas de adhesión que podrían no ser evidentes en ratones de tipo silvestre en los que PECAM tiene un papel predominante en la MTE en estos dos modelos animales.

El modelo de peritonitis inducida por caldo de tioglicolato.

45 Este modelo fue satisfactorio para evaluar el papel de PECAM en MTE (2, 6) y otras moléculas de adhesión (72, 74) en la inflamación aguda. Se inyectan reactivos [que bloquean mAc o quimeras CAM-IgG] sistémicamente y se ensayan con respecto a su capacidad de bloquear la entrada de leucocitos en la cavidad peritoneal. Se recoge el mesenterio y se examina microscópicamente para determinar si el bloqueo estaba al nivel de la adhesión o de la MTE. En varios estudios previos, esto ha demostrado sorprendentemente una detención de los leucocitos en el endotelio de vénulas mesentéricas cuando se bloqueaba la MTE por mAc contra PECAM (2) o mPE-CAM-IgG (6), pero no cuando la adhesión se bloqueaba por mAc contra CD11b. El mAc de ensayo o la IgG de control de isotipo se inyectan por vía intravenosa en la vena de la cola. Una hora después, se inyecta 1 ml de caldo de tioglicolato al 4 % i.p. a través de una aguja 26G de 10 mm. Los presentes inventores normalmente examinan la respuesta al tioglicolato a las 18 horas para ver el efecto de las perturbaciones experimentales tanto sobre los PMN como sobre los monocitos. Los cursos de tiempo se ajustan a tiempos más cortos [4 - 12 horas] para obtener el efecto sobre PMN más pronunciados y a tiempos posteriores [hasta 4 días] cuando el efecto sobre Mo es más pronunciado. En el momento del ensayo, los ratones se sacrifican. Se aíslan células peritoneales por lavado en solución salina equilibrada de Hanks. El número de células peritoneales total se cuantifica y se realizan recuentos diferenciales en citocentrifugaciones teñidas con Wright-Giemsa. Se recoge sangre periférica para el recuento total de GR y el frotis diferencial. Es importante estar seguro de que una reducción en los leucocitos que entran en la cavidad peritoneal no se debe a una reducción del número en la circulación. También se recogen órganos seleccionados en este momento, incluyendo el mesenterio, que se fija en formalina para el examen histológico.

El ensayo de dermatitis con aceite de croton

Éste es un ensayo de inflamación no específica en el que se aplican 10 ml de aceite de croton [al 2 % en una mezcla 4:1 de acetona:aceite de oliva] en un oído de un ratón (72). El oído contralateral recibe 10 ml de vehículo y sirve como control interno para la inflamación de fondo. El aceite de croton produce una respuesta inflamatoria aguda en la que el oído afectado se vuelve rojo e inflamado. Histológicamente, hay desgranulación de mastocitos y reclutamiento de leucocitos desde las vénulas locales a los tejidos blandos de la dermis del oído. En las manos de los presentes inventores se produce una migración máxima de leucocitos [predominantemente PMN] 8 horas después de la aplicación del irritante. Los reactivos a ensayar con respecto a su capacidad de bloquear la MTE se inyectan por vía intraperitoneal una hora antes de la aplicación del aceite de croton.

Los ratones se sacrifican, se extraen los dos oídos y se examinan varias secciones transversales para cuantificar la salida de leucocitos. Esto puede hacerse manualmente o usando un software de análisis de imágenes para cuantificar PMN/mm². Como alternativa, puede aplicarse mAc anti-PMN con un marcador fluorescente, y la fluorescencia total puede cuantificarse usando un phosphorimager. El examen histológico cuidadoso de los oídos también dirá si el bloqueo está a nivel de la MTE o de la adhesión. El bloqueo de la MTE da como resultado una acumulación de PMN en las paredes venulares [Fig. 12]. Éste también es un buen sistema en el que ensayar la posibilidad de que los ratones knockout para PECAM o resistentes a PECAM [transgénicos de alta dosis] migren con una ruta vascular diferente [por ejemplo, capilares en lugar de vénulas], ya que los leucocitos tienden a permanecer relativamente próximos a los vasos de los que emigraron en este modelo.

El papel de HEC2 en MTE

Se ensayan mAc contra la forma murina de HEC2 con respecto a su capacidad de bloqueo en estos modelos. Es de esperar que el mAc inhiba la MTE *in vivo* de la manera en la que hec2 inhibe la MTE de células humanas *in vivo*. Se ensayan fragmentos Fab y F[ab']₂, sin endotoxina, estériles, purificados de mAc contra HEC2 murino.

Ratones de tipo silvestre. Como hec2 bloquea la MTE en ausencia del bloqueo de PECAM, es de esperar que la forma murina funcione de forma similar *in vivo*. La migración de leucocitos se inhibe notablemente por concentraciones óptimas de mAc contra HEC2 murino. Se examinan los oídos y vénulas mesentéricas de los ratones. Un bloqueo selectivo en la MTE daría como resultado un aumento en los leucocitos en la pared del vaso que refleja la menor migración de estas células. Sin embargo, si HEC2 está implicado en una etapa previa de la MTE que PECAM, es posible que el bloqueo de HEC2 *in vivo* no produzca el fenotipo de leucocitos detenidos sobre la pared del vaso. Si la interrupción de la interacción con HEC2 no los deja firmemente adherentes al endotelio por algún otro mecanismo, pueden desprenderse en el flujo del torrente sanguíneo, y no se vería el fenotipo producido *in vitro* en condiciones estáticas, a pesar de la espectacular reducción en los leucocitos que migran.

