

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 265**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03018879 .1**
96 Fecha de presentación: **25.01.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1415659**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **UN ANTICUERPO ESPECÍFICO DE BAFF SOLUBLE PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:
25.01.1999 US 117169 P
09.07.1999 US 143228 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2011

73 Titular/es:
Biogen Idec MA Inc.
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US y
Topotarget Switzerland SA

72 Inventor/es:
Browning, Jeffrey;
Ambrose, Christine;
MacKay, Fabienne;
Tschopp, Jurg y
Schneider, Pascal

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 369 265 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

Un anticuerpo específico para BAFF soluble para uso en el tratamiento de cáncer

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo específico para BAFF soluble o un fragmento activo de ese anticuerpo para uso en el tratamiento de cáncer. Se describe el uso de un ligando BAFF, un factor de activación de célula B perteneciente a la familia de necrosis tumoral y sus agentes de bloqueo para estimular o inhibir la expresión de células B e inmunoglobulinas. Esta proteína y su receptor pueden tener aplicaciones anticáncer y/o inmunorreguladoras así como usos para el tratamiento de trastornos inmunosupresores como HIV. Específicamente, el ligando y sus agentes de bloqueo pueden desempeñar un papel en el desarrollo de hipertensión y sus trastornos relacionados. Además, las células transfeccionadas con los genes para este ligando pueden usarse en la terapia génica para tratar tumores, enfermedades autoinmunes o trastornos genéticos heredados que implican células B. Agentes de bloqueo, como variantes recombinantes o anticuerpos específicos para el ligando o su receptor, pueden tener aplicaciones inmunorreguladoras asimismo. Se considera el uso de BAFF como estimulador de células B para enfermedades inmuno suprimidas incluyendo, por ejemplo, usos para pacientes que sufren trasplante de órganos (por ejemplo, trasplante de médula ósea) así como la recuperación de tratamientos de cáncer para estimular la producción de células B. También se considera el uso de BAFF como adyuvante y/o coestimulador para elevar y/o restaurar los niveles de células B para aproximarlos a niveles normales.

Fundamento de la invención

Las citoquinas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF) son mediadores de defensa del hospedador y de inmunorregulación. Los miembros de esta familia existen en formas ancladas en membrana, que actúan localmente a través del contacto célula a célula, o como proteínas secretadas capaces de difundirse a los objetivos más distantes. Una familia paralela de receptores señala la presencia de estas moléculas que conducen a la iniciación de la muerte de la célula o proliferación celular y a la diferenciación en el tejido objetivo. Al presente, la familia TNF de ligandos y receptores tiene al menos 11 pares ligando-receptor reconocidos, incluyendo: TNF:TNF-R; LT- α :TNF-R; LT- α / β :LT- β -R; FasL:Fas; CD40L:CD40; CD30L:CD30; CD27L:CD27; OX40L:OX40 y 4-1BBL:4-1BB. Las secuencias de DNA que codifican estos ligandos tienen solamente aproximadamente del 25% a aproximadamente el 30% de identidad incluso en los casos más relacionados, aunque la relación de aminoácidos es aproximadamente el 50%.

La característica definitoria de esta familia de receptores de citoquina se encuentra en el dominio extracelular rico en cisteína inicialmente revelado por la clonación de dos receptores de TNF distintos. Esta familia de genes codifica glicoproteínas características de proteínas de transmembrana de Tipo I con un dominio de unión de ligando extracelular, una región que abarca una membrana única y una región citoplásmica implicada en la activación de funciones celulares. La región de unión de ligando rica en cisteína muestra un dominio central estrechamente unido a disulfuro, que, dependiendo del miembro de la familia particular, se repite múltiples veces. La mayoría de los receptores tienen cuatro dominios, aunque puede haber tan pocos como tres, o tantos como seis.

Las proteínas en la familia TNF de ligandos se caracterizan por un corto tramo N-terminal de aminoácidos hidrófilos normalmente cortos, que a menudo contienen varios residuos de arginina o lisina pensados para servir como secuencias de transferencia stop. Inmediatamente sigue una región transmembrana y una región extracelular de longitud variable, que separa el dominio de unión a receptor C-terminal de la membrana. Esta región se denomina a veces "tallo". La región de unión C-terminal comprende la mayor parte de la proteína, y a menudo, pero no siempre, contiene sitios de glicosilación. Estos genes carecen de las secuencias de señal clásicas características de proteínas de membrana Tipo I, proteínas de membrana Tipo II con el terminus C descansando fuera de la célula, y un dominio N-terminal corto que reside en el citoplasma. En algunos casos, por ejemplo, la ruptura TNF y LT- α en la región tallo puede ocurrir pronto durante el procesamiento de la proteína y el ligando se encuentra entonces principalmente en forma secretada. La mayoría de los ligandos, sin embargo, existen en forma de una membrana, mediando localización señalizada.

La estructura de estos ligandos ha sido bien definida por análisis cristalográficos de TNF, LT- α , y CD-40. TNF y la linfotóxina-PPP (LT- α) están estructuradas en un sándwich de dos hojas plegadas- β antiparalelas con la topología "jelly roll" o de llave griega. La desviación rms entre los residuos C α y β es 0,61 Å, sugiriendo un alto grado de similitud en su topografía molecular. Una característica estructural que emerge de estudios moleculares de CD40L, TNF y LT- α es la propensión a reunirse en complejos oligoméricos. Intrínseca a la estructura oligomérica es la formación del punto de unión del receptor en la unión entre las subunidades próximas creando un enlace multivalente. Se ha observado que las estructuras cuaternarias de TNF, CD40L y LT- α existen como trímeros por el análisis de sus estructuras cristalinas. Muchos de los aminoácidos conservados entre los diferentes ligandos están en tramos del andamiaje de la hoja β . Es probable que la estructura sándwich básica se conserve en todas estas moléculas, ya que porciones de estas secuencias de andamiaje se conservan a través de los distintos miembros de las familias. La estructura cuaternaria puede también mantenerse ya que la conformación de la subunidad

probablemente se conserva similar.

Los miembros de la familia TNF pueden describirse lo mejor como conmutadores master en el sistema inmune que controlan la supervivencia y la diferenciación celular. Solamente TNF y $LT\alpha$ se reconocen actualmente como citoquinas secretadas que contrastan con los otros miembros predominantemente anclados en la membrana de la familia TNF. Aunque una forma de membrana de TNF se ha caracterizado bien y es probable que tenga roles biológicos únicos, la TNF secretada funciona como una alarma general que señala a células más distantes del sitio del evento desencadenante. Así la secreción de TNF puede amplificar un evento que conduce a cambios bien descritos en el revestimiento de la vasculatura y en el estado inflamatorio de las células. En contraste, los miembros de la familia unidos a la membrana envían señales aunque los receptores tipo TNF sólo a células en contacto directo. Por ejemplo, las células T proporcionan "ayuda" mediada por CD40 solamente a las células B traídas a contacto directo por medio de interacciones de TCR cognadas. Limitaciones de contacto célula-célula similares sobre la posibilidad de inducir la muerte celular se aplican al bien estudiado sistema Fas.

Parece que se pueden segregar los ligandos TNF en tres grupos basados en su capacidad para inducir la muerte celular. En primer lugar, TNF, el ligando Fas y TRAIL pueden inducir eficazmente la muerte celular en muchas líneas y lo más probable es que sus receptores tengan buenos dominios de muerte canónicos. Presumiblemente el ligando a DR-3 (TRAMP/WSL-1) estaría también en esta categoría. A continuación están aquellos ligandos que desencadenan una señal de muerte más débil limitada a algunos tipos de células y TWEAK, ligando CD30 y $LT\alpha$ son ejemplos de esta clase. Cómo este grupo puede desencadenar la muerte celular en ausencia de un dominio de muerte canónica es una cuestión interesante y sugiere que existe un mecanismo de señalización de muerte más débil separado. Finalmente, hay aquellos miembros que no pueden suministrar una señal de muerte eficazmente. Probablemente todos los grupos pueden tener efectos antiproliferativos sobre algunos tipos de células consecuentes a inducir diferenciación celular, por ejemplo CD40. Funakoshi et al. (1994).

La familia TNF ha crecido espectacularmente en años recientes para abarcar al menos 11 rutas de señalización diferentes que implican regulación del sistema inmune. Los modelos de expresión extendidos de TWEAK y TRAIL indican que hay una variedad aún más funcional a descubrir en esta familia. Este aspecto ha sido especialmente destacado recientemente en el descubrimiento de dos receptores que afectan la capacidad de los virus del sarcoma de rous y del herpes simple para replicar, así como las observaciones históricas de que TNF tiene actividad antiviral y los virus de la sífilis codifican para descodificar receptores de TNF. Brojatsch et al. (1996); Montgomery et al. (1996); Smith et al. (1994), 76 *Cell* 959-962; Vassalli et al. (1992), 10 *Immunol.* 411-452.

TNF es un mediador de shock séptico y caquexia, y está implicado en la regulación del desarrollo de célula hematopoyética. Parece desempeñar un papel importante como mediador de inflamación y defensa contra infecciones bacterianas, virales y parasitarias así como tener actividad antitumoral. TNF también está implicado en diferentes enfermedades autoinmunes. TNF puede ser producido por varios tipos de células, incluyendo macrófagos, fibroblastos, células T y células asesinas naturales. TNF se une a dos diferentes receptores, que actúa cada uno a través de moléculas de señalización intracelular específica, dando lugar así a diferentes efectos de TNF. TNF puede existir como una forma de unión a membrana o como una citoquina secretada soluble.

$LT-\alpha$ comparte muchas actividades con TNF, esto es, unión a los receptores de TNF, pero a diferencia de TNF, parece estar secretado principalmente por células T activadas y algunos tumores linfoblastoides- β . El complejo heterómero de $LT-\alpha$ y $LT-\beta$ es un complejo unido a la membrana que se une al receptor $LT-\beta$. El sistema LT (LTs y $LT-R$) parece estar implicado en el desarrollo de órganos linfoides periféricos ya que la disrupción genética de $LT-\beta$ conduce a desorganización de células T y B en el bazo y una ausencia de nodos linfáticos. El sistema $LT-\beta$ está también implicado en la muerte celular de algunas líneas celulares de adenocarcinoma.

Fas-L, otro miembro de la familia TNF, se expresa predominantemente sobre células T activadas. Induce la muerte de células que soportan su receptor, incluyendo células tumorales y células infectadas con HIV, por un mecanismo conocido como muerte celular programada o apoptosis. Además, deficiencias en Fas o Fas-L pueden conducir a trastornos linfoproliferativos, que confirman el papel del sistema Fas en la regulación de respuestas inmunes. El sistema Fas está también implicado en la destrucción de células T en pacientes con HIV. TRAIL, otro miembro de esta familia, también parece estar implicado en la muerte de una amplia variedad de líneas celulares transformadas de diverso origen.

CD40-L, otro miembro de la familia TNF, se expresa sobre células T e induce la regulación de células B que soportan CD40. Además, alteraciones en los genes CD40-L dan lugar a la enfermedad conocida como síndrome de hiper-IgM unido a X. El sistema CD40 también está implicado en diferentes enfermedades autoinmunes y se sabe que CD40-L tiene propiedades antivirales. Aunque el sistema CD40 está implicado en la liberación de células B apoptóticas, en las células no inmunes induce apoptosis. Muchos miembros linfocitos adicionales de la familia TNF están también implicados en coestimulación.

Generalmente, los miembros de la familia TNF tienen papeles reguladores fundamentales en el control del sistema inmune y en la activación de agudos sistemas de defensa del hospedador. Dado el actual progreso en la

manipulación de los miembros de la familia TNF para beneficio terapéutico, es probable que los miembros de esta familia puedan proporcionar medios únicos para controlar la enfermedad. Algunos de los ligandos de esta familia pueden inducir directamente la muerte apoptótica de muchas células transformadas, por ejemplo, LT, TNF, ligando Fas y TRAIL. Nagata (1997) 88 Cell 355-365. Fas y posiblemente la activación de receptor de TNF y CD30 pueden inducir la muerte celular en linfocitos no transformados que pueden desempeñar una función inmunorreguladora. Amakawa et al. (1996) 84 Cell 551-562; Nagata (1997) 88 Cell 355-365; Sytwu et al. (1996); Zheng et al. (1995) 377 Nature 348-351. En general, la muerte se desencadena a continuación de la agregación de dominios de muerte que residen sobre el lado citoplásmico de los receptores de TNF. El dominio de muerte instrumenta el ensamblaje de varios componentes de transducción de señales que dan lugar a la activación de la cascada de caspasas. Nagata (1997) 88 Cell 355-365. Algunos receptores carecen de dominios de muerte canónicos, por ejemplo, receptor de LTb y CD30 (Browning et al. (1996); Lee et al. (1996)), todavía pueden inducir la muerte celular aunque más débilmente. Es probable que estos receptores funcionen principalmente para inducir la diferenciación celular y la muerte es una consecuencia aberrante en algunas líneas celulares transformadas, aunque este cuadro no está claro, ya que estudios sobre el ratón nulo CD30 sugieren un papel de muerte en la selección negativa en el timo. Amakawa et al. (1996) 84 Cell 551-562. Inversamente, se requiere la señalización a través de otras vías como CD40 para mantener la supervivencia de las células. Así, hay necesidad de identificar y caracterizar moléculas adicionales que son miembros de la familia TNF proporcionando así medios adicionales de controlar enfermedades y manipular el sistema inmune.

El documento EP 0 869 180 describe polipéptidos TL5 y polinucleótidos y métodos para producir dichos polipéptidos, así como diversos usos médicos de los mismos.

Aquí caracterizamos las propiedades funcionales de un nuevo ligando de la familia de citoquinas TNF. El nuevo ligando, denominado BAFF (factor activador de célula B perteneciente a la familia TNF); parece estar expresado por células T y células dendríticas para el fin de coestimulación de célula B y puede, por consiguiente, desempeñar un papel importante en el control de la función de la célula B. Además, hemos generado ratones transgénicos que sobreexpresan BAFF bajo el control de un promotor específico de hígado. Estos ratones tienen números excesivos de células B maduras, reacciones de centro germinal espontáneas, secretan autoanticuerpos, y tienen números altos de células plasmáticas en órganos linfoides secundarios y deposición de Ig en el riñón.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo específico para BAFF soluble o un fragmento activo de ese anticuerpo para uso en el tratamiento de cáncer.

También se describe el uso de ligandos BAFF, agentes bloqueantes y anticuerpos para el ligando, para estimular o inhibir el crecimiento de células B y la secreción de inmunoglobulina. Se describen usos para aplicaciones terapéuticas en numerosas enfermedades y trastornos, como se describe en detalle más abajo, así como para obtener información acerca de, y manipular el sistema inmune y sus procesos. Además, se describe un método para estimular o inhibir el crecimiento de células B y la secreción de inmunoglobulinas. Las moléculas asociadas a BAFF, como se describe en esta invención, pueden también tener utilidad en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, trastornos relativos a la proliferación y maduración de células B, regulación del ligando BAFF e inflamación. Se describe la regulación o prevención de la hipertensión y trastornos relativos a la hipertensión del tejido renal y cardiovascular.

Se establecerán características y ventajas de la invención en la descripción que sigue, y en parte serán evidentes de la descripción, o podrán aprenderse por práctica de la invención. Los objetivos y otras ventajas de la invención se realizarán y obtendrán por los métodos particularmente señalados en la descripción escrita y sus reivindicaciones, así como en los dibujos anexos.

Se describe un método para efectuar el crecimiento de células B y la secreción de inmunoglobulinas mediante la administración de diversos ligandos BAFF y moléculas relacionadas.

También se describe la estimulación del crecimiento de células B mediante el uso de ligandos BAFF o fragmentos activos del polipéptido. El polipéptido puede usarse solo o con un ligando CD40 o un anticuerpo anti-murino.

Se describen usos de estimulación del crecimiento y maduración de células B inducidos por células dendríticas mediante el uso de ligandos BAFF o fragmentos activos de BAFF. De nuevo el polipéptido puede usarse solo o con ligando CD40 o anticuerpos anti- μ .

Se han usado agentes bloqueantes de BAFF y el receptor de BAFF para inhibir el crecimiento de células B y la secreción de inmunoglobulina. Estos agentes pueden ser BAFF inoperable, recombinante, anticuerpos específicos de BAFF, anticuerpos específicos de receptor de BAFF o una molécula anti-ligando BAFF.

Se describen usos BAFF, moléculas relacionadas con BAFF y agentes de bloqueo de BAFF para tratar la hipertensión, trastornos relacionados con la hipertensión, trastornos inmunes, enfermedades autoinmunes,

inflamación y trastornos linfoproliferativos de célula B.

Se describen usos de BAFF y moléculas relacionadas con BAFF como agonistas o antagonistas para efectuar respuestas inmunes efectuando el crecimiento y/o maduración de células B y la secreción de inmunoglobulina.

5 Se describen constructos solubles que comprenden BAFF que pueden usarse para desencadenar directamente eventos farmacológicos mediados por BAFF. Dichos eventos pueden tener beneficios terapéuticos útiles en el tratamiento de cáncer, tumores, o en la manipulación del sistema inmune para tratar enfermedades inmunológicas.

10 Adicionalmente, la invención reivindicada se refiere a anticuerpos dirigidos contra BAFF soluble, que pueden usarse para el tratamiento de cánceres.

También se describen métodos de terapia génica que usan los genes de BAFF.

15 Las preparaciones farmacéuticas de la invención, opcionalmente, pueden incluir soportes, auxiliares, rellenos u otras composiciones farmacéuticas, y pueden administrarse en cualquiera de las numerosas formas o rutas conocidas en la técnica.