Ratones Tg8₂₀. La acción combinada de hec2 y anticuerpo anti-PECAM *in vitro* fue tan completa que soporta el ensayo *in vivo*. El bloqueo casi total de MTE es evidente en este caso, y es clínicamente importante saber si el bloqueo de dos moléculas cualesquiera en leucocitos o endotelio podría producir dicho bloqueo completo *in vivo*. Es de esperar que el bloqueo de HEC2 murino y PECAM murino produzca un bloqueo casi total en la migración de leucocitos. Esto se ensaya inyectando mAc contra HEC2 murino en el ratón Tg8₂₀, en el que PECAM está bloqueada de forma máxima. Los presentes inventores predicen que puede ser difícil, si no imposible, distinguir el sitio del bloqueo *in vivo*, ya que los ratones Tg8₂₀ ya muestran una gran cantidad de sus leucocitos detenidos en la pared del vaso. Sin embargo, la reducción cuantitativa en leucocitos en la cavidad peritoneal o la dermis del oído debería ser perceptible.

Ratones Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀. En estos ratones predominan las rutas de MTE independientes de PECAM, ya que estos ratones no parecen usar su propia PECAM. Los Ab monoclonales contra HEC2 murino pueden tener un efecto incluso mayor que en ratones de tipo silvestre. La misma advertencia sobre el bloqueo potencial de la adhesión más que la transmigración en condiciones de flujo sostiene aquí lo mismo que para los ratones de tipo silvestre.

Ratones deficientes en PECAM [knockout]. Los ratones knockout para PECAM deben usar rutas independientes de PECAM para la MTE. Movilizan los mismos números y tipos de leucocitos a sitios de inflamación que los ratones de tipo silvestre, de forma que tienen ampliado su uso de estas rutas para soportar niveles normales de MTE. En estas condiciones, es sencillo observar un efecto de bloqueo de una molécula de adhesión alternativa. Sería instructivo determinar si las moléculas que usan los ratones knockout para la MTE son las mismas que las usadas por ratones que tienen PECAM, pero no pueden usarla [por ejemplo Tg5₁₀₀₀ y Tg11₁₀₀₀].

Ejemplo 6: la migración transendotelial de linfocitos T está mediada por CD99/HEC2

Se preincubaron monocapas de HUVEC en geles de colágeno durante tres horas en presencia o ausencia de factor-1 derivado de estroma (SDF-1), y después se lavaron antes de la adición de linfocitos T parcialmente purificados. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica frescas a partir de voluntarios humanos por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque por procedimientos convencionales. Los linfocitos T se obtuvieron a partir de estas células dejando que los monocitos y algunos linfocitos B se adhirieran a placas de cultivo de tejidos de plástico durante treinta minutos. Se recogieron las células no adherentes y se resuspendieron a 2 x 10⁶ células/ml en medio de cultivo M199 que contenía un 2 % de suero humano, opcionalmente en presencia de los anticuerpos

monoclonales indicados a 20 microgramos/ml. La suspensión celular se añadió sobre las monocapas de HUVEC y se dejó que continuara la migración transendotelial durante cuatro horas a 37 °C. Los cocultivos después se lavaron y se fijaron en glutaraldehído, se tiñeron y se examinaron por óptica Normarsky (exactamente como para la MTE de monocitos y neutrófilos). El porcentaje de células que transmigraban (% de MTE) se calculó dividiendo el número de células por debajo de la monocapa de HUVEC por el número total (adherentes más transmigradas) de células en ese campo. Se examinaron al menos tres campos en tres o más monocapas para cada condición. Las barras muestran la media +/- la desviación típica para estas medidas. Hec7 = mAc contra PECAM-1 (CD31); IB4 = mAc contra la cadena beta de la integrina de leucocitos (CD18); 84H10 = mAc contra la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1).

También se ensayaron como control positivo células mononucleares de sangre periférica no fraccionadas a partir de las cuales se obtuvieron los linfocitos T. Esta población contiene la mayoría de los monocitos, de forma que el porcentaje de MTE es mucho mayor que con los linfocitos T aislados.

Ejemplo 7: CD99 se usa para la migración transendotelial de monocitos

El ensayo convencional para la migración transendotelial usa células mononucleares de sangre humana añadidas a monocapas de células endoteliales humanas cultivadas hasta la confluencia en geles de colágeno hidratados. Los presentes inventores han descubierto que CD99 se expresa en monocitos y se concentra en uniones de células endoteliales. El anticuerpo monoclonal anti-CD99 de los presentes inventores bloquea la trans migración de los monocitos en más de un 90 % en el ensayo. Los monocitos bloqueados por anti-CD99 se polarizan y se extienden a través de las uniones endoteliales, pero no pueden atravesar completamente la monocapa endotelial.

CD99 parece interactuar homofílicamente entre los monocitos y las células endoteliales. Los linfocitos L de ratones transfectados con CD99 también se agrupan de una forma homofílica en ensayos de adhesión. En particular, los presentes inventores han expresado el clon humano en fibroblastos de linfocitos L. La expresión de CD99 en estas células las transmite la capacidad de adherirse entre sí de una manera homofílica. Es decir, CD99 en una célula se une a CD99 en la célula yuxtapuesta. Estos estudios se realizaron en suspensión, de una manera similar a estudios publicados hace varios años usando células transfectadas con PECAM y VE-cadherina. El anticuerpo monoclonal anti-CD99 (mAc), hec2, bloqueaba la capacidad de los transfectantes de CD99 de adherirse entre sí, lo cual es coherente con su papel en el bloqueo de la migración transendotelial mediada por CD99 de los leucocitos.

Los datos experimentales muestran que CD99 está implicada en una etapa de la migración transendotelial que es distal (posterior en el tiempo o "aguas abajo" de) la etapa controlada por PECAM. Cuando la trans migración se bloquea por reactivos anti-PECAM, y entonces se elimina ese bloqueo, anti-CD99 puede bloquear la trans migración. Por otra parte, cuando la trans migración se bloquea en la etapa de CD99 por hec2, y entonces se elimina ese bloqueo, los reactivos anti-PECAM ya no pueden bloquear. De forma coherente con esto, los monocitos detenidos en la trans migración parecen tener parte de su citoplasma por debajo de la célula endotelial, mientras que el urópodo trepador permanece en la superficie apical.

REFERENCIAS

1. Muller, W. A., S. A. Weigl, X. Deng, and D. M. Phillips. 1993. PECAM-1 is required for transendotelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178: 449-460.
2. Bogen, S., J. Pak, M. Garifallou, X. Deng, and W. A. Muller. 1994. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 [CD31] blocks acute inflammation in vivo. *J. Exp. Med.* 179: 1059-1064.
3. Berman, M. E. and W. A. Muller. 1995. Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 154: 299-307.
4. Liao, F., H. K. Huynh, A. Eiroa, T. Greene, E. Polizzi, and W. A. Muller. 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J. Exp. Med.* 182: 1337-1343.
5. Berman, M. E., Y. Xie, and W. A. Muller. 1996. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendotelial migration and beta 2 integrin activation. *J. Immunol.* 156: 1515-1524.
6. Liao, F., J. Ali, T. Greene, and W. A. Muller. 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendotelial migration in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 185: 1349-1357.
- 7 Muller, W. A., T. Greene, and F. Liao. 1997. Transendotelial migration and interstitial migration of monocytes are mediated by separate domains of monocyte CD31. In *Leukocyte Typing VI. Proceedings of the Vth International Leukocyte Differentiation Antigen Workshop*, Kobe, Japón, 1996. T. Kishimoto, editor.

Garland Publishers, Londres. 370-372.

8. Vaporciyan, A. A., H. M. Delisser, H.-C. Yan, I. I. Mendiguren, S. R. Thom, M. L. Jones, P. A. Ward, and S. M. Albelda. 1993. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 262: 1580-1582.
- 5 9. Wakelin, M. W., M.-J. Sanz, A. Dewar, S. M. Albelda, S. W. Larkin, N. Boughton-Smith, T. J. Williams, and S. Nourshargh. 1996. An anti-platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through basement membrane. *J. Exp. Med.* 184:229-239.
- 10 10. Murohara, T., J. A. Delyani, S. M. Albelda, and A. M. Lefer. 1996. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J. Immunol.* 156: 3550-3557.
11. Christofidou-Solomidou. M., M. T. Nakada, J. Williams, W. A. Muller, and H. M. Delisser. 1997. Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J. Immunol.* 158: 4872-4878.
- 15 12. Gumina, R. J., J. E. Schultz, Z. Yao, D. Kenny, D. C. Wartier, P. J. Newman, and G. J. Gross. 1996. Antibody to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 94: 3327-3333.
13. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
- 20 14. Lasky, L. A. 1992. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964-969.
15. Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314.
- 25 16. Lo, S. K., S. Lee, R. A. Ramos, R. Lobb, M. Rosa, G. Chi-Rosso, and S. D. Wright. 1991. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CD3 [GD11B/CD18, Mac-1, alpha m beta 2] on human neutrophils. *J. Exp. Med.* 173: 1493-1500.
17. Lorant, D. E., K. D. Patel, T. M. McIntyre, R. P. McEver, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman. 1991. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: A juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* 115: 223-234.
- 30 18. Hermanowski-Vosatka, A., J. A. G. Van Strijp, W. J. Swiggard, and S. D. Wright. 1992. Integrin modulating factor-1: A lipid that alters the function of leukocyte integrins. *Cell* 68: 341-352.
19. Tanaka, Y., D. H. Adams, S. Hubscher, H. Hirano, U. Siebenlist, and S. Shaw. 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361: 79-82.
20. Huber, A. R., S. L. Kunkel, R. F. Todd, III, and S. J. Weiss. 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254: 99-102.
- 35 21. Tanaka, Y., S. M. Albelda, K. J. Horgan, G. A. Van Seventer, Y. Shimizu, W. Newman, J. Hallam, P. J. Newman, C. A. Buck, and S. Shaw. 1992. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta1 integrin-mediated adhesion. *J. Exp. Med.* 176:245-253.
22. Piali, L., S. M. Albelda, H. S. Baldwin, P. Hammel, R. H. Gisler, and B. A. Imhof. 1993. Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) modulates beta2 integrins on lymphokine-activated killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23: 2464-2471.
- 40 23. Meerschaert, J. and M. B. Furie. 1994. Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro. *J. Immunol.* 152: 1915-1926.
24. Newman, P. J., M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White II, S. Lyman, C. Paddock, and W. A. Muller. 1990. PECAM-1 [CD31] cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247: 1219-1222.
- 45 25. Sun, Q.-H., H. M. Delisser, M. M. Zukowski, C. Paddock, S. M. Albelda, and P. J. Newman. 1996. Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *J. Biol. Chem.* 271: 11090-11098.
- 50 26. Duncan, G. S., D. P. Andrew, H. Takimoto, S. A. Kaufman, H. Yoshida, J. Spellberg, J. L. de la Pompa, A. Elia, A. Wakeham, B. Karan-Tamir, W. A. Muller, G. Sendali, M. M. Zukowski, and T. W. Mak. 1999. Genetic