20 Hay que comprender que la descripción general precedente y la siguiente descripción detallada son por vía de ejemplo y explicación, e intentan proporcionar explicación adicional de la invención reivindicada.

Los dibujos anexos se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención, y se incorporan en, y constituyen una parte de esta especificación, ilustran varias realizaciones de la invención, y junto con la descripción sirven para explicar los principios de la invención.

25 **Descripción de los dibujos**

La Figura 1 (A) representa la secuencia de aminoácidos predicha de BAFF humana y de ratón. Se indican el dominio transmembrana predicho (TMD), línea de trazos), los sitios potenciales de glicosilación enlazados a N (estrellas) y el sitio de procesamiento natural de BAFF humano (flecha). La línea doble por encima de hBAFF indica la secuencia obtenida por degradación Edman de la forma procesada de BAFF. (B) representa una comparación de la secuencia de proteína extracelular de BAFF y algunos miembros de la familia del ligando TNF. Residuos homólogos e idénticos están representados en cuadros negros y sombreados, respectivamente. (C) representa dendrograma de ligandos de la familia TNF. La Figura 2 es una caracterización esquemática de BAFF recombinante (A) Representación esquemática de constructos de BAFF recombinante. BAFFs recombinantes solubles que comienzan en Leu₈₃ y Gin₁₃₆ se expresan fusionados a una etiqueta Flag N-terminal y un enlazador de 6 aminoácidos. La forma larga se interrumpe entre Arg₁₃₃ y Ala₁₃₄ (flecha) en células 293 T, para producir una forma procesada de BAFF. Asn₁₂₄ y Asn₂₄₂ pertenecen a sitios de consenso de N-glicosilación. El glicano enlazado a N presente en Asn₁₂₄ se muestra como Y. TMD: dominio de transmembrana. (B) Tratamiento con péptido N-glicanasa F (PNGasaF) de BAFF recombinante. Los sobrenadantes concentrados que contienen APRIL y BAFFs etiquetados-Flag se desglicosilaron y analizaron por Western blotting utilizando anticuerpos anti-BAFF policlonales o anti-Flag M2, como se ha indicado. Todas las bandas, excepto BAFF procesado también reaccionaron con anti-Flag M2 (datos no mostrados). (C) BAFF de longitud total se procesa a una forma soluble. Las células 293T se transfeccionaron transitoriamente con BAFF de longitud total. Las células transfeccionadas y sus sobrenadantes concentrados se analizaron por Western blotting utilizando anticuerpos antiBAFF policlonales. Los sobrenadantes correspondientes a 10 veces la cantidad de células se cargaron sobre el gel. (D) Cromatografía de exclusión de tamaño de BAFF sobre Superdex-200. Los sobrenadantes que contienen BAFF soluble/corto se fraccionaron sobre una columna de Superdex 200 y las fracciones eluidas se analizaron por Western blotting utilizando anticuerpo antiFlag M2. Las posiciones de migración de los marcadores de masa molecular (en kDa) se indican en el lado a mano izquierda para SDS-PAGE y en la parte alta de la figura por cromatografía de exclusión de tamaño.

La Figura 3 representa expresión de BAFF (A) Northern blots (2 µg poli A+RNA por calle) de varios tejidos humanos se probaron con mRNA antisentido de BAFF. (B) amplificación de transcriptasa inversa de BAFF. Cadena alfa de receptor IL-2 y actina de RNA de células T de sangre purificada en varios momentos de activación de PHA, células sanguíneas negativas E-Rosetting (células B y monocitos), células dendríticas inmaduras derivadas *in vitro*, células 293, y células 293 transfeccionadas estérilmente con BAFF de longitud total (293-BAFF). Se realizaron amplificaciones control en ausencia de cDNA añadido. La cadena alfa de receptor IL-2 se amplificó como un marcador de activación de célula T.

60 La Figura 4 representa unión de BAFF a células B maduras. (A) unión de BAFF soluble a BJAB y líneas celulares Jurkat, y a células CD19⁺ purificadas de sangre del cordón umbilical. Las células se tiñeron con la cantidad indicada (en ng/50µl) de Flag- BAFF y se analizaron por citometría de flujo. (B) Unión de BAFF soluble a PBLs. PBLs se tiñeron con anti-CD8-FITC o con anti-CD19-FITC (eje horizontal) y con Flag- BAFF más M2-biotina y avidina-P (eje vertical). Flag- BAFF se omitió en los controles.

65 La Figura 5 representa que BAFF coestimula la proliferación de célula B. (A) Expresión superficial de BAFF en

células 293 transfeccionadas establemente. Células tipo salvaje (wt) 293 y 293-BAFF se tiñeron con antiBAFF mAb 43,9 y se analizaron por citometría de flujo. (B) Coestimulación de PBLs por células 293-BAFF. PBLs (10^5 /pocillo) se incubaron con células 293 fijadas a glutaraldehído 15.000 (293 wt 293-BAFF) en la presencia o ausencia de anticuerpo de receptor de anti célula B (anti- μ). Células 293 fijadas solas incorporaron 100 cpm. (C) Coestimulaciones dependientes de la dosis de proliferación de PBL por BAFF soluble en presencia de anti- μ .

La proliferación se determinó después de 72 horas de incubación por incorporación de [3 H]-timidina. Los controles incluyen células tratadas con BAFF solo, con BAFF desnaturalizado por calor o con un anticuerpo equiparado a un isotipo irrelevante en lugar de anti- μ . (D) Comparación de los efectos coestimuladores de sCD40L y sBAFF sobre la proliferación de PBL. El experimento se realizó como se ha descrito en el panel C. (E) BAFF coestimula la secreción de Ig de células B humanas preactivadas. Las células CD19+B purificadas se activaron por cocultivo con células EL-4T y activaron sobrenadantes de célula T durante 5-6 días, después se reaislaron y se cultivaron durante otros 7 días en presencia de medio solamente (-) o que contenía sobrenadantes de célula T activados al 5% (T-SUP) o una mezcla de citoquinas (IL-2, IL-4, IL-10). Las columnas representan medios de concentraciones de Ig para cultivos con o sin 1 μ g/ml de BAFF. Valores medios \pm SD en términos de "aumento de veces" fueron $1,23 \pm 0,11$ para medio solamente, $2,06 \pm 0,18$ con células T sobrenadantes (4 experimentos) y $1,45 \pm 0,06$ con IL-2, IL-4 y IL-10 (2 experimentos). Estos se realizaron con sangre periférica (3 experimentos) o células B de sangre del cordón umbilical (un experimento; aumento de 2,3 veces con células T sobrenadantes, aumento de 1,5 veces con IL-2, IL-4 y IL-10). (F) La curva de dosis-respuesta para el efecto de BAFF en cultivos con sobrenadantes de células T, como se muestra en el panel D. Valor medio \pm SD de 3 experimentos.

La Figura 6 ilustra que BAFF actúa como un cofactor para la proliferación de células B. La proliferación de PBL humano se midió solo (500 cpm), con la presencia de ligando BAFF solo, con la presencia de antimurina (μ) de cabra sola, y con ligando BAFF y anti- μ . La combinación de anti- μ y BAFF elevaba significativamente la proliferación de PBL cuando aumentaba la concentración de BAFF sugiriendo características de cofactor de BAFF.

La Figura 7 representa número de células B aumentado en ratones BAFF Tg

(A) Recuentos de linfocitos aumentados en ratones Tg BAFF. La gráfica compara 12 camadas control (panel de la izquierda) con 12 ratones Tg BAFF (panel de la derecha). Los recuentos de linfocitos se muestran con círculos y los granulocitos (incluyendo neutrofilos, eosinofilos, basofilos) con diamantes.

(B) Proporción aumentada de células B en PBL de los ratones Tg BAFF. PBL se tiñó con anti-B220.FITC y anti-CD4-PE para análisis FACS y se activaron sobre células vivas utilizando la dispersión lateral delantera. Se indican los porcentajes de células positivas CD40 y B220. Se muestran un ratón control (izquierda) y dos ratones Tg BAFF (derecha) y los resultados son representativos de 7 animales analizados en cada grupo.

(C) Análisis FACS de la proporción de células B a células T en PBL. La diferencia entre animales control y ratones Tg BAFF en (A) y (C) era estadísticamente significativa ($P < 0,001$).

(D) Expresión aumentada de MHC clase II sobre células B de PBL de ratones Tg BAFF.

La expresión MHC clase II se analizó por FACS.

(E) Expresión Bcl-2 aumentada en células B de PBL de ratones Tg BAFF.

La expresión Bcl-2 se midió por tinción intracitoplásmica y las células se analizaron por FACS.

En (D) y (E) las células vivas se activaron sobre la dispersión lateral delantera. Se muestran cuatro compañeros de camada control /barras blancas) y cuatro ratones Tg BAFF y son representativos de al menos 12 animales analizados para cada grupo. MFI: media de intensidad de fluorescencia. La diferencia entre animales control y ratones Tg BAFF fue significativa estadísticamente ($P < 0,005$).

(F) Expresión aumentada de células T efectoras en ratones Tg BAFF. PBL se tiñeron con anti-CD4-Cychrome, anti-CD44-FITC y anti-L selectina-PE. Se muestran células activadas CD4 $^+$. Se indican porcentajes de células CD44 hi /L-selectina lo . Se muestran un ratón control (izquierda) y dos ratones Tg BAFF (derecha) y los resultados fueron representativos de 8 animales analizados en cada grupo.

La Figura 8 presenta compartimentos de célula B aumentados en el bazo pero no en la médula ósea de ratones Tg BAFF.

(A) Tinción FACS para células B maduras utilizando anti-Ig-FITC y anti-B220-PE, en bazo (panel de arriba), médula ósea (panel medio) y MLN (panel de abajo). Se indican los porcentajes de células maduras B B220+/IgM.

(B) Se indica tinción FACS para células preB (B220+/CD43-) y células proB (B220+/CD43+) en la médula ósea utilizando anti-CD43-FITC, y anti-B220-Cychrome y anti-IgM-PE simultáneamente. Se muestran células activadas

sobre la población negativa IgM. Se indican porcentajes de células preB (B220+/CD43-) y células proB (B220+/CD43+).

5 Para todas las figuras (a y B) se muestran un ratón control (izquierda) y dos ratones Tg BAFF (derecha) y los resultados son representativos de 7 animales analizados para cada grupo.

La Figura 9 presenta niveles aumentados de Ig, RF y CIC en ratones Tg BAFF.

10 (A) SDS-PAGE de dos sueros control (-) y 4 sueros de ratones Tg BAFF (+) lado por lado con la cantidad indicada de IgG de ratón purificada para referencia. La intensidad de la banda de albúmina es similar en todas las calles indicando que el material cargado sobre el gel es equivalente para cada muestra.

15 Análisis basado en ELISA de Ig (B), RF(C) y CIC(D) de ratón totales en los sueros de 19 compañeros de camada de control (barras blancas) y 21 ratones Tg BAFF (barras negras). En la ausencia de un control de RF apropiado, el título (log de base 2) para RF se define como la dilución de los sueros que da un O.D: 3 veces más alto que el del fondo. La cantidad de CIC se define como la cantidad de PAP requerida para generar un O.D. equivalente al obtenido con el suero ensayado. La diferencia entre animales control y ratones Tg BAFF era estadísticamente significativa ($P < 0,001$ en (B) y (C), $P < 0,003$ en (D)).

20 La Figura 10 ilustra la presencia de autoanticuerpos antissDNA y anti-dsDNA en algunos ratones Tg BAFF.

(A) análisis por ELISA de anticuerpos antissDNA en 19 compañeros de camada control (barras grises) y 21 ratones Tg BAFF (barras negras).

25 (B) Análisis por ELISA de autoanticuerpos anti-ssDNA en 5 compañeros de camada control y los 5 animales que muestran niveles de autoanticuerpos anti-ssDNA de (A).

30 (C) Secciones de parafina de riñones de un ratón control (izquierda) y un ratón Tg BAFF (derecha), teñidos con Ig-HRP anti ratón de cabra. La deposición de Ig se muestra por una tinción marrón. Estos cuadros son representativos de 6 ratones Tg BAFF analizados.

La Figura 11 presenta placas de Peyer ensanchadas en ratones Tg BAFF.

35 Fotografía de placas de Peyer (indicadas con una flecha) sobre el intestino delgado de un ratón control (izquierda) y un ratón Tg BAFF (derecha). Este cuadro es representativo de al menos 12 ratones sacrificados para cada grupo. Aumento 5X.

La Figura 12 presenta organización de células T y B interrumpida, reacciones de centro germinal intensas, número disminuido de células dendríticas y número aumentado de células plasmáticas en el bazo de ratones Tg BAFF.

40 Un ratón control se muestra en A, C, E y G y un Tg BAFF en B, D, F y H. Las células B son azules y las células T marrones (A y B). Los centros germinales se muestran con una flecha (C y D). Solamente algunos centros germinales se ven en ratones control (C). Las células dendríticas positivas CD11c son marrones y aparecen en la zona de células T, enlazando canales y la zona marginal(E). Muy pocas están presentes en ratones Tg BAFF (F). Las células plasmáticas Syndecan-1-positivas sólo fueron detectables en la pulpa roja de ratones Tg BAFF (H) pero no en los ratones control (G).

50 Estos cuadros son representativos de al menos 12 ratones Tg BAFF analizados y 12 ratones control. El aumento es 100X para todos los cuadros excepto C y D que es 50X. B= folículo de célula B, T: PALS, WP: pulpa blanca, RP: pulpa roja.

La Figura 13 presenta organización de células T y B interrumpida, reacciones de centro germinal intensas y gran número de células plasmáticas en los ratones MLN y Tg BAFF.

55 El ratón control se muestra en A, C, E y G y el ratón Tg BAFF se muestra en B, D, F H. La inmunohistoquímica se llevó a cabo como se ha descrito en la Figura 6. La tinción de células T y B se muestra en A y B, los centros germinales en C y D, las células dendríticas en E y F y las células plasmáticas en G y H. GC:centro germinal. Aumento 100X.

60 Descripción detallada de la invención

65 Ahora se hará referencia detallada a las realizaciones preferidas de esta invención. Se describe el uso de BAFF y moléculas relacionadas con BAFF para efectuar el crecimiento y maduración de células B y la secreción de inmunoglobulina. Se describe el uso de BAFF y moléculas relacionadas con BAFF para efectuar respuestas del sistema inmune, cuando se necesite por trastornos inmunorrelacionados. Adicionalmente, esta invención abarca el tratamiento de cáncer usando un anticuerpo específico para BAFF soluble.

El ligando BAFF y sus homólogos producidos por hospedadores transformados con las secuencias descritas aquí, así como BAFF nativo purificado por los procesos conocidos en la técnica, o producido a partir de secuencias de aminoácidos conocidas, son útiles en una variedad de métodos para aplicaciones anticáncer, antitumorales e inmunorreguladoras. También son útiles en la terapia y métodos dirigidos a otras enfermedades,

Otro aspecto se refiere al uso del polipéptido codificado por el ácido nucleico aislado que codifica el ligando BAFF en terapia "antisentido". Como se usa aquí, terapia "antisentido" se refiere a la administración o generación *in situ* de oligonucleótidos o sus derivados que hibridan específicamente bajo condiciones celulares con el mRNA y/o DNA celular que codifica el ligando de interés, así como inhiben la expresión de la proteína codificada, esto es, inhibiendo la transcripción y/o traslación. La unión puede ser por complementariedad de parejas de base convencional, o, por ejemplo, en el caso de unión a dúplex de DNA, a través de interacciones específicas en la acanaladura principal de la doble hélice. En general, la terapia "antisentido" se refiere a un abanico de técnicas generalmente empleadas en la técnica, e incluye cualquier terapia que descansa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Un constructo antisentido puede suministrarse, por ejemplo, como un plásmido de expresión, que, cuando se transcribe en la célula, produce RNA que es complementario como mínimo a una porción del mRNA celular que codifica el ligando-Kay. Alternativamente, el constructo antisentido puede ser una sonda oligonucleótido que se genera *ex vivo*. Esas sondas oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados que son resistentes a nucleasas endógenas, y son, por consiguiente, estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplo para uso como oligonucleótidos antisentido, son fosforamidatos, fosfotioatos y metilfosfonatos análogos de DNA (Véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.176.996; Patente de EE.UU. 5.264.564; y Patente de EE.UU. 5.256.775). Adicionalmente, se han revisado enfoques generales para construir oligómeros útiles en terapia antisentido, por ejemplo, por Van Der Krol et al., (1988) *Biotechniques* 6:958-976; y Stein et al. (1988) *Cancer Res* 48:2659-2668.

C. LIGANDO BAFF

El ligando BAFF, como se ha informado antes, es un miembro de la familia TNF y se ha descrito en la solicitud PCT número PCT/US98/19037 (WO99/12964). La proteína, sus fragmentos o sus homólogos pueden tener amplias aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

El ligando BAFF está presente principalmente en el bazo y en linfocitos de sangre periférica, indicando marcadamente un papel regulador en el sistema inmune. La comparación de las secuencias del ligando BAFF reivindicado con otros miembros de la familia TNF humana revela considerable similitud estructural. Todas las proteínas comparten varias regiones de conservación de secuencia en el dominio extracelular.

Aunque no se conoce la estructura tridimensional precisa del ligando reivindicado, se predice que, como miembro de la familia TNF, puede compartir ciertas características estructurales con otros miembros de la familia.

Los nuevos polipéptidos interactúan específicamente con un receptor que aún no ha sido identificado. Sin embargo, los péptidos y métodos descritos aquí permiten la identificación de receptores que interactúan específicamente con el ligando BAFF o fragmentos suyos.

Se describen métodos para usar péptidos derivados del ligando BAFF que tienen que tienen la capacidad de unirse a sus receptores. Los fragmentos de los ligandos BAFF pueden producirse de varias maneras, por ejemplo, recombinantemente, por PCR, digestión proteolítica o por síntesis química. Fragmentos internos o terminales de un polipéptido pueden generarse separando uno o más nucleótidos de un extremo o ambos extremos de un ácido nucleico que codifica el polipéptido. La expresión del DNA mutagenizado produce fragmentos de polipéptido.

Fragmentos de polipéptido pueden también sintetizarse químicamente empleando técnicas conocidas en la técnica como la química t-boc o f-moc en fase sólida Merrifield convencional. Por ejemplo, péptidos y secuencias de DNA pueden dividirse arbitrariamente en fragmentos de longitud deseada sin solapamiento del fragmento, o dividirse en fragmentos solapados de una longitud deseada. Métodos como estos se describen con detalle a continuación.

Generación de formas solubles del ligando BAFF

Formas solubles del ligando BAFF se pueden señalar efectivamente y pueden administrarse como un fármaco que imita ahora la forma natural de la membrana. Es posible que los ligandos BAFF se secreten naturalmente como citoquinas solubles, sin embargo, si no es así, se pueden regestionar los genes para forzar la secreción. Para crear una forma soluble secretada de ligando BAFF, se eliminarían en el nivel DNA las regiones transmembrana N-terminus, y alguna porción de la región tallo, y se las sustituiría con una secuencia líder tipo I o alternativamente líder tipo II que permitirá suficiente ruptura proteolítica en el sistema de expresión elegido. Un experto en la técnica podría variar la cantidad de la región tallo retenida en el constructo de expresión de secreción para optimizar las propiedades de unión al receptor y la eficacia de la secreción. Por ejemplo, los constructos que contienen todas las longitudes posibles de tallo, es decir, truncaciones N-terminal, podrían prepararse de modo que resultarían las proteínas que comienzan en los aminoácidos 81 a 139. La secuencia de tallo de longitud óptima resultaría de este

tipo de análisis.

E. Generación de anticuerpos reactivos con el ligando BAFF

5 La invención también incluye anticuerpos específicamente reactivos con el ligando BAFF reivindicado o sus receptores. Antiseros antiproteína/antipéptido o anticuerpos monoclonales pueden hacerse por protocolos estándar (Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow y Lane (Cold spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero como un ratón, un hámster o un conejo pueden inmunizarse con una forma inmunogénica del péptido. Las técnicas para conferir inmunogenicidad en una proteína o un péptido incluyen conjugación a soportes, u otras técnicas bien conocidas en la técnica.

10 Una porción inmunogénica de ligando BAFF o sus receptores puede administrarse en la presencia de un auxiliar. El progreso de la inmunización puede controlarse por detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. ELISA estándar u otros inmunoensayos pueden usarse con el inmunogen como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

15 En una realización preferida, los anticuerpos sujeto son inmunoespecíficos para determinantes antígenos del ligando BAFF o sus receptores, (por ejemplo, determinantes antígenos de un polipéptido de SEQ.ID.NO.:2, secuencia descrita en la solicitud PCT número PCT/US98/19037 (WO99/12964) y se incorpora en su totalidad aquí), o un homólogo mamífero humano o no humano estrechamente relacionado (por ejemplo, un 70, 80 o 90 por ciento homólogo, más preferiblemente un 95% homólogo). En aún otra realización adicional de la presente invención, los anticuerpos anti-ligando BAFF o anti-receptor de ligando BAFF no tienen sustancialmente reacción cruzada (es decir, reaccionan específicamente) con una proteína que es, por ejemplo, menos que un 80% homóloga de SEQ.ID.NO.: 2 ó 6, dicha secuencia descrita en la solicitud PCT número PCT/US98/19037 (WO99/12964) e incorporada aquí en su totalidad; preferiblemente menos del 90% homóloga de SEQ.ID.NO.:2, secuencia descrita en solicitud PCT número PCT/US98/19037(WO99/12964) e incorporada aquí en su totalidad; y lo más preferiblemente menos del 95% homóloga de SEQ.ID.NO.:2, secuencia descrita en la solicitud PCT número PCT/US98/19037(WO99/12964) e incorporada aquí en su totalidad. Por "sustancialmente sin reacción cruzada", se entiende que el anticuerpo tiene una afinidad de unión para una proteína no homóloga que es menos del 10%, más preferiblemente menos del 5%, e incluso más preferiblemente menos del 1 %, de la afinidad de unión para una proteína de SEQ.ID.NO.:2, secuencia descrita en solicitud PCT número PCT/US98/19037(WO99/12964) e incorporada aquí en su totalidad.

20 El término anticuerpo como se usa aquí pretende incluir fragmentos suyos que son específicamente reactivos con el ligando BAFF o sus receptores. Los anticuerpos pueden ser fragmentados utilizando técnicas convencionales y los fragmentos explorados respecto a su utilidad de la misma manera que se ha descrito antes para anticuerpos completos. Por ejemplo, fragmentos F(ab')₂ pueden generarse tratando anticuerpos con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. Se pretende que los anticuerpos de esta invención incluyan moléculas bioespecíficas y quiméricas que tengan actividad anti-ligando BAFF o de receptor anti-ligando BAFF. Así, anticuerpos (Ab) monoclonales y policlonales dirigidos contra ligando BAFF, ligando de tumor y sus receptores, y fragmentos de anticuerpos como Fab' y F(ab')₂, pueden usarse para bloquear la acción del ligando y su receptor respectivo.

25 Pueden obtenerse también varias formas de anticuerpos utilizando técnicas de DNA recombinante. Winter y Milstein (1991) Nature 349:293-299. Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos quiméricos en los que el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo animal se enlaza a un dominio constante humano (por ejemplo, Cabilly et al., patente de EE.UU. 4.816.567) Anticuerpos quiméricos pueden reducir las respuestas inmunogénicas elicidas por anticuerpos animales cuando se usan en tratamientos clínicos humanos.

30 Además, pueden sintetizarse "anticuerpos humanizados" recombinantes que reconocen el ligando BAFF o sus receptores. Los anticuerpos humanizados son quimeras que comprenden en su mayor parte secuencias IgG humanas en las que se han insertado las regiones responsables de unión a antígenos específica. Los animales se inmunizan con el antígeno deseado, se aíslan los correspondientes anticuerpos, y se elimina la porción de las secuencias de la región variable responsable de unión a antígeno específica. Las regiones de unión a antígeno derivadas de animales se clonan después en la posición apropiada de genes de anticuerpo humanos en los que las regiones de unión de antígeno se han borrado. Los anticuerpos humanizados minimizan el uso de secuencias heterólogas (es decir, inter especies) en anticuerpos humanos, y así es menos probable que eliciten respuestas inmune en el sujeto tratado.

35 La construcción de diferentes clases de anticuerpos recombinantes puede también llevarse a cabo haciendo anticuerpos quiméricos o humanizados que comprenden dominios variables y dominios constantes humanos (CH1, CH2, CH3) aislados de diferentes clases de inmunoglobulinas. Por ejemplo, anticuerpos con valencias de sitio de unión de antígeno aumentadas pueden ser producidas recombinantemente clonando el sitio de unión de antígeno en vectores que soportan las regiones constantes de cadena humana. Arulanandam et al. (1993). J.Exp. Med., 177:1349-1450.

Además, pueden usarse técnicas de DNA recombinante para alterar las afinidades de unión de anticuerpos recombinantes con sus antígenos alterando los residuos de aminoácidos en la proximidad de los sitios de unión de antígeno. La afinidad de unión de antígeno de un anticuerpo humanizado puede aumentarse por mutagénesis basada en modelación molecular. Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 10029-33.

F. Generación de análogos: producción de secuencias de DNA y péptidos alteradas.

Análogos de ligando BAFF pueden diferir del ligando BAFF presente naturalmente en la secuencia de aminoácidos, o en modos que no implican secuencia, o en ambas cosas. Las modificaciones no de secuencia incluyen derivatización química *in vivo* o *in vitro* del ligando BAFF. Las modificaciones no de secuencia incluyen, pero no se limitan a ello, cambios en acetilación, metilación, fosforilación, carboxilación o glicosilación.

Análogos preferidos incluyen fragmentos biológicamente activos del ligando BAFF, cuyas secuencias difieren de la secuencia dada en SEQ.ID.NO.:2, secuencia descrita en solicitud PCT número PCT/US98/19037(WO99/12964) e incorporada aquí en su totalidad, por una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, o por una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos no conservadoras que no abolen la actividad del ligando BAFF. Las sustituciones conservadoras típicamente incluyen la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y, fenilalanina, tirosina.

G. Materiales y métodos de la invención

El anticuerpo monoclonal anti-Flag M2, anticuerpo anti-Flag M2 biotinilado y el anticuerpo anti-Flag M2 acoplado a agarosa se obtuvieron de Sigma. Los reactivos para el cultivo de células se obtuvieron de Life Sciences (Basilea, Suiza) y Biowhittaker (Walkersville, MD). APRIL humano soluble etiquetado Flag (residuos K₁₁₀-L₂₅₀) se produjo en células 293 como se ha descrito (10, 11) Anticuerpos anti CD19, anti CD8 y anti CD4 etiquetados-FITC se obtuvieron de Pharmingen (San Diego, CA). F(ab')₂ de cabra específico para el fragmento Fc_{5u} de IgM humana se obtuvo de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Anticuerpos secundarios se obtuvieron de Pharmingen o de Jackson ImmunoResearch y se utilizaron a las diluciones recomendadas.

Células 293 T de riñón embrionicas humanas(12) y líneas celulares de fibroblastos (Tabla 1) se mantuvieron en DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado por el calor (FSC) al 10%. Las células 293 de riñón embrionicas humanas se mantuvieron en mezcla de nutriente DMEM F12 (1:1) suplementada con 2% de FCS. Las líneas celulares T, líneas celulares B y líneas celulares macrófagos (Tabla 1) se desarrollaron en RPMI suplementado con FCS al 10%. Las células Molt-4 se cultivaron en un medio de Iscove suplementado con FCS al 10%. Las líneas de células epiteliales se desarrollaron en medio alfa-MEM que contenía FSC al 10%, aminoácidos no esenciales 0,5 mM, Na-Hepes 10mM y piruvato sódico 1 mM. HUVECS se mantuvieron en medio M199 suplementado con FSC al 20%, 100 µg/ml de factor de crecimiento celular epitelial (Collaborative Research, Inotech, Dottikon, Suiza) y 100 µg/ml de sal sódica de heparina (Sigma). Todos los medios contenían los antibióticos penicilina y estreptomycin. Los leucocitos de sangre periférica se aislaron de sangre heparinizada de voluntarios adultos sanos por centrifugación de gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y cultivo en RPMI, FSC al 10%.

Las células T se obtuvieron de PBLs no adherentes por formación de rosetas con glóbulos rojos de oveja tratada con neuraminidasa y se separaron de células sin rosetas (en su mayor parte células B y monocitos) por centrifugación de gradiente de Ficoll-Paque. Las células T purificadas se activaron durante 24 horas con fitohemaglutinina (Sigma) (1 µg/ml), se lavaron y se cultivaron en RPMI, 10% de FSC, 20 U/ml de IL-2. Monocitos CD14⁺ se purificaron por clasificación celular magnética utilizando anticuerpos anti-CD14, microcuentas recubiertas de anti-ratón de cabra y un dispositivo MINImacsTM (Milteyi Biotech), y se cultivaron en la presencia de GM-CSF (800 U/ml), Leucomax®, Essex CEIME, Lucerna, Suiza) e IL-4 (320 ng/ml, Lucerna Chem, Lucerna, Suiza) durante 5 días después con GM-CSF, IL-4 y TNF (200 U/ml, Bender, Viena, Austria) durante 3 días adicionales para obtener una CD83⁺, población similar a células dendríticas. Células humanas B de pureza >97% se aislaron de sangre periférica o sangre de cordón umbilical utilizando cuentas magnéticas antiCD19 (M450, Dynal, Oslo Noruega) como se ha descrito (13).

-Análisis Northern Blot

El análisis Northern Blot se llevó a cabo utilizando Northern Blots I y II de Tejido Múltiple Humano (Clontech n°7760 y n°7759-1). Las membranas se incubaron en solución de hibridación (50% formamida, 2,5 x Denhardt's, 0,2% SDS, EDTA 10 mM, 2xSSC, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,5, 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonificado) durante 2 horas a 60°C. La sonda RNA antisentido que contenía los nucleótidos correspondientes a aminoácidos 136-285 de hBAFF se desnaturalizó por el calor y se añadió a 2x10⁶ cpm/ml en solución de hibridación reciente. La membrana se hibridó 16 horas a 62°C, se lavó una vez en 2xSSC, 0,05% SDS (30 minutos a 25°C), una vez en 0,1xSSC, o,1% SDS (20 minutos a 65°C) y se expuso a -70°C a películas de rayos X.

-Caracterización de cDNA de BAFF

Una secuencia parcial de cDNA de BAFF humano estaba contenida en varios clones EST (números de entrada del Bank Gen T87299 y AA166695) derivados de hígado y bazo fetales y bibliotecas de cáncer de ovarios. La porción 5' del cDNA se obtuvo por 5'RACE-PCR (Maratón-Ready cDNA, CLonotech, Palo Alto, CA) amplificación con oligonucleótidos AP1 y JT1013 (5'-ACTGTTTCTTCTGGACCCTGAACGGC-3') utilizando la biblioteca proporcionada cDNA de una reserva de leucocitos humanos como modelo, recomendado por el fabricante. El producto PCR resultante se clonó en PCR-0 romo (Invitrogen NV Leek, Holand) y se subclonó como fragmento EcoRI/PstI en vector PAC pT7T3 (Pharmacia) que contenía clon EST T87299. El cDNA de hBAFF de longitud total se obtuvo por consiguiendo combinando fragmentos 5' y 3' utilizando el sitio PstI interno de BAFF. A la secuencia se le ha asignado el número de entrada del GenBank AF116456.

Una secuencia de 617 bp parcial de BAFF murino estaba contenida en dos clones EST que se solapan (AA422749 y AA254047). Un fragmento PCR que abarca nucleótidos 158 a 391 de esta secuencia se usó como una sonda para explorar la biblioteca de cDNA de bazo de ratón (Stratagene, La Jolla, CA).

-Expresión de BAFF recombinante

hBAFF de longitud completa se amplificó utilizando JT1069 (5'GACAAGCTTGCCACCATGGATGACTCCACA-3') y JT637 (5'-ACTAGTCACAGCAGTTTCAATGC-3'). El producto PCR se clonó en PCR-O romo y se resubclonó como fragmento HindIII/EcoRI en vector de expresión de mamífero PCR-3. Una versión corta de BAFF soluble (aminoácidos Q136-L285) se amplificó utilizando oligos JT636 (5' CTGCAGGGTCCAGAAGAAACAG-3') y JT637. Una versión larga de BAFF soluble (aalL83-L285) se obtuvo de BAFF de longitud completa utilizando sitio PstI interno. Baffs solubles se resubclonaron como fragmentos PSTI/EcoRI detrás del péptido señal de hemaglutinina y la secuencia Flag de un vector PCR-3 modificado, y como fragmentos PstI/Spel en un vector de expresión bacteriana pQE16 modificado en armazón con una secuencia Flag N-terminal (14). Los constructos se secuenciaron en ambas hebras. El establecimiento de líneas de células 293 que expresan la forma corta soluble de BAFF de longitud completa, y la expresión y purificación de BAFF soluble recombinante de células 293 de bacterias y de mamíferos se llevó a cabo como se ha descrito (14,15).

-PCR de transcriptasa inversa

El RNA total extraído de células T, células B, células dendríticas no maduras derivadas *in vitro*, células 293 wt y 293-BAFF (longitud completa) fue transcrito inversamente utilizando el sistema Ready to Go (Pharmacia) según las instrucciones de los fabricantes. cDNAs de BAFF y β -actina se detectaron por amplificación de PCR con Taq DNA polimerasa (etapas de 1 minuto a 94 °C, 55°C y 72°C durante 30 ciclos) utilizando oligonucleótidos específicos: para BAFF, JT1322 5'-GGAGAAGGCAACTCCAGTCAGAAC-3' Y JT1323 5'CAATTCATCCCCAAAGACATGGAC-3'; para una cadena alfa receptora IL-2, JT1368 5'-TCGGAACACAACGAAACAAGTC-3' y JT1369 5'CTTCTCCTTCACCTGGAACTGACTG-3'; para β -actina, 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3' y 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'.

-Cromatografía de permeación a través de gel

Células 293T se sometieron a transfección transitoriamente con la forma corta de BAFF soluble y se desarrollaron en medio Optimem libre de suero durante 7 días. Los sobrenadantes condicionados se concentraron 20 veces, se mezclaron con estándares internos de catalasa y ovoalbúmina, y se cargaron sobre una columna de Superdex-200 HR10/30. Las proteínas se eluyeron en PBS a 0,5 ml/minuto y las fracciones (0,25 ml) se precipitaron con ácido tricloroacético y se analizaron por Western blotting utilizando anticuerpo anti-Flag M2. La columna se calibró con proteínas estándar: ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 Dka), quimotripsinógeno a (25 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa).