- evidence for functional redundancy of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J. Immunol.* 162: 3022-3030.
- 5 27. Tang, Q. and R. L. Hendricks. 1996. Interferon gamma regulates platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression and neutrophil infiltration into herpes simplex virus-infected mouse corneas. *J Exp Med* 184: 1435-1447.
28. Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to fMLP. *J. Exp. Med.* 187: 903-915.
- 10 29. Ali, J., F. Liao, E. Martens, and W. A. Muller. 1997. Vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin): Cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirculation* 4: 267-277.
30. Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Piscane, G. Houen, L. P. Ruco, and E. Dejana. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell. Biol.* 118: 1511-1522.
- 15 31. Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Boggemeyer, M. Simon, H. Mossmann, and D. Vestweber. 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* 110: 583-588.
32. de Fougères, A. R., S. A. Stacker, R. Schwarting, and T. A. Springer. 1991. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174: 253-267.
33. Xu, H., I. L. Tong, A. R. de Fougères, and T. A. Springer. 1992. Isolation, characterization, and expression of mouse ICAM-2 complementary and genomic DNA. *J. Immunol.* 149: 2650-2655.
- 20 34. Xie, J., R. Li, P. Kotovuri, C. Vermot-Desroches, J. Wijdenes, M. Arnaout, P. Nortamo, and C. G. Gahmberg. 1995. Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J. Immunol.* 155: 3619-3628.
- 25 35. Martin-Padura. I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons, and E. Dejana. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142: 117-127.
36. Naik, U. P., Y. H. Ehrlich, and E. Kornecki. 1995. Mechanisms of platelet activation by a stimulatory antibody: Cross-linking of a novel platelet receptor for monoclonal antibody F11 with the FcγRIII receptor. *Biochem. J.* 310: 155-162.
- 30 37. Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123: 1777-1788.
38. McCarthy, K. M., I. B. Skare, M. C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R. A. Rogers, R. D. Lynch, and E. E. Schneeberger. 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* 109: 2287-2298.
- 35 39. Fujimoto, K. 1995. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell Sci.* 108: 3443-3449.
- 40 40. Saitou, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.* 141: 397-408.
- 40 41. Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141: 1539-1550.
42. Morita, K., H. Sasaki, K. Fujimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 1999. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J. Cell Biol.* 145: 579-588.
- 45 43. Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 511-516.
44. Muller, W. A. 1996. Transendothelial migration of leukocytes. In *Leukocyte recruitment in inflammatory disease*. G. Peltz, editor. R.G. Landis Company, Austin, TX. 3-18.
- 50 45. Muller, W. A. and S. Weigl. 1992. Monocyte-selective transendothelial migration: Dissection of the binding and transmigration phases by an in vitro assay. *J. Exp. Med.* 176: 819-828.

46. Butcher, E. C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033-1036.
47. Carlos, T. M. and J. M. Harlan. 1994. Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion Molecules. *Blood* 84: 2068-2101.
- 5 48. Muller, W. A., C. M. Ratti, S. L. McDonnell, and Z. A. Cohn. 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J. Exp. Med.* 170: 399-414.
49. Albelda, S. M., W. A. Muller, C. A. Buck, and P. J. Newman. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 [endoCAM/CD31]: A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 114: 1059-1068.
- 10 50. Muller, W. A. 1992. PECAM-1: an adhesion molecule at the junctions of endothelial cells. In *Mononuclear Phagocytes. The Proceedings of the Fifth Leiden Meeting on Mononuclear Phagocytes*. R. van Furth, Z. A. Cohn, and S. Gordon, editors. Blackwell Publishers, Londres. 138-148.
51. Shang, X. Z. and A. C. Issekutz. 1998. Contribution of CD11a/CD18, CD11b/CD18, ICAM-1 (CD54) and -2 (CD102) to human monocyte migration through endothelium and connective tissue fibroblast barriers. *Eur. J. Immunol.* 28: 1970-1979.
- 15 52. Issekutz, A. C., D. Rowter, and T. A. Springer. 1999. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J. Leuk. Biol.* 65: 117-126.
53. Xie, Y. and W. A. Muller. 1993. Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5569-5573.
- 20 54. Kostrikis, L. G., Y. Huang, J. P. Moore, S. M. Wolinsky, L. Zhang, Y. Guo, L. Deutsch, J. Phair, A. U. Neumann, and D. D. Ho. 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat. Med.* 4: 350-353.
55. McElrath, M. J., G. Kaplan, A. Nusrat, and Z. A. Cohn. 1987. Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c mice. *J. Exp. Med.* 165: 546-559.
- 25 56. Smith, C. W., T. K. Kishimoto, O. Abbass, B. Hughes, R. Rothlein, L. V. McIntire, E. Butcher, and D. C. Anderson. 1991. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 87: 609-618.
57. Muller, W. A., R. M. Steinman, and Z. A. Cohn. 1980. The membrane proteins of the vacuolar system. I. Analysis by a novel method of intralysosomal iodination. *J. Cell Biol.* 86: 292-303.
- 30 58. Muller, W. A., R. M. Steinman, and Z. A. Cohn. 1980. The membrane proteins of the vacuolar system. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. *J. Cell Biol.* 86: 304-314.
59. Muller, W. A. and M. A. Gimbrone Jr. 1986. Plasmalemmal proteins of cultured vascular endothelial cells exhibit apical-basal polarity: Analysis by surface-selective iodination. *J. Cell Biol.* 103: 2389-2402.
- 35 60. Pober, J. S., M. P. Bevilacqua, D. L. Mendrick, L. A. Lapierre, W. Fiers, and M. A. Gimbrone. 1986. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 136: 1680-1687.
61. Romer, L. H., N. V. McLean, Y. Horng-Chin, M. Daise, J. Sun, and H. M. Delisser. 1995. IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 [CD31] on human endothelial cells. *J. Immunol* 154: 6582-6592.
- 40 62. Aruffo, A. and B. Seed. 1987. Molecular cloning of CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8573-8577.
63. Seed, B. and A. Aruffo. 1987. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3365-3369.
64. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Anonymous Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York. 191-192.
- 45 65. Muller, W. A., M. E. Berman, P. J. Newman, H. M. Delisser, and S. M. Albelda. 1992. A heterophilic adhesion mechanism for Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 [CD31]. *J. Exp. Med.* 175: 1401-1404.
66. Huang. A. J., J. E. Manning, T. M. Bandak, M. C. Ratau, K. R. Hanser, and S. C. Silverstein. 1993. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *J. Cell Biol.* 120: 1371-1380.