-Tratamiento con PNGasa F

Las muestras se calentaron en 20 μ l de SDS al 0,5%, 2-mercaptoetanol al 1% durante 3 minutos a 95°C, después se enfriaron y se suplementaron con Nonidet P-40 al 10%(2 μ l), fosfato sódico 0,5 M, pH 7,5 (2 μ l) y Péptido N-glicanasa F (125 unidades/ μ l, o sin enzima en controles). Las muestras se incubaron durante 3 horas a 37°C antes del análisis por Western blotting.

-Secuenciación EDMAN.

Células 293 T se trasfeccionaron transitoriamente con la forma larga de BAFF soluble y se desarrollaron en medio Optimem libre de suero durante 7 días. Sobrenadantes condicionados se concentraron 20 veces, se fraccionaron por SDS-PAGE y se mancharon sobre membrana de difluoruro de polivinilideno (BioRad Labs, Hercules, CA) como se ha descrito previamente (16) y después se secuenciaron utilizando un secuenciador de fase gaseosa (ABI 120A, Perkin Elmer, Foster City, CA) acoplado a un analizador (ABI 120A, Perkin Elmer) equipado con una columna de feniltiohidantoína C18 2,1x250 mm. Los datos se analizaron utilizando software ABI 610 (Perkin Elmer).

-Anticuerpos

5 Anticuerpos policlonales se generaron inmunizando conejos (Eurogentec, Seraing, Bélgica) con BAFF soluble recombinante. Bazo de ratas inmunizadas con el mismo antígeno se fusionaron a células de mieloma de ratón x63Ag8.653, y el hibridoma se exploró respecto a IgGs específicos de BAFF. Uno de estos anticuerpos monoclonales, 43,9, es un IgG2A que reconoce específicamente hBAFF.

10 Las células se tiñeron en 50 μ l de tampón FACS (PBS, 10% de FCS, 0,02% NaN_3) con 50 ng (o la cantidad indicada) de hBAFF soluble corto etiquetado Flag durante 20 minutos a 4°C, seguido por antiFlag M2 (1 μ g) y anticuerpo secundario. Anti-BAFF mAB 43,9 se usó a 40 μ g/ml. Para análisis FACS de dos colores, linfocitos de sangre periférica se tiñeron con BAFF soluble etiquetado Flag/largo (2 μ g/ml), seguido por estreptavidina biotinilada anti-Flag M2 (1/400) y etiquetada PE, seguido de anti CD4, anti CD8 o anti CD19 etiquetados FITC.

15 -Ensayo de proliferación de PBL

20 Leucocitos de sangre periférica se incubaron en placas de 96 pocillos (10^5 células /pocillo en 100 μ l de RPMI suplementado con FCS al 10%) durante 72 horas en la presencia o ausencia de 2 μ g/ml de anticuerpo de cadena antihumana μ de cabra (Sigma) o control F(ab')₂ y con la concentración indicada de BAFF/largo soluble nativo o hervido. Las células se pulsaron durante 6 horas adicionales con [³H]timidina (1 μ Ci/pocillo) y se recogieron. La incorporación de [³H]timidina se controló por recuento de centelleo líquido. En algunos experimentos, el BAFF soluble recombinante se sustituyó por células 293 establemente transfeccionadas con BAFF de longitud completa (o 293 wt como control) que se ha fijado durante 5 minutos a 25°C en paraformaldehído al 1%. El ensayo se realizó como se ha descrito (17). En experimentos adicionales, células CD19⁺ fueron aisladas para formar PBL con cuentas magnéticas y las células CD10 remanentes se irradiaron (3.000 rads) antes de reconstitución con células CD19⁺. El ensayo de proliferación con sBAFF se realizó entonces como se ha descrito antes.

-Ensayo de activación de célula B

30 Células B purificadas se activaron en el sistema de cultivo EL-4 como se ha descrito (13). Brevemente, 10^4 células B mezcladas con 5×10^4 células timoma EL-4 murinas irradiadas (clon B5) se cultivaron durante 5-6 días en 200 μ l de un medio que contenía 5% v/v de sobrenadantes de cultivo de células humanas T (10^6 /ml) que se han activado durante 48 horas con PHA (1 μ g/ml) y PMA (1 ng/ml). Las células B se reaislaron con cuentas antiCD 19 y se cultivaron durante otros 7 días (5×10^4 células en 200 μ l, cultivo duplicado o triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano) en un medio solo o en medio suplementado con 5% de sobrenadantes de células T, o con 50 ng/ml de IL-4 e IL-10 (Peprotech, Londres, Reino Unido), en la presencia o ausencia de sBAFF. El anticuerpo anti-Flag M2 se añadió a una concentración de 2 μ g/ml y no tuvo efecto por sí mismo. IgM, IgG e IgA en sobrenadantes de cultivo se cuantificaron por ensayos ELISA como se ha descrito (13).

40 BAFF humano se identificó por homología de secuencia como un posible miembro nuevo de la familia del ligando TNF aunque nosotros exploramos las bases de datos públicas utilizando una búsqueda de perfil mejorada (18). Un cDNA que codifica la proteína completa de 285 aminoácidos (aa) se obtuvo combinando clones EST (que cubre la región 3') con un fragmento (región 5') amplificado por PCR. La ausencia de un péptido señal sugirió que BAFF era una proteína de membrana tipo II que es típica de los miembros de la familia de ligandos TNF. La proteína tiene un dominio citoplásmico predicho de 46 aa, una región transmembrana hidrofóbica, y un dominio extracelular de 218 aa que contiene dos sitios de N-glicosilación potenciales (Fig. 1A). La secuencia del dominio extracelular de BAFF muestra homología más alta con APRIL (33% de identidades de aminoácidos, 48% de homología), mientras que la identidad con otros miembros de la familia como TNF, FasL, LT α , TRAIL o RANHL está por debajo del 20% (Fig 1B, C). El clon cDNA de BAFF de ratón aislado de una biblioteca de bazo codificaba una proteína ligeramente más larga (309 aa) debido a una inserción entre la región transmembrana y la primera de varias hebras β que constituyen el dominio de unión del receptor en todos los miembros ligandos TNF (19). Este ectodominio rico en hebra β es casi idéntico en BAFF humano y de ratón (86% de identidad, 93% de homología) sugiriendo que el gen BAFF se ha conservado enormemente durante la evolución (Fig. 1A).

55 Aunque los miembros de la familia TNF se sintetizan como ligandos insertados en membrana, la ruptura en la región tallo entre transmembrana y el dominio de unión al receptor se observa frecuentemente. Por ejemplo, TNF o FasL se rompen fácilmente de la superficie de la célula por metaloproteinasas (20, 21). Aunque produciendo varias formas de BAFF recombinante en células 293 T, observamos que una forma soluble recombinante 32 kDa de BAFF (aa 83-285, sBAFF/largo), que contiene la región tallo completa y una etiqueta Flag N-terminal en adición al dominio de unión al receptor, era extensamente procesada a un fragmento 18 kDa más pequeño (Fig.2A, B). La ruptura ocurrió en la región tallo ya que el fragmento era detectable solamente con anticuerpos surgidos contra el dominio de interacción del receptor completo de BAFF pero no con anticuerpos anti-Flag (datos no mostrados). También se reveló que solamente N124 (localizado en el tallo) pero no N242 (localizado en la entrada de la hoja f- β) estaba glicosilado, ya que la masa molecular del sBAFF/largo no procesado se redujo de 32 kDa a 30 kDa por separación de los carbohidratos N-enlazados con PNGasa F mientras la forma escindida 18 kDa era insensible a este tratamiento.

El análisis de la secuencia de péptidos del fragmento 18kDa ciertamente mostró que la ruptura ocurría entre R133 y A134 (Fig. 1A). R133 está en el extremo de la región polibásica que se conserva entre humano (R-N-K-R) y ratón (R-N-R-R). Para comprobar si la ruptura no era simplemente un artificio de expresión de formas no naturales solubles de BAFF, BAFF de longitud completa unido a la transmembrana se expresó en células 293T (Fig. 2C). El BAFF completo de 32 kDa y algunas especies de masa molecular más alta (probablemente correspondientes a dímeros y trímeros no disociados) se detectaron fácilmente en extractos celulares, pero más del 95% del BAFF se recuperó del sobrenadante correspondía a la forma 18kDa procesada, indicando que BAFF se procesó también cuando se sintetizó como un ligando unido a membrana.

Un BAFF soluble se sometió a ingeniería (Q136-L285, sBAFF/corto) cuya secuencia empezaba 2aa corriente abajo del sitio de procesamiento (Fig. 1B). Como se predijo, la etiqueta Flag unida al N-terminus de esta molécula recombinante no se separó (datos no mostrados), lo que permitió su purificación por una columna de afinidad anti-Flag. Para comprobar su correcto plegamiento, el BAFF/corto purificado se analizó por filtración a través de gel donde la proteína se eluyó a una masa molecular aparente de 55 kDa (Fig.2D). El BAFF/corto se ensambla correctamente en un homotrímero (3x20 kDa) en conformidad con la estructura cuaternaria de otros miembros de la familia TNF (19). Finalmente, sBAFF/largo no procesado se expresó rápidamente en bacterias, indicando que el hecho de la ruptura era específico para las células eucarióticas.

El análisis Northern blotting de BAFF reveló que el mRNA de 2,5kb BAFF era abundante en el bazo y PBLs.(Fig.3A). El timo, corazón, placenta, intestino delgado y el pulmón mostraron expresión débil. Esta distribución restringida sugirió que las células presentes en tejidos linfoides eran la principal fuente de BAFF. Mediante el análisis PCR, encontramos que mRNA de BAFF estaba presente en células T y en células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica pero no en células B (Fig. 3B). Incluso células T sencillas, no estimuladas parecían expresar algún mRNA de BAFF.

Un sitio de secuencia etiquetado (STS, SHGC-36171) se encontró en la base de datos que incluía la secuencia BAFF humana. Este sitio presenta un mapa de cromosoma 13 humano en intervalo 9cM entre los marcadores D13S286 y D13S1315. En el mapa citogenético, este intervalo corresponde a 13q32-34. De los miembros de la familia de ligandos TNF conocidos, solamente RANKL (Trance) se ha localizado en este cromosoma (22) aunque completamente distante de BAFF (13q14). Con el fin de que el ligando ejerza efectos biológicos máximos, es probable que el receptor de BAFF (BAFF-R) se exprese en las mismas células o en células próximas presentes en tejidos linfoides. Utilizando los sBAFF recombinantes como una herramienta para determinar específicamente expresión de BAFF-R por FACS, encontramos ciertamente altos niveles de expresión de receptor en varias líneas de células B como los linfomas Burkitt Raji y BJAB (Fig. 4A, Tabla 1). En contraste, las líneas celulares de células T, origen fibroblástico, epitelial y endotelial eran todas negativas. Un teñido muy débil se observa con la línea de monocitos THP-1 que, sin embargo, podría deberse a unión al receptor Fc. Así, la expresión BAFF-R parece estar restringida a líneas de células B. Las dos líneas de células B de ratón ensayadas fueron negativas utilizando BAFF humano como sonda, aunque se observa unión débil sobre esplenocitos de ratón (datos no mostrados). La presencia de BAFF-R sobre células B se corroboró por análisis de linfocitos del cordón umbilical y de sangre periférica. Mientras las células T CD8⁺ y CD4⁺ carecían de BAFF-R (Fig. 4B y datos no mostrados), se observa abundante teñido sobre células CD19⁺B(Fig. 4A y 4B), que indica que BAFF-R está expresado en todas las células B sanguíneas, incluyendo células naïve y de memoria.

Ya que BAFF se unía a células B derivadas de la sangre, se realizaron experimentos para determinar si el ligando podría suministrar señales estimuladoras o inhibitoras del crecimiento. Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se estimularon con anticuerpos anti-IgM (μ) junto con células 293 fijadas establemente que expresan BAFF superficial (Fig. 5A). Los niveles de incorporación de [³H] timidina inducidos por anti- μ solo no se alteraron por la presencia de células control pero se incrementaron dos veces en la presencia de células transfeccionadas con BAFF (Fig.5B). Una proliferación de PBL dependiente de la dosis se obtuvo también cuando las células transfeccionadas con BAFF se sustituyeron por BAFFs purificadas (Fig.5C), indicando que BAFF no requiere unión a la membrana para ejercer su actividad. En esta prueba experimental, la proliferación inducida por sCD40L requirió concentraciones que superan 1 μ g/ml pero fue menos dependiente de la presencia de anti- μ que la mediada por BAFF (Fig.5D). Cuando las células CD19⁺B purificadas se cocultivaron con PBL CD19⁻ irradiados autólogos, no resultó afectada la coestimulación de proliferación por BAFF, demostrando que la toma de [³H] timidina era debida principalmente a proliferación de células B y no a una estimulación indirecta de otro tipo de célula (datos no mostrados). La proliferación de células B observada en respuesta a BAFF era completamente dependiente de la presencia de anticuerpos anti- μ , indicando que BAFF funcionaba como coestimulador de la proliferación de células B.

Para investigar un posible efecto de BAFF sobre la secreción de inmunoglobulina, células B de cordón umbilical o periféricas purificadas, se preactivaron por cocultivo con células EL-4T en la presencia de una mezcla de citoquinas de sobrenadantes de células T estimuladas por PHAA/PMA (23). Estas células B se reaislaron hasta el 98% de pureza y produjeron un aumento de dos veces en la secreción de Ig durante un cultivo secundario en la presencia de BAFF y citoquinas de células T activadas en comparación con las citoquinas solas. Un efecto muy modesto ocurrió en la ausencia de citoquinas exógenas, y un efecto intermedio se observó en la presencia de citoquinas recombinantes IL-2, IL-4 e IL-10 (Fig. 5E, F):

El análisis bioquímico de BAFF es también coherente con la estructura típica homotrimérica de los miembros de la familia TNF. Entre esta familia de ligandos, BAFF exhibe el nivel más alto de similaridad de secuencia con APRIL que hemos caracterizado recientemente como un ligando que estimula el crecimiento de varias células tumorales (11). A diferencia de TNF y LT β que son dos miembros de familia con homología igualmente alta (identidad del 33%) y cuyos genes están unidos sobre el cromosoma 6, APRIL y BAFF no están agrupados sobre el mismo cromosoma. APRIL está localizado sobre el mismo cromosoma 17 (J.L.B. datos no publicados) mientras que BAFF mapea sobre el brazo distal del cromosoma humano 13 (13q34). En este punto se caracterizaron anomalías en linfomas Burkitt como el segundo defecto más frecuente (24) además de la translocación que incluye el gen myc en el sitio Ig (25). Considerando los altos niveles de expresión de BAFF-R sobre todas las líneas celulares de linfomas analizadas (véase Tabla 1), se sugiere la intrigante posibilidad de que algunos linfomas Burkitt puedan tener expresión Baff desregulada, estimulando así el crecimiento de una manera autocrina.

El papel de los linfocitos B específicos de antígenos durante las diferentes etapas de la respuesta inmune depende enormemente de señales y contactos de células T auxiliares y células que presentan antígenos como las células dendríticas (20). Los linfocitos B reciben primeramente estas señales pronto durante la respuesta inmune cuando interactúan con células T en el borde de los folículos de células B en los tejidos linfoides, conduciendo a su proliferación y diferenciación en células formadoras de anticuerpos de baja afinidad (18). Al mismo tiempo algunas células B específicas de antígenos también migran al folículo de la célula B y contribuyen a la formación de centros germinales, otro sitio de proliferación de célula B, pero también a maduración y generación por afinidad de células B de memoria y células de plasma de alta afinidad (19).

Señales desencadenadas por otro miembro de la superfamilia CD40L de TNF han mostrado ser críticas para la función de los linfocitos B en múltiples etapas de la respuesta inmune dependiente de células T. Sin embargo, varios estudios mostraron claramente que la interacción CD40L/CD40 no justifica toda ayuda a las células B de células T dependiente del contacto. Ciertamente, células T deficientes en CD40L aisladas de ratones o de pacientes knockout con síndrome de hiper IgM unido a X, se ha visto que inducen con éxito la proliferación de células B y su diferenciación en células plasmáticas. Estudios que utilizan anticuerpos de bloqueo contra CD40L mostraron que un subconjunto de células B positivas de IgD superficial aisladas de amígdalas humanas proliferan y se diferencian en respuesta de las células T activadas en una manera independiente de CD40. Otros miembros de la familia de TNF como el TNF unido a membrana y el CD30L también se han mostrado implicados en una estimulación de células B independiente de Ig superficial y de CD40. De modo similar a nuestros resultados con BAFF, se ha visto que las células B deficientes en CD40 pueden estimularse para proliferar y diferenciarse en células plasmáticas por células T auxiliares tanto tiempo como los receptores de Ig superficial se desencadenen al mismo tiempo. BAFF, así como CD30L y CD40L, se expresan por células T pero su originalidad reside en su expresión por células dendríticas así como la ubicación altamente específica de su receptor sobre células B que está en contraste con CD40 CD30 y el receptor de TNF, cuya expresión se ha descrito sobre muchas células diferentes. Esta observación sugiere funciones inducidas por BAFF independientes y específicas sobre células B.

En apoyo de un papel para BAFF en el crecimiento de célula B inducido por células dendríticas y por célula T y en la potencial maduración, encontramos que BAFF coestimula la proliferación de células B derivadas de sangre concomitantemente con reticulación de los receptores de células B, y así, independientemente de señalización de CD40. Además, utilizando las células B positivas de CD19 diferenciadas *in vitro* en una célula preplasma/célula B similar a GC (14), observamos un efecto coestimulador de BAFF sobre la secreción de Ig por estas células en presencia de sobrenadante de células T activadas o una mezcla de IL-2, IL-4 e IL-10. Interesantemente, el efecto coestimulador era más fuerte en presencia del sobrenadante de la célula T activada en comparación con la mezcla de citoquinas, sugiriendo factores solubles adicionales secretados por células T activadas implicadas en producción de anticuerpos que pueden sinergizar con BAFF o BAFF adicional mismo. Es, por consiguiente, posible que BAFF contribuya activamente a la diferenciación de estas células B similares a GC en el plasma.

Está claro que BAFF puede señalar en células B naive y en células B entregadas a GC *in vitro*. Si esta observación se trasladará o no durante una respuesta inmune normal tendrá que confirmarse por apropiados experimentos *in vivo*.

Las respuestas biológicas inducidas en células B por BAFF son distintas de CD40L, ya que la proliferación desencadenada por CD40L era menos dependiente de un coestímulo anti- μ (17) (y Fig.5D). Además, CD40L puede contrarrestar señales apoptóticas en células B después del enganche del receptor de células B (29), mientras que BAFF no era capaz de rescatar la línea de células B Ramos de apoptosis mediada por anti- μ , a pesar del hecho de que las células Ramos expresan BAFF-R (Tabla 1; F.M. y J.L.B., observaciones no publicadas). Es probable, por consiguiente, que CD40L y BAFF satisfagan funciones distintas. A este respecto, es notable que BAFF no interactúa con ninguno de los 16 receptores recombinantes de la familia TNF ensayados, incluyendo CD40 (P.S. y J:T., observaciones no publicadas).

El crecimiento de célula B fue eficazmente estimulado con BAFF soluble recombinante que carecía de dominio transmembrana. Esta actividad está en contraste con varios miembros de la familia TNF que son activos solamente como ligandos unidos a membrana como TRAIL, FasL y CD40L. Las formas solubles de estos ligandos tienen escasa actividad biológica que puede ser aumentada por reticulación, por consiguiente imitando el ligando unido a

membrana.(15). En contraste, la reticulación de sBAFF etiquetado Flag con anticuerpos anti-Flag o el uso de BAFF unido a membrana expresado sobre la superficie de células epiteliales no aumentó la actividad mitogénica de BAFF, sugiriendo que puede actuar sistemáticamente como una citoquina secretada, como lo hace TNF. Esto está de acuerdo con la observación de que una secuencia polibásica presente en el tallo de BAFF actuó como un sustrato para una proteasa. Secuencias polibásicas semejantes están también presentes en ubicaciones correspondientes en APRIL y TWEAK y en ambos casos hay evidencia de procesamiento proteolítico (30) (N.H. y J.T., observación no publicada). Aunque la proteasa responsable de la ruptura aún ha de determinarse, es improbable que sea la metaloproteína responsable de la liberación de TNF unido a membrana ya que sus preferencias de secuencia difieren completamente (21). Los motivos multibásicos en BAFF (R-N-K-R), APRIL (R-K-R-R) y Tweak (R-P-R-R) son reminiscentes de la señal de ruptura mínima para furina (R-X-K/R-R), el prototipo de una familia de convertasa de proproteína (31).

La práctica de esta invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, DNA recombinante, química de proteínas, e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Esas técnicas están descritas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, **Molecular Cloning: A Laboratory manual**, 2nd edición. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; **DNA Cloning**, Volúmenes I y II (D.N. Glover, ed.), 1985; **Oligonucleotide Synthesis**, (M. J. Gait, ed.), 1984; **Culture of Animal Cells** (R. I. Freshney, ed.), Alan R. Liss, Inc., 1987; **Immobilized Cells and Enzymes**, IRL Press, 1986; **A Practical Guide to Molecular Cloning** (B. Perbal), 1984; **Methods in Enzymology**, Volúmenes 154 y 155 (Wu et al., eds.), Academic Press, New York; **Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells** (J.H. Miller and M.P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; **Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology** (Mayer and Walker, eds.), Academic Press, London, 1987; **Handbook of Experiment Immunology**, Volúmenes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.), 1986; **Manipulating the Mouse Embryo**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar esta invención, y no deben considerarse como limitadores de ella.

Ejemplos

Los siguientes procedimientos experimentales se utilizaron en los Ejemplos 1-6.

Constructo de DNA para la generación de ratones Tg con BAFF murino

Ambas secuencias de cDNA humano y murino se han descrito previamente (Schneider et al., 1999). Un fragmento de PCR que codifica BAFF murino de longitud completa se generó por RT-PCR. La primera hebra de cDNA se sintetizó de poliA+ de pulmón de ratón (Clontech, Palo Alto, CA) utilizando oligo dT conforme al protocolo del fabricante (GibcoBRL, Grand Island, NY). La reacción de PCR contenía tampón 1 x *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA) dNtps 0,2mM, 10% DMSO, 12,5 pM primeros, 5 unidades de enzima *Pfu* (Stratagene) y los siguientes primeros con sitios de restricción Not1 5'-TAAGAATGCGGCCGCGGAATGGAATGGATGAGTCTGCAAA-3' y 5'-TAAGAATGCGGCCGCGGGATCACGCACTCCAGCAA-3'. El templado se amplificó durante 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 54°C durante 2 minutos y 72°C durante 3 minutos seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C. Esta secuencia corresponde a nucleótidos 214 a 1171 del GenBank archivo AFI 19383. El fragmento PCR se sometió a digestión con Not1 y después se clonó en un vector pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El fragmento que contenía BAFF murino se separó con Xba1 con el fin incluir la secuencia de sitio de adición SV40 poli A. Este fragmento de clonó en un vector basado en pUC donde se añadió la secuencia de promotor. El promotor, un fragmento Bg12Not1 como 1 Kb que contenía el potenciador ApoE humano y el promotor AAT (alfa antitripsina) se purificó del clon plásmido 540B (un regalo de la Dra. Catherine Parker Ponder, Washington University, St Louis, MO). Un fragmento EcoRV/Bg12 se purificó del vector final y se usó para la generación de ratones transgénicos. Los descendientes inyectados de ratones F1 (BDF1) hembra C57Bl/6J x macho DBA/2J se retrocruzaron sobre ratones C57Bl/6. Técnicas de microinyección y generación de ratones transgénicos se han descrito previamente (Mcknights et al., 1983).

Métodos analíticos:

Muestras de suero se sometieron a análisis SDS-PAGE reducido utilizando un gel al 12,5% lineal. El RNA total de hígado de ratón se preparó y procesó para el análisis Northern Blot utilizando un equipo de aislamiento de Promega (Madison, WI) conforme a las directrices del fabricante. MRNA específico de transgén de BAFF se detectó utilizando una sonda que abarca la cola poli A SV40 del constructo transgénico y se obtuvo por digestión del vector pCEP4 modificado con Xba1 y BamH1. La sonda reconoce una banda 1,8-2 Kd correspondiente a mRNA desde el transgén de BAFF. El análisis PCR de DNA de cola de ratones Tg BAFF se realizó utilizando 12,5 pM de los siguientes primeros 5'-GCAGTTTCACAGCGATGTCCT-3' [SEQ. ID. NO.: 21] y 5'-GTCTCCGTTGCGTGAAATCTG-3' [SEQ. ID. NO.: 22] en una reacción que contenía tampón de 1X Taq polimerasa (Stratagene), dNTPs 0,2 nM, 10% de DMSO y 5 unidades de Taq polimerasa (Stratagene). Un 719 bp del transgén se amplificó durante 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 54°C durante 1 minuto y 72°C durante 1,5 minutos, seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C.

La presencia de proteínas en orina de ratón se midió utilizando bandas de reactivo Multistix 10 SG para análisis de orina (Bayer Corporation División, Elkhart, IN).

Análisis Cell-dyn y citofluorométrico (FACS).

Recuentos WBC diferenciales de sangre completa anticoagulada con EDTA reciente se realizaron con un aparato Abbott Cell Dyne 3500 (Chicago, IL). Para el análisis FACS, anticuerpos antirratón de rata marcada con Fluoresceína (FITC), Cychrome, y Phycoerthrin-(PE): anti-B220, anti-CD4, anti-Cd8, anti-CD43, anti-IgM, anti-CD25, anti-CD24, anti-CD38, anti-CD21, anti-CD44, anti-L-selectina y una serie de Ig de hámster anti-Bcl-2/hámster control se obtuvieron de Pharmingen (San Diego, CA). La producción de E. coli recombinante así como BAFF etiquetado Flag de ratón y humano derivado de células de mamífero estaban previamente descritos (Schenider et al., 1999). Todos los anticuerpos se usaron conforma a las especificaciones del fabricante. PBL se purificó de sangre de ratón como sigue: sangre de ratón se recogió en microtubos que contenía EDTA y se diluyó 1/2 con PBS. Quinientos μ l de sangre diluida se aplicaron sobre la parte superior de 1 ml de Ficoll (Celardane, Hornby, Notario, Canadá) en un tubo de vidrio de 4 ml, el gradiente se llevó a cabo a 200 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente y la interfaz que contenía los linfocitos se recogió y se lavó dos veces en PBS antes de tinción con FACS. Los nodos de bazo, médula ósea y linfo mesentérico se molieron en una suspensión celular única en medio RPM (Life Technologies, Inc, Grand Island, NY), y se lavaron en tampón de FACS (PBS suplementado con 2% de suero de ternera fetal (JRH Biosciences, Lenexa, KS). Las células se suspendieron primero en tampón de BAFF suplementado con los siguientes reactivos de bloqueo: 10 μ g/ml de Ig humana (Sandoz, Basilea, Suiza) y 10 μ g/ml de anticuerpo de bloqueo Fc antirratón (Pharmingen) y se incubó 30 minutos en hielo antes de tinción con anticuerpos etiquetados con fluorocromo. Todos los anticuerpos se diluyeron en tampón FACS con el reactivo de bloqueo mencionado antes. Las muestras se analizaron utilizando un citofluorómetro FACScan (Becton Dickinson).

Detección de Ig de ratón total y factores reumatoides en suero de ratón por ensayos ELISA.

Placas ELISA (vidrio Corning, Corning, NY) se revistieron durante la noche a 4°C con una solución de 10 μ g/ml de Ig anti-ratón total de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL), en tampón de bicarbonato de sodio 50 mM de pH 9,6. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,1 % Tween y se bloquearon durante la noche con gelatina al 1% en PBS. Cien μ l/pocillo de diluciones en serie de suero o diluciones estándar se añadieron a las placas durante 30 minutos a 37°C. Después de un último lavado, 3 veces con PBS/0,1 % Tween, la reacción enzimática se desarrolló utilizando una solución de 10 μ g/ml de p-nitrofenilfosfato (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) en dietanolamina al 10%. La reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de NaOH 3N/por pocillo. La densidad óptica se midió a 405 nm utilizando un espectrofotómetro de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Se obtuvieron curvas estándar utilizando Ig de ratón purificada obtenida de Southern Biotechnology Associates. En el caso de detección de factores reumatoides (RF), las placas se revistieron con Ig de cabra normal (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) en lugar de Ig anti-ratón de cabra y la detección de Ig de ratón se llevó a cabo como se ha descrito antes. La detección de isotipos de ratón en el ensayo RF se hizo utilizando IgA, IgM, IgG2A, IgG2b y IgG3 anti ratón de cabra etiquetada AP, así como IgA, IgM, IgG2A, IgG2b y IgG3 de ratón purificado para curvas estándar (Southern Biotechnology Associates Inc.). Todas las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo por análisis de varianza.

Detección de complejos inmunes en circulación y precipitación de crioglobulinas en sueros de ratón.

El ensayo se realizó como se ha descrito previamente (June et al., 1979, Singh Tingle, 1982) con las siguientes modificaciones: placas ELISA (Corning glass) se revistieron durante la noche a 4°C con 5 μ g/ml de C1q humano (Quidel, San Diego, CA) en tampón de bicarbonato sódico 50 mM pH 9,6. Las placas se lavaron tres veces con PBS/0,1% Tween. Cincuenta μ l/pocillo de EDTA 0,3 M se añadieron a las placas más 50 μ l/pocillo de diluciones en serie de suero o soluciones de concentraciones conocidas de un complejo inmune estándar (peroxidasa anti-ratón-peroxidasa) (PAP) de DAKO (Carpintería, CA). Las placas se incubaron 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,1% Tween. Ig de ratón en los complejos inmunes se detectaron usando 100 μ l/pocillo de una solución de 1 μ g/ml de una Ig anti ratón de cabra marcada AP (Southern Biotechnology Associates, Inc.) como se ha descrito antes para ensayos ELISA. Las crioglobulinas se detectaron incubando durante la noche a 4°C suero de ratón diluido 1/15 veces en agua y los precipitados se puntuaron visualmente.

Ensayos de DNA de hebra única (SS) y anti-doble hebra (ds).

Anti-ssDNA se llevó a cabo utilizando placas Plate MaxiSorp inmuno-NUNC (NUNC A/S, Dinamarca). Las placas se revistieron durante la noche a 4°C primeramente con 100 μ g/ml de BSA metilado (Carbochem Corp., La Jolla, CA), después con 50 μ g/ml de DNA de timo de ternera grado I (Sigma, St. Louis, MO). El DNA de timo de ternera se cortó por sonicación y después se sometió a digestión con S1 nucleasa antes del uso. Para el ensayo anti-ssDNA, el DNA se hirvió durante 10 minutos y se enfrió en hielo antes del uso. Después de bloqueo, se añadieron diluciones en serie de las muestras de suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Autoanticuerpos se detectaron con IgG-AP (Sigma) anti-ratón de cabra y se desarrollaron como se describió antes para los ensayos

ELISA. Se obtuvieron curvas estándar utilizando cantidades conocidas de anti-DNA mAb 205, lo que es específico para ss-y dsDNA (Datta et al., 1987).

Inmunoquímica

5 Nodos de bazo y de linfa se congelaron en medio embebedor de O.C.T. (Miles, Elkahrt, IN) y se montaron para seccionarlos con criostato. Secciones de 7-10 μ m de grueso se secaron y se fijaron en acetona. Todas las incubaciones de Ab (10 μ g/ml) se hicieron durante 1 hora a temperatura ambiente en una caja humidificada después de dilución en solución salina A Tris-temponada (TBS-A, Tris 0,05M, NaCl 0,15 M, 0,05% Tween-20 (v/v), 0,25% BSA), se lavaron en TBS-B (Tris 0,05M, NaCl 0,15 M, 0,05% Tween-20) y se fijaron 1 minuto en metanol antes de iniciar la reacción enzimática. Se desarrollaron actividades de peroxidasa (HRP) de rábano picante y fosfatasa alcalina (AP) utilizando el equipo (Sigma) de sustrato de tableta de diaminobencidina (DAB) y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitrotetrazolio azul (BCIP/NBT, Pierce, Rockford, IL), respectivamente. Secciones de tejidos teñidos se fijaron finalmente 5 minutos en metanol y se tiñeron con Giemsa (Fluka, Buchs, Suiza). Anti B220 de rata con anticuerpos marcados con biotina, anti-syndecan-1 así como anti-CD4, anti-CD8 α y anti-CD8 β de rata no marcada se obtuvieron de Pharmingen. Aglutinina de cacahuete marcada con biotina se obtuvo de Vector laboratories (Burlingame, CA). Ig anti-rata de ratón marcada (HRP) y estreptavidina (HRP) se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc y estreptavidina marcada AP de Southern Biotechnology Associates, Inc. En el caso de inmunoquímica sobre tejido de riñón para detectar la deposición de Ig, se usó sección de parafina, sin cera y bloqueada utilizando suero de caballo diluido de Vector (Burlingame, CA), seguido de tinción con Ig anti-ratón de cabra HRP de Jackson Immunoresearch. La detección se llevó a cabo como se ha descrito más arriba.

Ejemplo 1

25 Ratones fundadores transgénicos con BAFF (BAFF Tg) tienen un fenotipo anormal

BAFF murino de longitud completa se expresó en ratones transgénicos utilizando el promotor alfa-1 antitripsina específico con el potenciador APO E. La versión de longitud completa se eligió con la esperanza de que BAFF sería, o bien escindido y actuaría sistemáticamente, o bien sería retenido en una forma de unión a membrana tal que se observarían anomalías específicas de hígado locales posiblemente proporcionando indicaciones funcionales. Obtuvimos 13 ratones fundadores positivos para el transgén BAFF (Tabla 2). Cuatro de estos ratones murieron a temprana edad. Patología de rutina se llevó a cabo sobre ratones 811 y 816 (Tabla 2). No había infección obvia en estos ratones, sin embargo, eran evidentes anomalías cardiovasculares y renales y similares a las descritas para hipertensión grave (Fu, 1995) (Tabla 2). Secciones de tejido de riñón teñidas (H&E) con hematoxilina y eosina, mostraron que a morfología de glomérulos en ese ratón era anormal, mientras que el resto del tejido de riñón parecía normal (datos no mostrados). Muchos ratones fundadores transgénicos con BAFF tenían proteinuria (Tabla 2). La inmunoquímica sobre secciones de tejido congeladas del ratón 816, revelaron una tinción de células B anormal y extensa, y reducida tinción de células T, y esta observación se confirmó en la progenie (véase más abajo, Figura 12).