67. DiVirgilio, F., T. H. Steinberg, J. A. Swanson, and S. C. Silverstein. 1988. Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. *J. Immunol.* 140: 915-920.
68. Galfre, G., S. C. Howe, C. Milstein, G. N. Butcher, and J. C. Howard. 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266: 550-552.
- 5 69. Mishell, B. B. and S. M. Shiigi. 1980. Selected methods in cellular immunology. W.H.Freeman, San Francisco.
70. Reilly, P.L., J.R.J. Woska, D.D. Jeanfavre, E. McNally, R. Rothlein, and B. J. Bormann. 1995. The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J. Immunol.* 155: 529-532.
- 10 71. Miller, J., R. Knorr, M. Ferrone, R. Houdei, C. P. Carron, and M. L. Dustin. 1995. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated molecule-1. *J Exp Med* 182: 1231-1241.
72. Mizgerd, J. P., H. Kubo, G. J. Kutkoski, S. D. Bhagwan, K. Scharffeter-Kochanek, A. L. Beaudet, and C. M. Doerschuk. 1997. Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: Different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J. Exp. Med.* 186: 1357-1364.
- 15 73. Mayadas, T. N., R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes, and D. D. Wagner. 1993. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74: 541-554.
74. Watson, S. R., C. Fennie, and L. A. Lasky. 1991. Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature (Londres)* 349:164-167.

20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD99 que inhibe la migración transendotelial (MTE) de leucocitos mediada por CD99, para uso en un procedimiento para el tratamiento de una estado inflamatorio.
- 5 2. El anticuerpo anti-CD99 de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en el que la MTE se produce a través de células endoteliales en un tejido seleccionado del grupo que consiste en endotelio arterial, endotelio venoso, endotelio capilar, endotelio venular y endotelio venular postcapilar.
3. El anticuerpo anti-CD99 de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en el que el estado inflamatorio es un estado inflamatorio agudo.
- 10 4. El anticuerpo anti-CD99 de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en el que el estado inflamatorio se produce por una infección.
5. El anticuerpo anti-CD99 de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en el que el estado inflamatorio es un estado inflamatorio crónico.
- 15 6. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-CD99 es un anticuerpo monoclonal que se ha modificado para ser un anticuerpo monoclonal humanizado, un fragmento Fab o F[ab']₂, o un anticuerpo monoclonal quimérico.
7. Un procedimiento *in vitro* para modular la migración transendotelial (MTE) de leucocitos, comprendiendo dicho procedimiento inhibir la trans migración de leucocitos mediada por CD99 a través del endotelio usando un anticuerpo anti-CD99.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la CD99 está localizada sobre células endoteliales.
- 20 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la CD99 está localizada sobre los leucocitos.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la MTE se produce entre células endoteliales activadas.
- 25 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que las células endoteliales activadas se activan como resultado del contacto con una citocina proinflamatoria seleccionada del grupo que consiste en factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1).
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las células endoteliales se encuentran sobre tejido endotelial escindido mantenido en un cultivo de tejidos.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las células endoteliales se cultivan *in vitro* sobre una membrana permeable.
- 30 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las células endoteliales son células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la MTE se produce a través de células endoteliales en un tejido seleccionado del grupo que consiste en endotelio arterial, endotelio venoso, endotelio venular y endotelio venular postcapilar.
- 35 16. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la inhibición de la MTE mediada por CD99 comprende poner en contacto los leucocitos, el endotelio o ambos con el anticuerpo.
17. El procedimiento de la reivindicación 7, o el anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-CD99 es una molécula de anticuerpo monoclonal que se une a CD99 sobre monocitos, plaquetas y granulocitos.
- 40 18. Un procedimiento para seleccionar compuestos que inhiben la migración transendotelial mediada por CD99 de leucocitos, comprendiendo dicho procedimiento cultivar leucocitos y células endoteliales *in vitro* en presencia de un compuesto en condiciones que promueven la trans migración de leucocitos, e identificar un compuesto que inhibe la unión de leucocitos a células endoteliales e inhibe la trans migración de leucocitos.
- 45 19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende además detectar el grado de trans migración de leucocitos entre células endoteliales.
20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el compuesto se une a CD99.
21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que las células endoteliales se encuentran sobre tejido endotelial escindido mantenido en un cultivo de tejidos.

22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que las células endoteliales se cultivan *in vitro* sobre una membrana permeable.

23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que las células endoteliales son células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).