40 Utilizando el análisis FACS de dos colores, se calculó la relación en 0% de células B positivas B220 sobre % de células T positivas CD4. Esta relación fue dos a siete veces más alta en ratones fundadores Tg BAFF cuando se comparan con ratones BDF1 negativos control (Tabla 2), sugiriendo un incremento de la población celular B en ratones Tg BAFF. Nosotros seleccionamos nueve de estos ratones fundadores para generar nuestras diferentes líneas de ratones transgénicos como se destaca en la Tabla 2. Ninguno de los ratones fundadores Tg BAFF restantes o la progenie derivada mostraron ningún signo de mala salud meses después de la precoz muerte de los fundadores 696, 700, 811 y 816, sugiriendo que estos 4 ratones podrían haber expresado niveles más altos de BAFF que causaron su muerte. La sobreexpresión de BAFF en el hígado de ratones transgénicos se confirmó por análisis de Northern Blot (datos no mostrados). En todos los ratones Tg BAFF examinados histológicamente, los hígados no mostraron anomalías indicando que la sobreexpresión local de BAFF no inducía ningún acontecimiento inmunológico o patológico. Un ensayo ELISA para BAFF murino no está disponible; sin embargo, mostramos que el 2 % de suero de ratones Tg BAFF, pero no de ratones control, bloqueaba la unión de células BAFF etiquetadas Flag solubles de ratón derivadas de células de mamíferos a células BJAB. Además, el 5% de suero de ratones Tg BAFF pero no de ratones control aumentaba la proliferación de células B humanas desde PBL en la presencia de anti- μ (datos no mostrados). Estos datos sugieren que cantidades sustanciales de BAFF soluble están presentes en la sangre de Tg BAFF.

Ejemplo 2

60 Linfocitosis periférica en ratones Tg con BAFF es debida a números de células B elevados

Se encontró que la población de ratones transgénicos tiene más linfocitos en la sangre cuando se compara con compañeros de camada negativos control, alcanzando valores tan altos como 13000 linfocitos/ μ de sangre (Figura 7A). En contraste, el número de granulocitos por μ de sangre en ratones Tg BAFF y ratones control permaneció dentro de límites normales (Figura 7A). Como el análisis FACS, utilizando anticuerpos anti-CD40 y anti-B220, de

células de sangre periférica (PBL) de 18 ratones Tg BAFF suministrados por seis diferentes ratones fundadores, mostró relaciones B/T aumentadas (Figura 7B y 7C), los elevados niveles de linfocitos resultaron de un subconjunto de células B expandidas. De igual modo, utilizando este método, el cálculo de números absolutos de células T que circulan con CD4 reveló una reducción del 50% de este subconjunto de células T en ratones Tg BAFF en comparación con los ratones control, y la misma observación se hizo para el subconjunto de células T CD8 (datos no mostrados). Todas las células B del PBL de ratones Tg BAFF han aumentado la expresión MHC clase II y Bcl-2 en comparación con células B de ratones control (Figura 7D y 7E , respectivamente, indicando algún nivel de activación de célula B en PBL de ratones Tg BAFF. Las células T en la sangre de ratones Tg BAFF no expresaron los marcadores CD69 o CD25 de activación precoz; sin embargo, 40 a 56% de células CD4 o CD8 fueron células T efectoras activadas con un CD44^{hi}, fenotipo L-selectina¹⁰ frente a solamente el 8% al 12% en compañeros de camada control (Figura 7F). Así ratones Tg BAFF claramente muestran señales de linfocitosis de células B y activación de células B global junto con alteraciones de células T.

Ejemplo 3

Compartimentos de células B expandidas están compuestas de células maduras

Para ver si la sobreexpresión de BAFF en los ratones transgénicos estaba afectando al compartimento de células B centralmente en la médula ósea y periféricamente en órganos linfoides secundarios, examinamos por FACS nodos de bazo, de médula ósea, y linfa mesentérica de un total de siete ratones Tg BAFF y siete compañeros de camada control derivados de cuatro ratones fundadores. El compartimento de células B maduras se analizó por tinción con anticuerpos anti-B220 y anti-IgM. Dos ratones Tg BAFF representativos y un compañero de camada control representativo se muestran en la Figura 8. El compartimento de células B maduras (Ig⁺, B220⁺) se incrementó en nodos de bazo y de linfa mesentérica (Figura 8A, paneles de arriba y de abajo, respectivamente). El análisis de células B220⁺/IgM⁺B (Figura 7A, panel medio) o de compartimentos de células proB (CD43⁺/B220⁺) y de célula preB (CD43⁻/B220⁺) en la médula ósea mostraron que ratones Tg BAFF y compañeros de camada control eran similares. Estos datos indicaron que la sobreexpresión de BAFF está afectando la proliferación de células B maduras en la periferia pero no de células B progenitoras en la médula ósea. El análisis por FACS de las subpoblaciones de células B en el bazo, reveló una proporción incrementada de células B de zona marginal (MZ) en ratones Tg BAFF en comparación con los ratones control (Tabla 3). La población de células B foliculares permanece proporcional en ratones Tg BAFF y en ratones control mientras que la fracción de células B recién formadas está ligeramente disminuida en ratones Tg BAFF (Tabla 3). Este resultado también se confirmó en células B esplénicas B220⁺ utilizando anticuerpos anti-CD38 versus anticuerpos anti-CD24 y anticuerpos anti-IgM versus anticuerpos anti-IgD y analizando la población de células B MZ en CD38^{hi}/CD24⁺ y IgM^{hi}/IgD¹⁰ respecto a la población de células B MZ, respectivamente, como se ha descrito previamente (Oliver et al., 1997) (datos no mostrados). El análisis inmunohistoquímico que utiliza un anticuerpo IgM anti- ratón reveló la expansión del área de células B MZ IgM brillante en el bazo de ratones Tg BAFF en comparación con los ratones control (datos no mostrados). Todas las células B esplénicas B220⁺ de Tg BAFF también expresan niveles más altos de MHC clase II (Tabla 3) y Bcl-2 (datos no mostrados) en comparación con células B esplénicas de ratones control, que indican que las células B esplénicas así como las células B de PBL están en un estado activado.

Ejemplo 4

Ratones Tg con BAFF tienen niveles altos de inmunoglobulinas totales, factores reumatoides y complejos inmunes en circulación en su suero

El compartimento de células B aumentado en ratones Tg BAFF sugirió que el nivel de Ig total en la sangre de estos animales podría también incrementarse. SDS-PAGE, análisis de suero de ratones Tg BAFF y compañeros de camada control mostró que las bandas IgG de cadenas pesadas y ligeras eran al menos 10 veces más intensas en 3 de los 4 ratones Tg BAFF en comparación con los sueros control (Figura 9A). De igual modo, una determinación ELISA en los sueros de ratones Tg BAFF muestra niveles de IG total significativamente más altos que los de los ratones control (Figura 9B).

A pesar de los altos niveles vistos por SDS-PAGE, los niveles excesivamente altos de Ig vistos por determinación ELISA en algunos ratones, por ejemplo, 697-5, 816-8-3 y 823-20, nos llevó a sospechar la presencia de factores reumatoides (RF) en los sueros, o anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos sobre el fragmento Fc de IgG (Jefferis, 1995). Estos anticuerpos podrían unirse al Ig anti-ratón de cabra utilizado para revestir las placas ELISA y dar valores erróneamente altos. Las placas ELISA se revistieron con Ig de cabra irrelevante normal y se midió la unión de Ig de Tg BAFF a Ig de cabra normal. La Figura 9C muestra que los sueros de la mayoría de los ratones Tg BAFF contenía Ig que reacciona con Ig de cabra normal, mientras solamente dos de los 19 ratones control mostraba reactividad en el mismo ensayo. Estos RF fueron principalmente de los isotipos IgM, IgA e IgG2A (datos no mostrados).

La presencia de RF puede asociarse con la presencia de altos niveles de complejos inmunes (CLC) y crioglobulina en circulación en la sangre (Jefferis, 1995). Para verificar si los ratones Tg BAFF tienen o no niveles de suero anormales de CIC, se utilizó un ensayo de unión basado en Clq para detectar CIC en los ratones Tg BAFF

analizados antes. Solamente 5 Tg BAFF mostraron niveles significativamente altos de CIC en comparación con los ratones control, sin embargo, estos ratones correspondían a los animales que tienen los niveles más altos de factor reumatoide y de Ig totales (Figura 9D). También observamos formación de precipitados cuando los sueros de ratones Tg BAFF estaban diluidos en agua pero no en los sueros control que indique la presencia de crioglobulina en estos ratones (datos no mostrados). Así, además de hiperplasia de células B, los ratones Tg BAFF presentan hiperglobulinemia asociada con RF y CIC.

Ejemplo 5

Algunos ratones Tg BAFF tienen altos niveles de autoanticuerpos anti DNA de doble hebra (ds) y de hebra única(ss).

Inicialmente, observamos anomalías de riñón reminiscentes de una enfermedad similar al lupus en dos de cuatro ratones fundadores (tabla II). La presencia de autoanticuerpos anti-DNA también se ha descrito en pacientes SLE o el ratón (SNF1) (SWR x NZB) similar a SLE (Datta et al., 1987). Niveles autoanticuerpo anti-ssDNA se detectaron en ratones Tg BAFF que previamente habían mostrado tener el nivel más alto de Ig de suero total (Figura 10 A). Nosotros analizamos el suero de dos ratones Tg BAFF negativos respecto a anticuerpos contra ssDNA (697-5 y 816-1-1) y tres ratones transgénicos que secretan anticuerpos anti-ssDNA (820-14, 816-8-3 y 820-7) para la presencia de anticuerpos anti-dsDNA, en paralelo con cinco compañeros de camada control. Los ratones Tg BAFF también secretaron anti-dsDNA, sin embargo, los niveles de secreción no siempre se correlacionan con los de anticuerpos anti-ssDNA, ya que el suero de ratón Tg BAFF 697-5 que no contenía niveles detectables de anticuerpos anti-ssDNA, era claramente positivo respecto a la presencia de anti-dsDNA (Figura 10B). Por consiguiente, ratones Tg BAFF que muestran la hiperglobulinemia más grave secretan niveles patológicos de autoanticuerpos anti-DNA. Adicionalmente, y también reminiscente de un problema similar al lupus en estos ratones detectamos deposición de inmunoglobulina en el riñón de seis Tg BAFF analizados (Figura 10 C), tres de estos ratones no secretaron niveles detectables de anticuerpos anti-DNA (datos no mostrados).

Ejemplo 6

Ratones Tg con BAFF tienen folículos de células B ensanchados, numerosos centros germinales, números de células dendríticas reducidos y números de células plasmáticas incrementados tanto en nodos del bazo como de la linfa mesentérica (MLN)

Los ratones Tg BAFF tenían grandes bazos, MLN (datos no mostrados) y pedazos de Peyer (Figura 11). La inmunohistoquímica mostró la presencia de folículos de células B ensanchados y hojas linfoides arteriolas periféricas reducidas (PALS o área de células T) en ratones Tg BAFF (Figura 12B). Es interesante que, se observaron pocos centros germinales en compañeros de camada control no inmunizados (y esto es típico de esta colonia en general) y los presentes eran pequeños (Figura 12 C), mientras que los ratones Tg BAFF poseían numerosos centros germinales en ausencia de inmunización (Figura 12D). La tinción con anti-CD11c para células dendríticas en la zona de células T y en la zona marginal de ratones control (Figura 12E) estaba considerablemente reducida en ratones Tg BAFF (Figura 12F). Las células de plasma Syndecan-1-positivas eran casi indetectables en el bazo de compañeros de camada control (Figura 12G), aunque la pulpa roja de ratones Tg BAFF era fuertemente positiva a Syndecan-1 (Figura 12H). Observaciones muy similares se hicieron para el MLN (Figura 13). En MLN de ratones Tg BAFF las áreas de células B estaban enormemente expandidas (Figura 13B) en contraste con el nodo normal donde los folículos de células B eran fácilmente reconocibles en la periferia del nodo bajo la cápsula con una zona de células T paracortical típica (Figura 13A). La médula de ratones Tg BAFF se llenó con células positivas a syndecan-1 que presumiblemente son células plasmáticas (Figura 13 H). En conclusión, el análisis de órganos linfoides secundarios en ratones Tg BAFF era coherente con el fenotipo de células B expandido que muestra múltiples anomalías celulares e intensa actividad inmune.

Referencias

1. Smith et al. (1994) *Cell* 76:959-962.
2. Vassalli (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452.
- 5 3. De Togni et al. (1994) *Science* 264:703-707.
4. Koni et al. (1997) *Immunity* 6:491-500.
5. Amakawa et al. (1996)
6. Russell et al. (1993)
7. Zheng et al. (1995)
- 10 8. van Kooten and Banchereau (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9:330-337.
9. Stuber and Strober (1996). *J. Exp. Med.* 183:979-989.
10. Schneider et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:18827-18833.
11. Hahne et al. (1998) *J. Exp. Med.* 188:1185-1190.
12. Hahne et al. (1996) *Science* 274:1363-1366.
- 15 13. Grimaire et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27:199-205.
14. Thome et al. (1997) *Nature* 386:517-521.
15. Schneider et al. (1998) *J. Exp. Med.* 187:1205-1213.
16. Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:10035-10038.
17. Armitage et al. (1992) *Nature* 357:80-82.
- 20 18. Bucher et al. (1996) *Computer Chem.* 20:3-24.
19. Banner et al. (1993) *Cell* 73:431-445.
20. Nagata (1997) *Cell* 88:355-365.
21. Black et al. (1997) *Nature* 385:729-733.
22. Wong et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:25190-25194.
- 25 23. Kindler and Zubler. (1997) *J. Immunol.* 159:2085-2090.
24. Sonoki et al. (1995) *Leukemia* 9:2093-2099.
25. Magrath, I. (1990) *Adv Cancer Res* 55:133-270.
26. Garside et al. (1998) *Science* 281:96-99.
27. MacLennan et al. (1997) *Immunol. Rev.* 156:53-66.
- 30 28. Dubois et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185:941-951.
29. Tsubata et al. (1993) *Nature* 364:645-648.
30. Chicheportiche et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:32401-32410.
31. Nakayama (1997) *Biochem. J.* 327:625-635.
32. Jefferis, R. (1995). Rheumatoid factors, B cells and immunoglobulin genes. *Br. Med. Bull.* 51, 312-331.
- 35 33. Schneider et al. (1999) *J. Exp. Med.* 189, 1747-1756.
34. Mcknights et al. (1983) *Cell* 34, 335-341.
35. Datta et al. (1987) *J. Exp. Med.* 165

Tabla I: Expresión de MARCH en diferentes líneas celulares

Tipo de célula	Líneas celulares	Unión de MARCH	Detalles específicos
Similar a epitelial	HT-29	-	adenocarcinoma de colon
	A375	-/+	melanoma
	MCF-7	-	adenocarcinoma de mama
	MB260	-	melanoma
Fibro-blastos	Cos	+	células de riñón de mono
	WI-38	-	pulmón
	H ₃ -68	-	prepucio
	H ₃ -27	-	prepucio
	HUVEC	-	vena umbilical
Líneas de células T	THP-1	-/+	monocitos
	Molt-4	-	leucemia linfoblástica
	Hut-78	-	linfoma cutáneo
Líneas de células B	Jurkat	-	leucemia linfoblástica
	BJAB	+++	linfoma de Burkitt
	Namalawa	++	linfoma de Burkitt
	Daudi	+/-	linfoma de Burkitt EBNA+VCA+
	Ramos	++	linfoma de Burkitt EBV-
	Raji	+++	linfoma de Burkitt
	JYJOYE	+	linfoma de Burkitt
	SKW-64	++	EBV+ que secreta IgM
	RPMI 1788	+++	sangre periférica, secreción de IgM
	IM-9	+++	linfoblasto, secreción de Ig
Líneas celulares de ratón	NC-37	+++	linfoblasto EBV+
	WEHI-231	-	linfoma celular B
	A20	-	linfoma celular B

5 La expresión superficial de MARCH se determinó por FACS utilizando MARCH etiquetado Flag como se describe en Material and Methods

Tabla II de ratones fundadores Tg BAFF

Número de ratones	Proteinuria ^a	B/T ^b
hembra ^d 690	ND	2
macho ^c 696	ND	ND
hembra 697	+++	ND
macho ^c 700	ND	ND
macho 802	++	4,6
hembra 804	+++	5,4
hembra 807	ND	4
macho 810	+++	7,8
macho ^{ce} 811	ND	ND
macho 813	+	5,4
hembra ^{ef} 816	++	ND
macho 820	++	3
macho 823	++	2,9
BDF1 Control hembra	+/-	1,5
BDF1 Control macho	+/-	2,5

^aLa proteinuria se mide utilizando tiras médicas coloreadas sumergidas en orina de ratón y se define como sigue:- no proteinuria, +/- trazas, +(30mg/dl), ++(100mg/dl), +++ (300 mg/dl), ++++(>2000mg/ml).

^bB/T es la relación de % de células B sobre % de células T en PBL determinada por análisis FACS, utilizando anticuerpos anti-B220 marcados PE y anti-CD4 marcados FITC.

^cMuerte temprana

^dNo hay transmisión de transgenes en la progenie

^eAnormalidades cardiovasculares y renales observadas durante la autopsia

^fRatón sacrificado debido a la presencia de sangre en orina. Anormalidades en el riñón, corazón y arterias evidentes después de análisis de secciones teñidas con H&E de todos los tejidos. El aumento de la población de células B esplénicas se determinó por inmunohistoquímica sobre secciones congeladas de bazo utilizando anti-ratón B220 y anti-ratón CD4 marcados con biotina, seguido de de estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina y Ig anti-rata

marcada con peroxidasa de rábano picante.

Ratones fundadores subrayados utilizados para reproducción

ND: no hecho

Tabla 3: Expresión de MHC clase II aumentada sobre células B y proporción ensanchada de células B MZ en el bazo de ratones Tg BAFF.

	Niveles de expresión de MHC clase II sobre células B B220 ⁺ (MFI)	% de células B foliculares (B220 ⁺ /IgM ^{lo} /CD21 ^{int})	% de células B MZ (B220 ⁺ /IgM ^{lo} /CD21 ^{int})	% de células B recién formadas (B220 ⁺ /IgM ^{lo} /CD21 ^{int})
<u>Ratón control</u>				
816-1-10	1170	45	6	12
802-21	1029	48	10,5	9
823-1	1240	39	9	6,5
<u>Ratón</u>				
802-6	1707	49	18	5,9
820-7	1900	39	23	6,3
816-1-1	2088	40	23	5,8

Los esplenocitos se analizaron por FACS y se activaron sobre la población B220⁺.

Se muestra un experimento representativo.

MFI: intensidad de fluorescencia media.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento activo específico para BAFF soluble para uso en el tratamiento de cáncer.
- 5 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el fragmento activo del anticuerpo se selecciona entre un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')².
- 10 4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 15 6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de cáncer, donde el cáncer es linfoma de Burkitt.

A

```

                                     TMD
MARCH 1  L D V T E - R S S R Y T S L E N A T E M C E S Y V H C T A H S P Y V S . S E C L L A P E L L L
MARCH 1  C I C A K T L P P P P C 7 E S E G C H A T E C R O T Y P P - H T O C K I S E M P F E I S E C I L L A A T E I T Z

                                     TMD
MARCH 61  L E T E L V L V S F P O C C L L C H O A S O S H A L L E S H S E K L A G G O S K A G L E K A P A S T A G S
MARCH 67  L E T E L V L V S F P O C C L L C H O E N H C H A L L E S V S A T A G G O S K A G L E K A P A S T A G S

MARCH 115  H L F T F T E S E S T A S G N H H S E S T F L C S L L .....
MARCH 102  H L F T F T E S E S T A S G N H H S E S T F L C S L L E S S V L S E P P A P O L P O S N S O R O S R S S

MARCH 141  . . . H T U E L L A A D C H I F I C A C S I V P L L C O N F I A L L E N C H I N C I C I F I
MARCH 120  L A R H I S P E C I C O D T Y P T I N C I V T S P U L L C A N C H E S E V E R E I N C I C I F I

MARCH 186  V S U V Y E C K Y L A G N G I U R P V W L C D L S V E L P C L U N D S I L P O S L L A C I A
MARCH 220  M S O V E L Y F I L A D G H I O R I Y V H O F C E S T Y V E P R C O U P I K T E P O S L Y C C I C

MARCH 220  N E L C O I L L L P H C H A O I L L D C U Y E S C A L L L L
MARCH 277  L F G C L P O L P A H A D T S H M P O P E C O I L L
    
```

B

```

                                     A           B           C
MARCH 142  V Y P C L O N E T P T I G E S V F P L L F T S A L E S K E . . .
SAPPL 118  K G S Y L I P T I E A T - E C S S V F L O P L N C R G I S S S . . .
STWp  68  S R L L E C T P A S P . . . . . G A G S T E L E A H V L . . .
MFWL  142  E L L E C T P A S P . . . . . S M P A T S D T I V L S Y K V K . . .
M.Yc  88  T L L A I A S P . . . . . S M P A T S D T I V L S Y K V K . . .
M.AMH. 88  K A G E F L A T T V T P P S S N V L L S Y T H R W T X . . .

MARCH 186  S L V Y T S T . . . . . A S H I S E V N V F S E L L L E F R E S V P E L L P .
SAPPL 166  K O L I S E V . . . . . T T S O N Y L E G . . . . . G S G I S F P S K P P R
STWp  168  S C V S S S S P P . . . . . T H L I T T S I T . . . . . S O K N H F A K L P O S T P
MFWL  182  V I L Y P S G . . . . . P P L T Y M S . . . . . K S G V V S S K M P O S T P
M.Yc  110  S L V Y T S T . . . . . T Y P K A T E P F S E P L L S . . . . . P M V T S P S P E L G E
M.AMH. 144  S L V Y T S T . . . . . T Y P K A T E V G S V T E L Y . . . . . K I S N S E S O R S L A W S K G

MARCH 202  . . . . . F           G           H
SAPPL 207  A . . . . . H N D V E F A L E G C I I S A P E N A G S L S S V F A G L L L
STWp  270  E S A K E P F . . . . . S P I C V V Q I E C H A I R I N T V Y P A P S V E L I A
MFWL  228  . . . . . M A A A . . . . . K I T S C H I I S E L S L S P S E G V E C I A
M.Yc  262  . . . . . P L N V M N C A A O I T S C H I I T S S I P N S L S P T V I C O A
M.AMH. 198  E P . . . . . H V I R N G F L E N C L A C C H S T P S L P P R E A - P O C C L L R B I D
    
```