FIG. 1

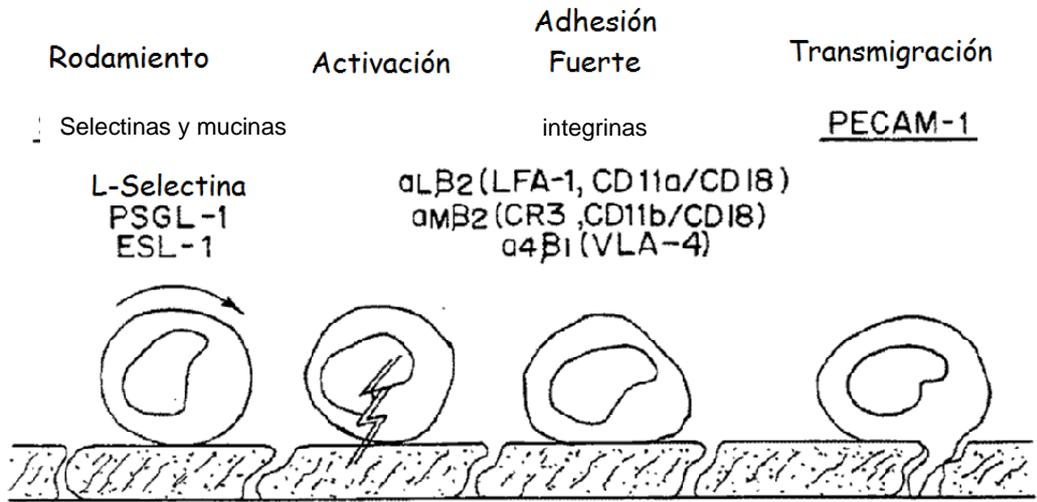


FIG. 2

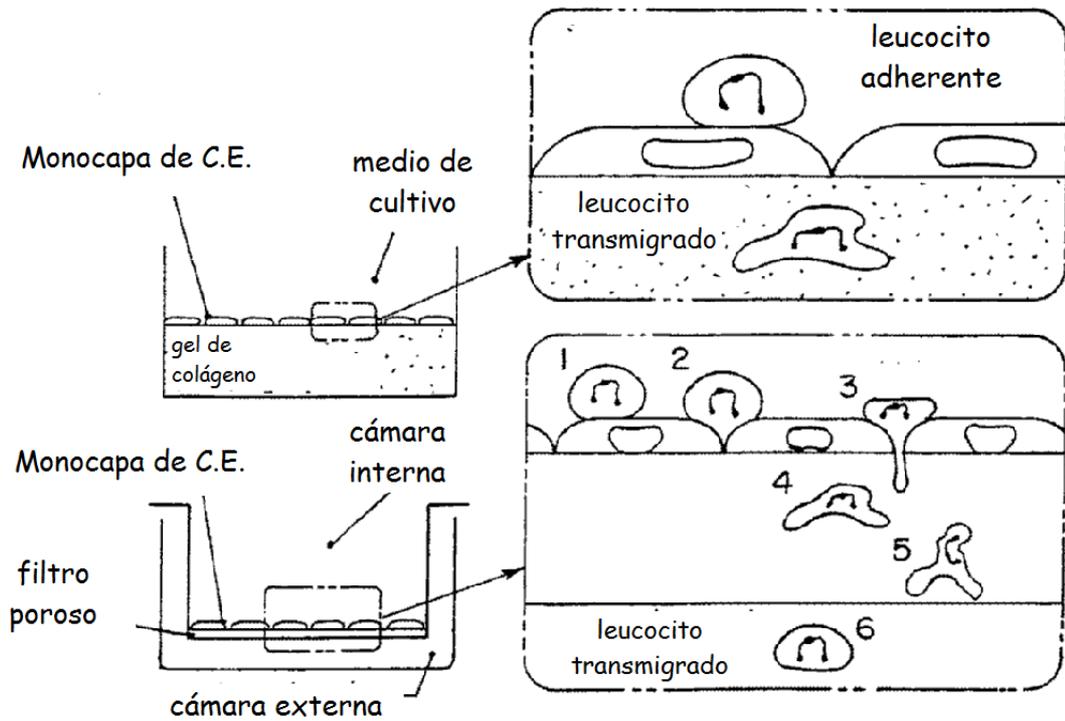


FIG. 3a

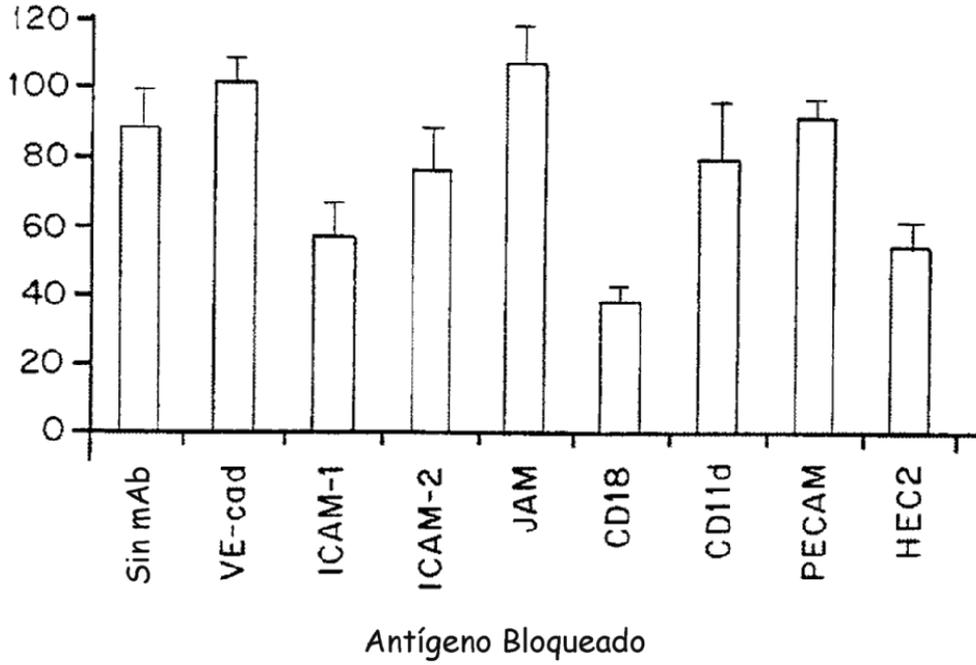
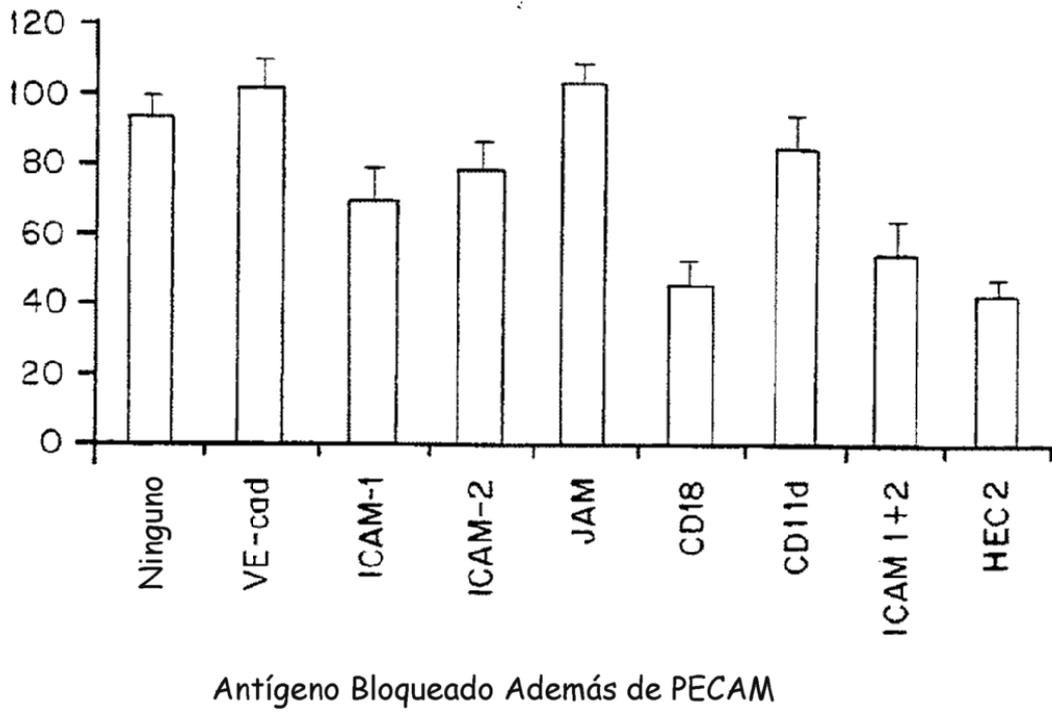


FIG. 3b



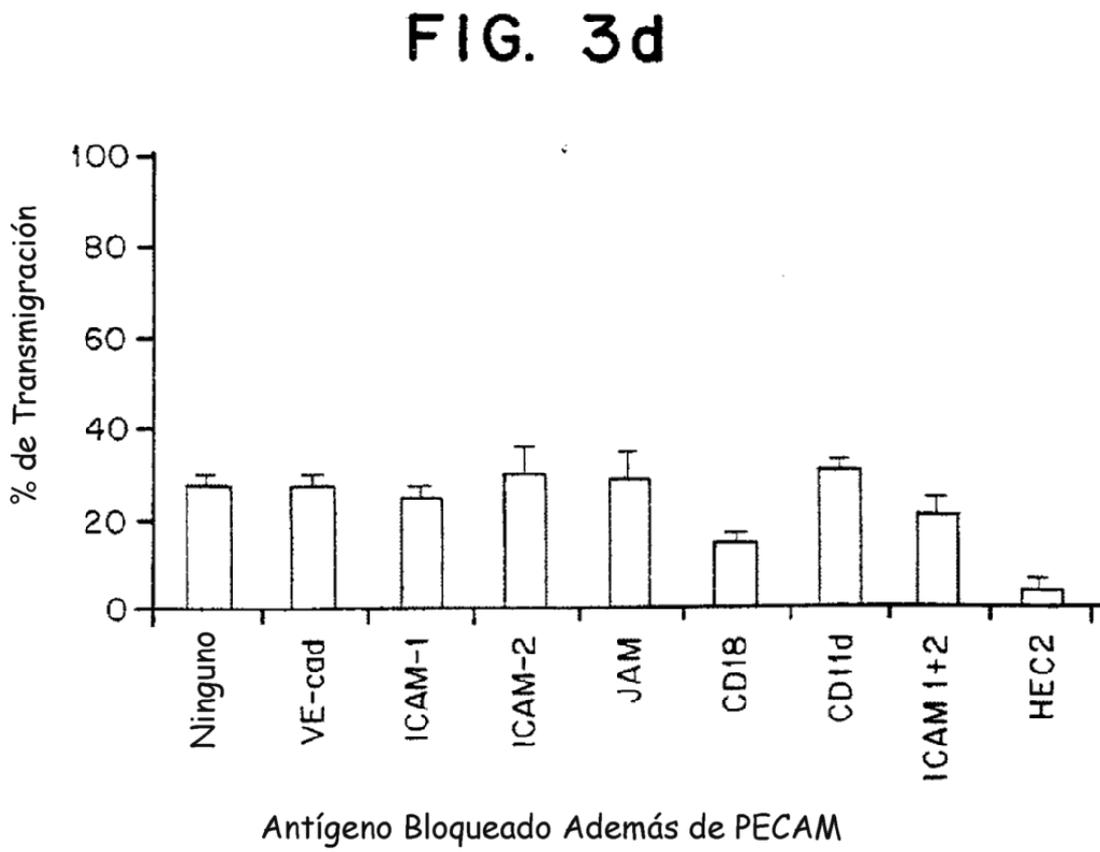
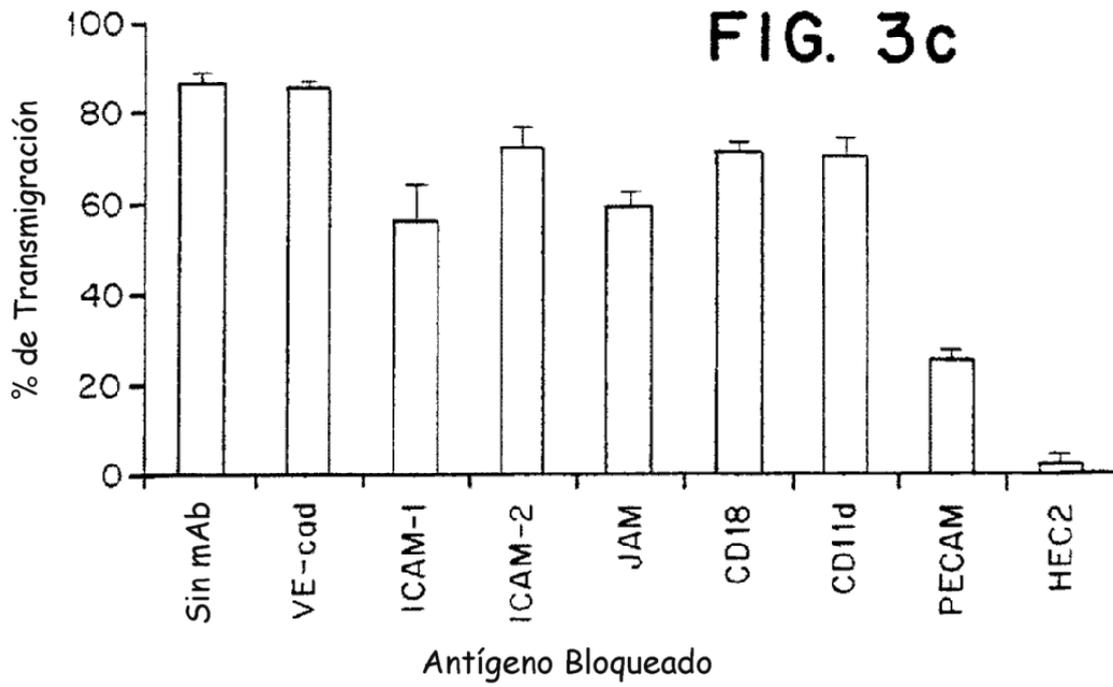
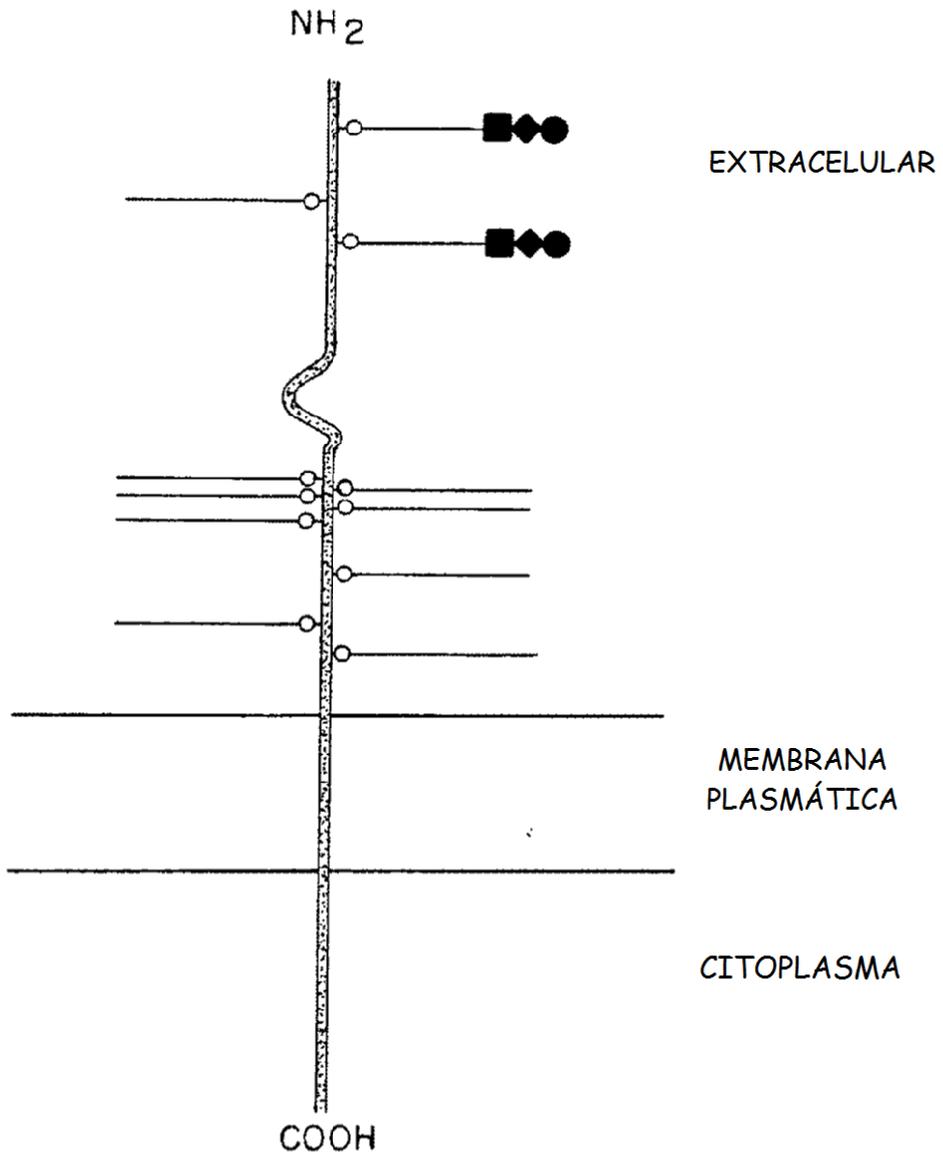


FIG. 4



—○—
■◆●
O-CARBOHIDRATO
LIGANDO DE LECTINA

~
DOMINIO DE INTERACCIÓN
PARA CD99 CON SU LIGANDO

FIG. 5