C



Figura 1

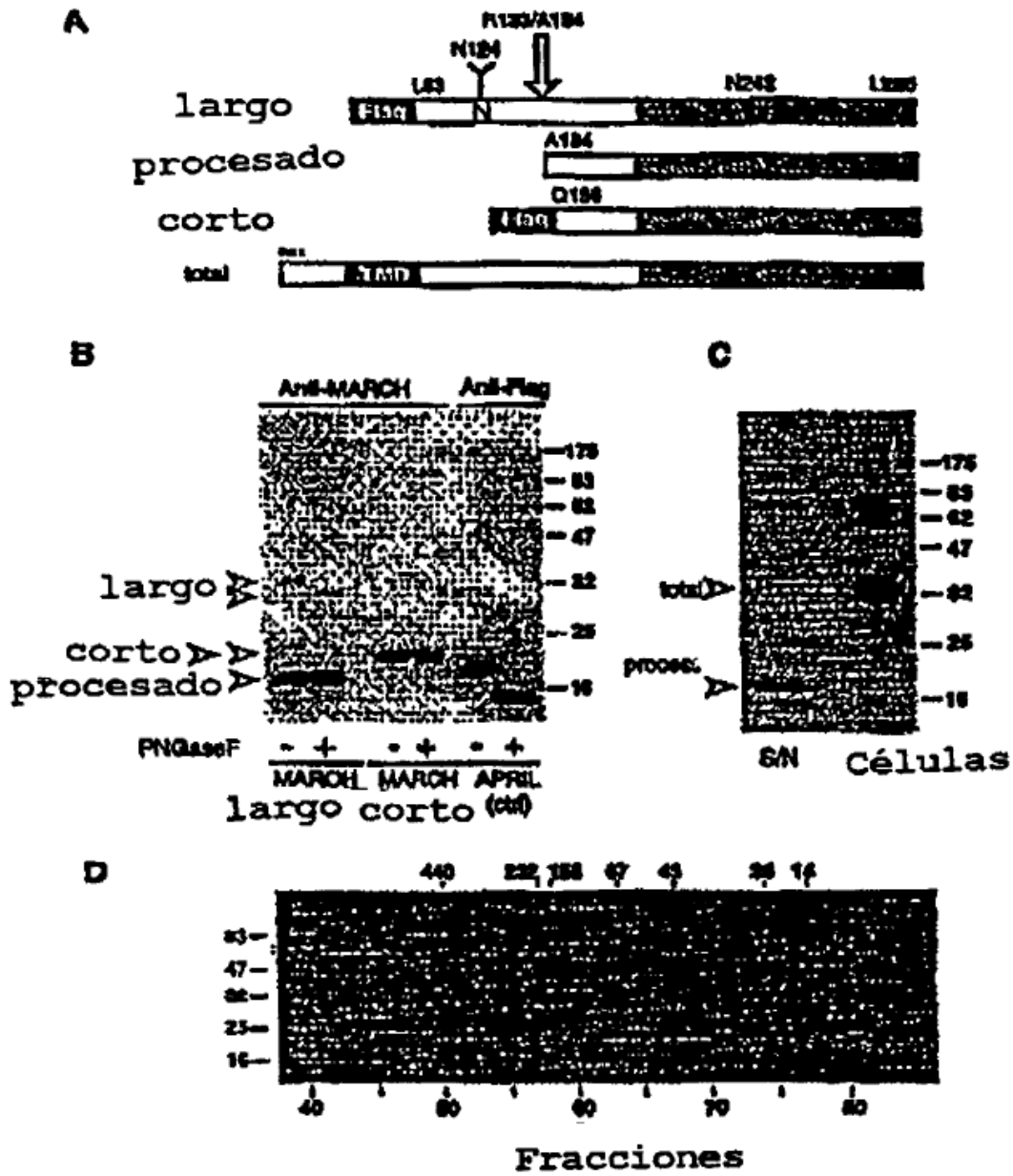


Figura 2

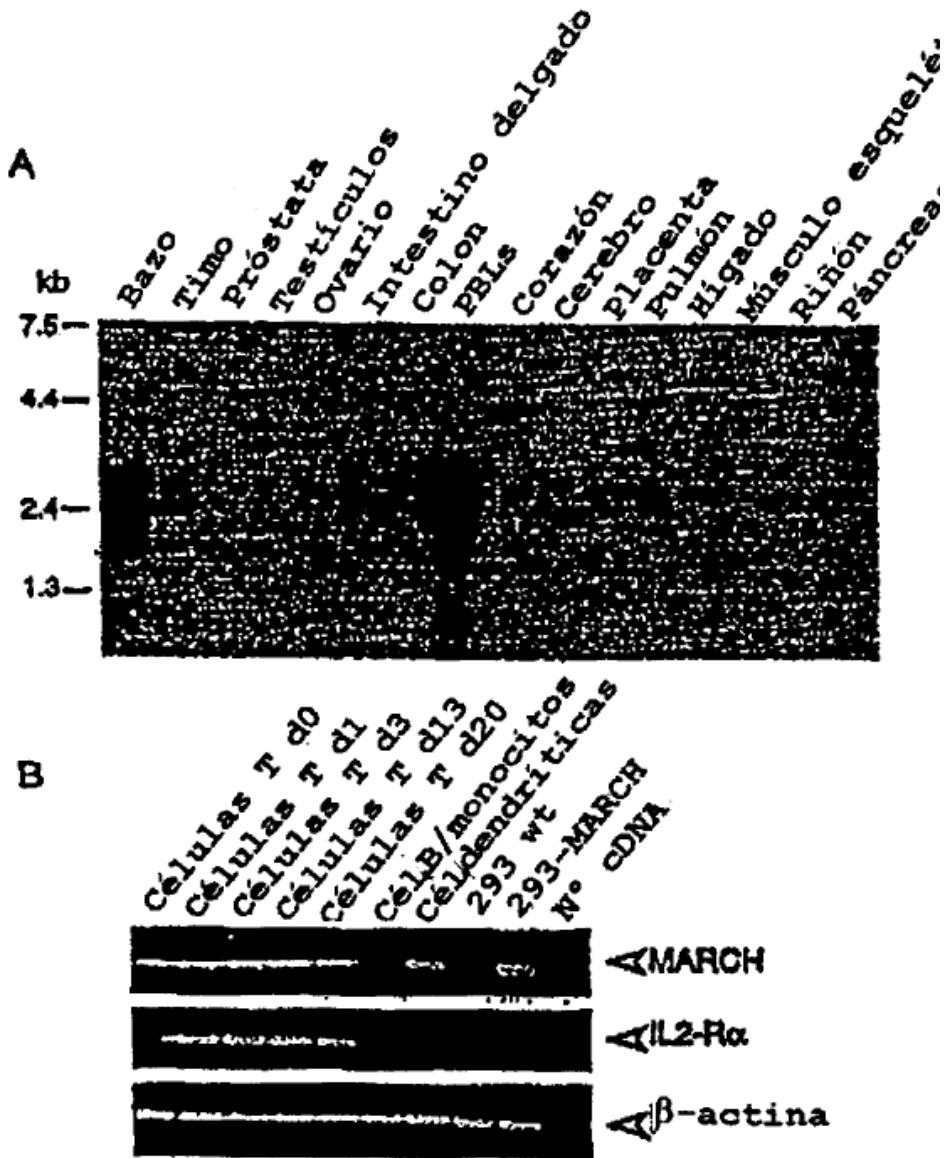


Figura 3

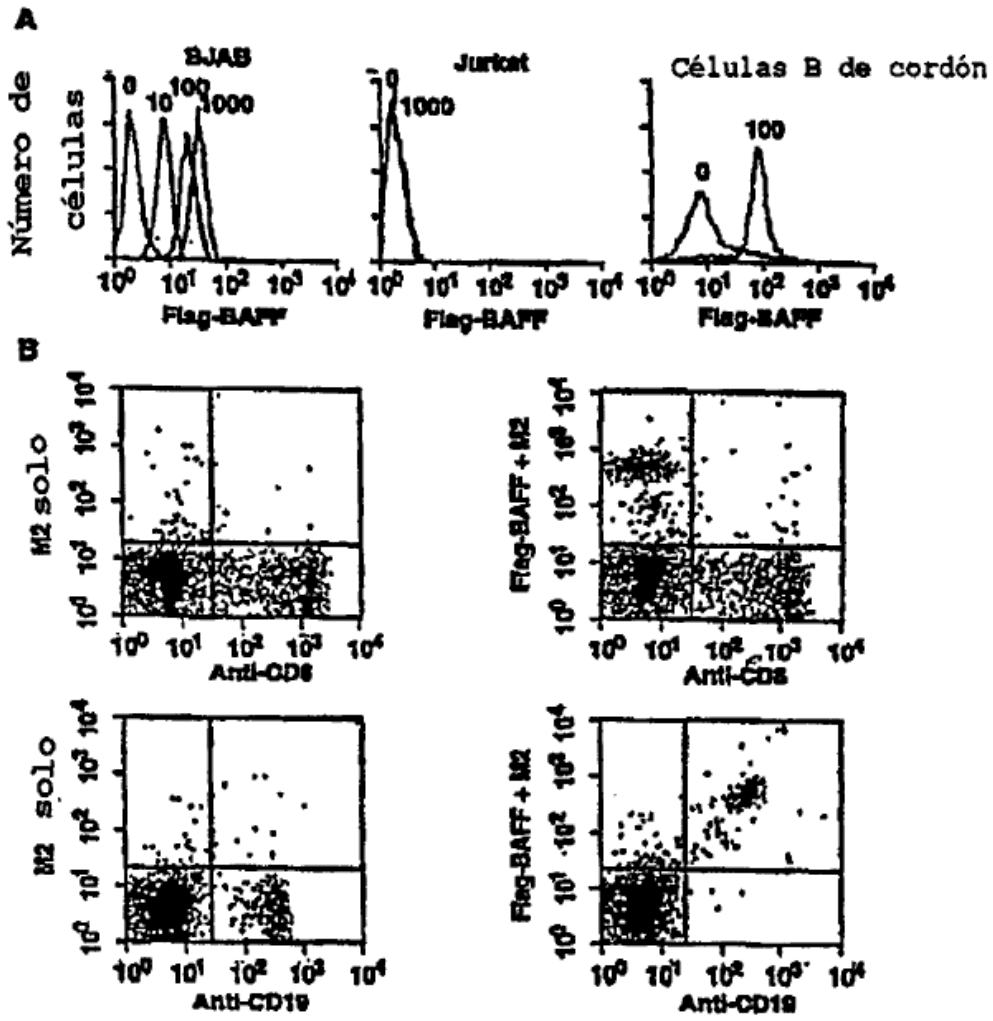


Figura 4

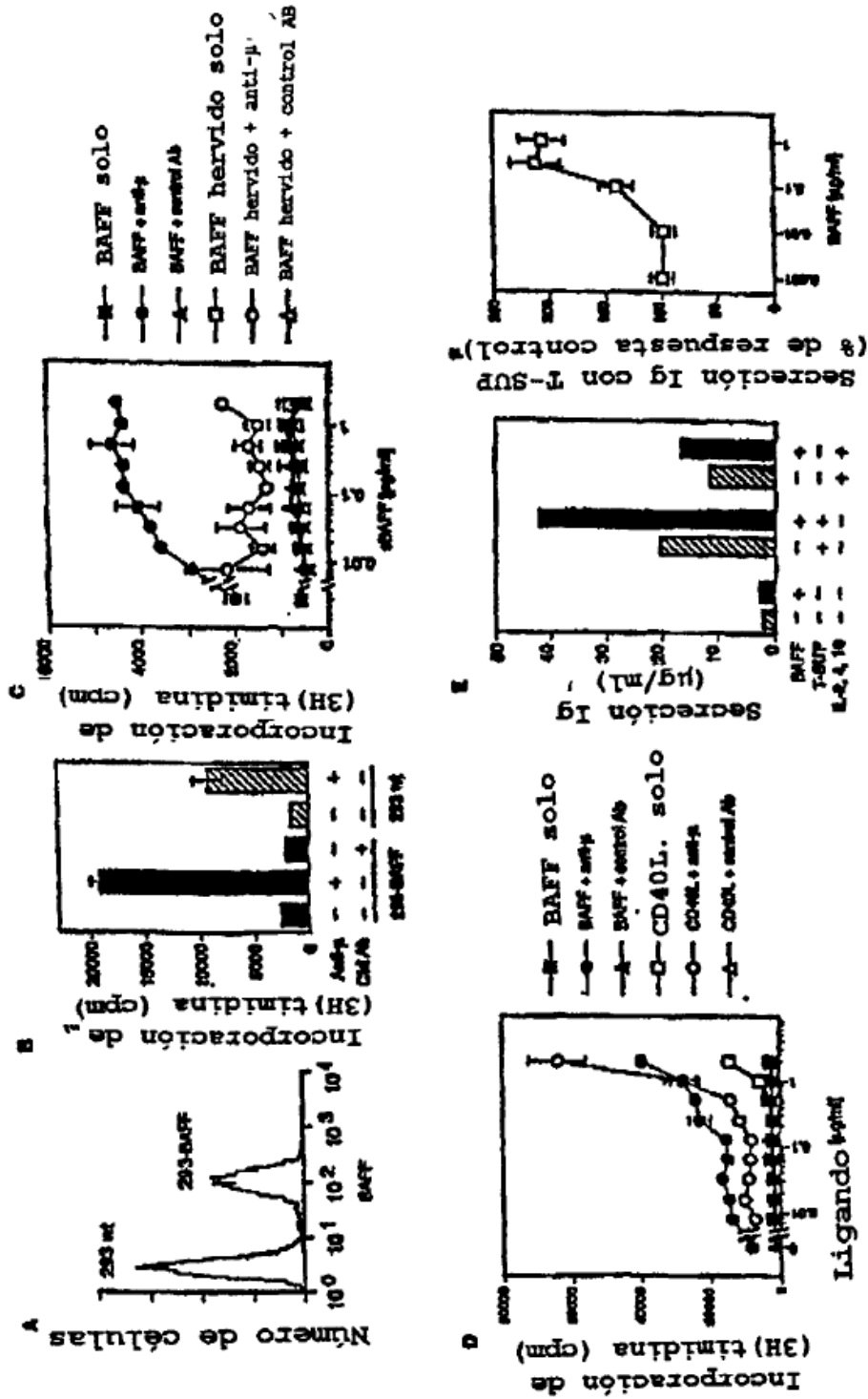


Figura 5

BAFF Actúa como un cofactor para proliferación de células B

Proliferación de PBL humano

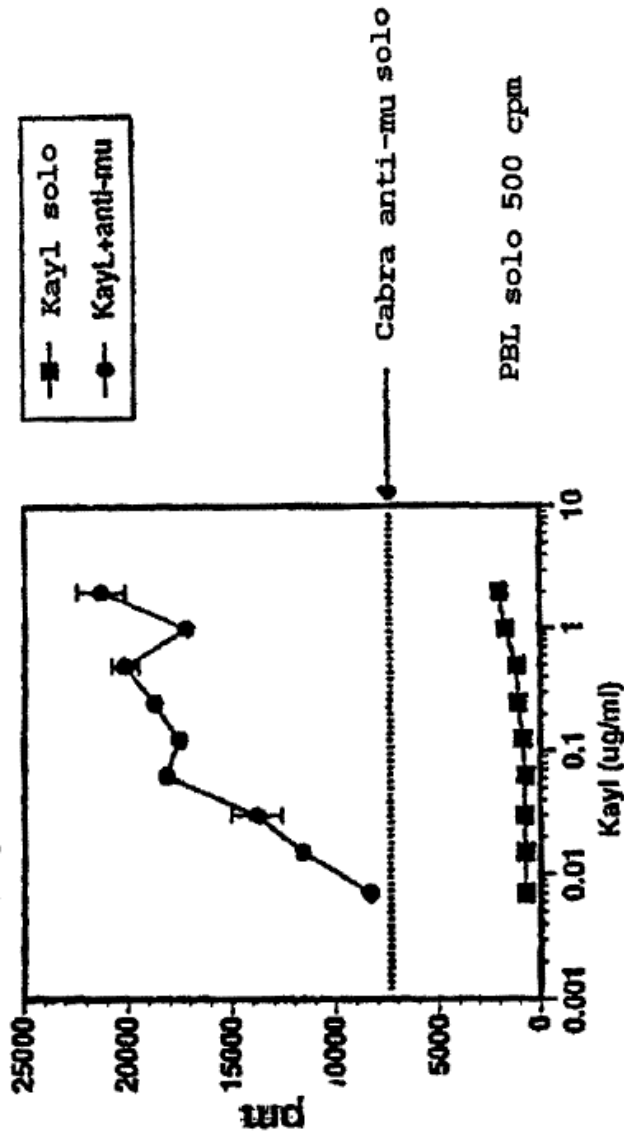


Figura 6

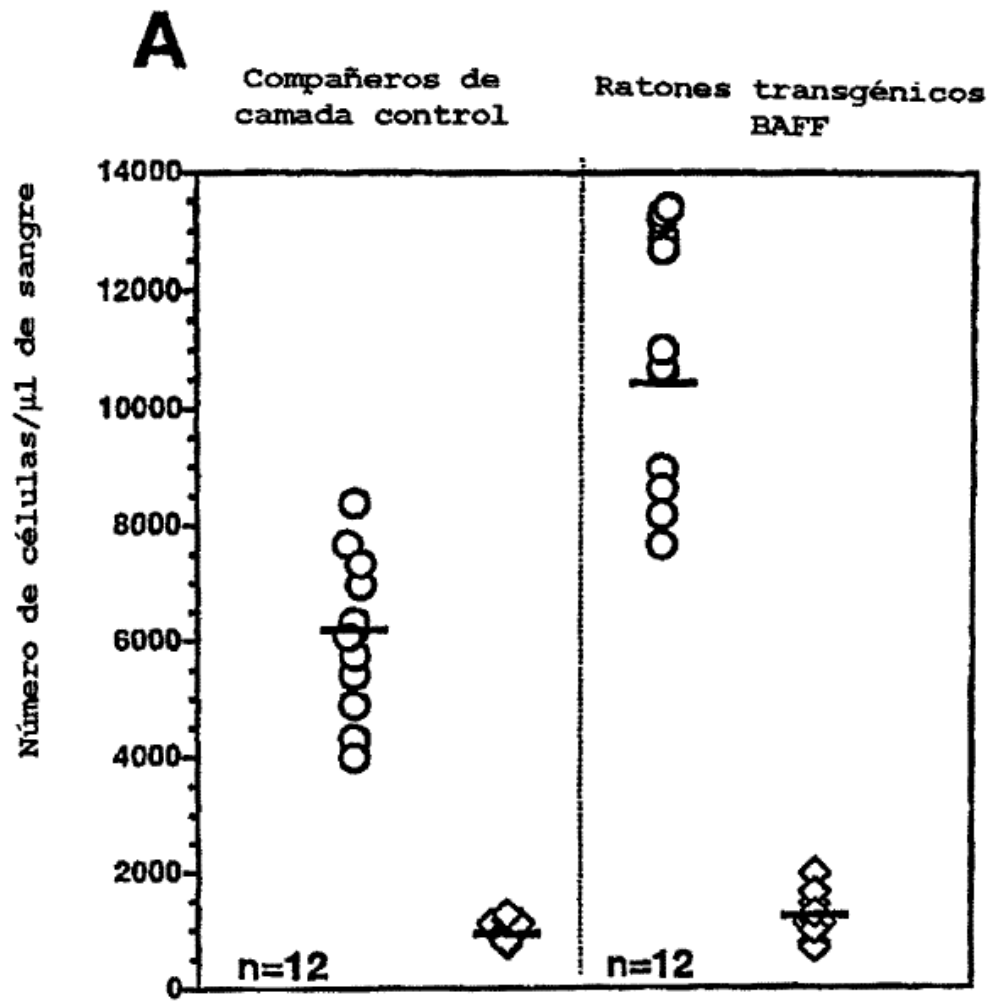


Figura 7A

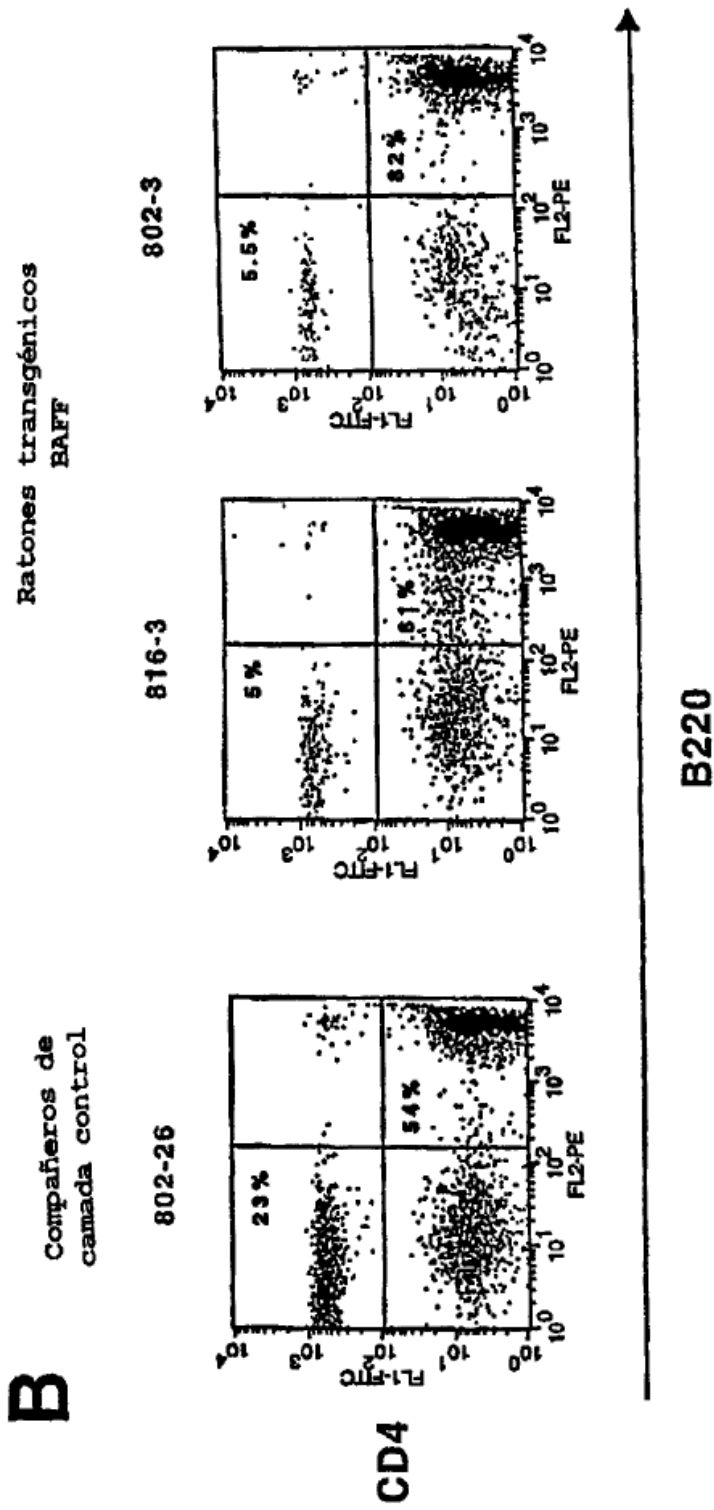


Figura 7B

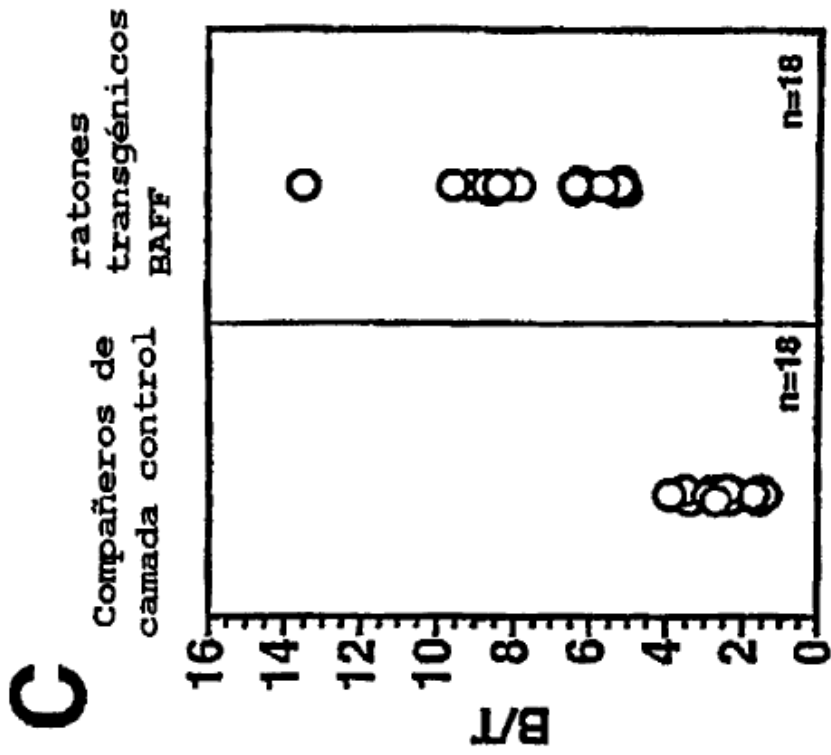


Figura 7C

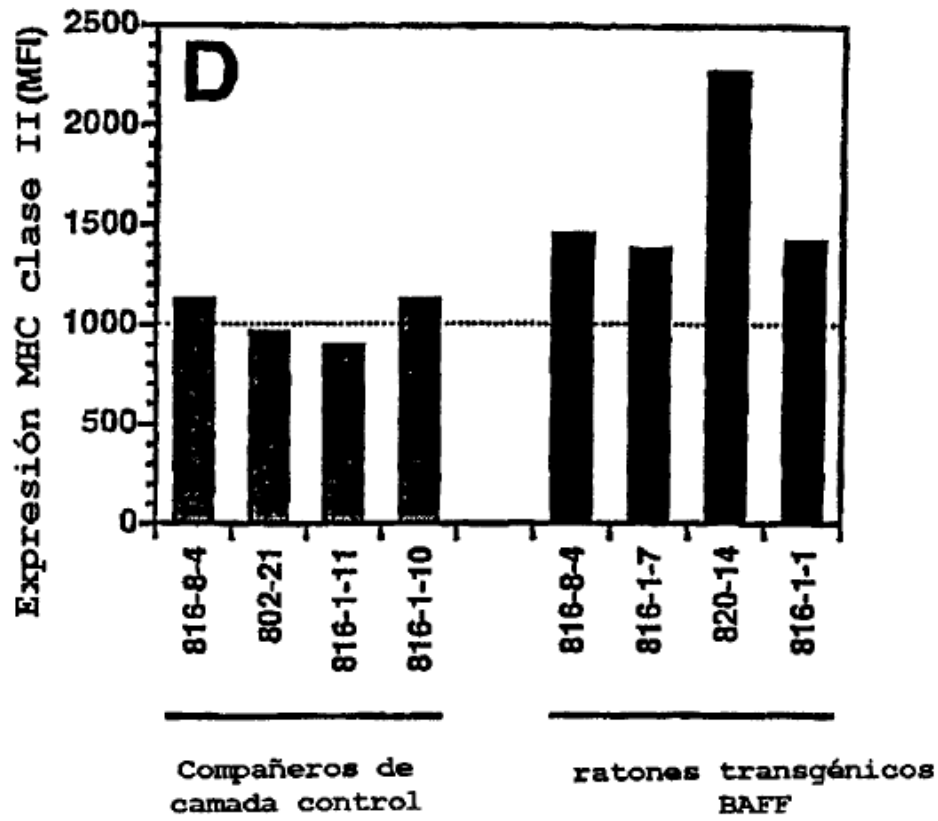


Figura 7D

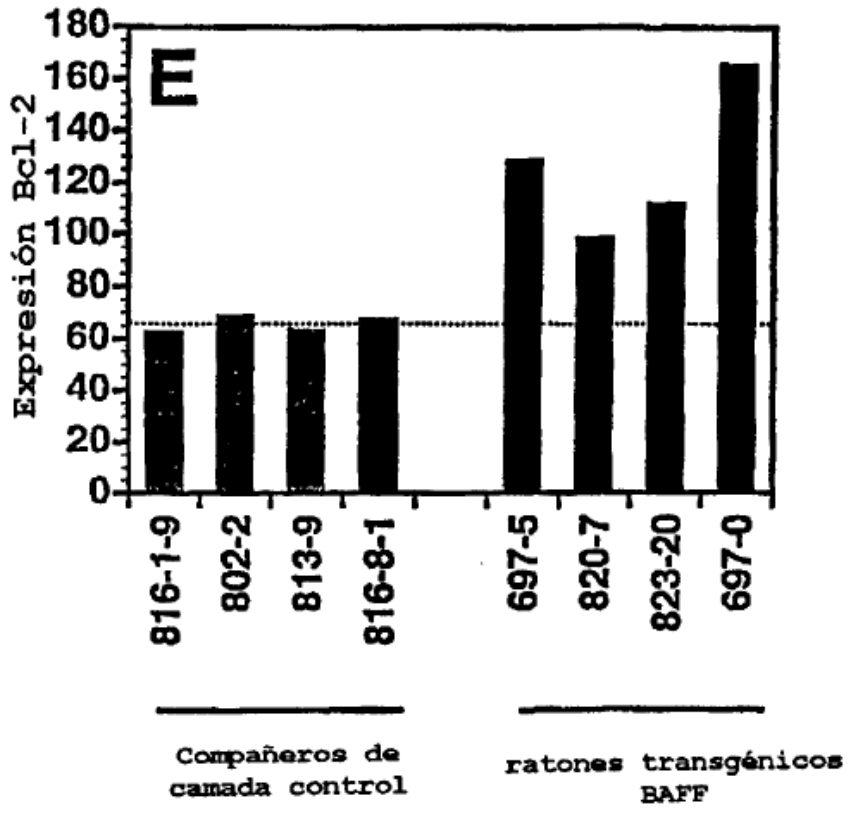


Figura 7E

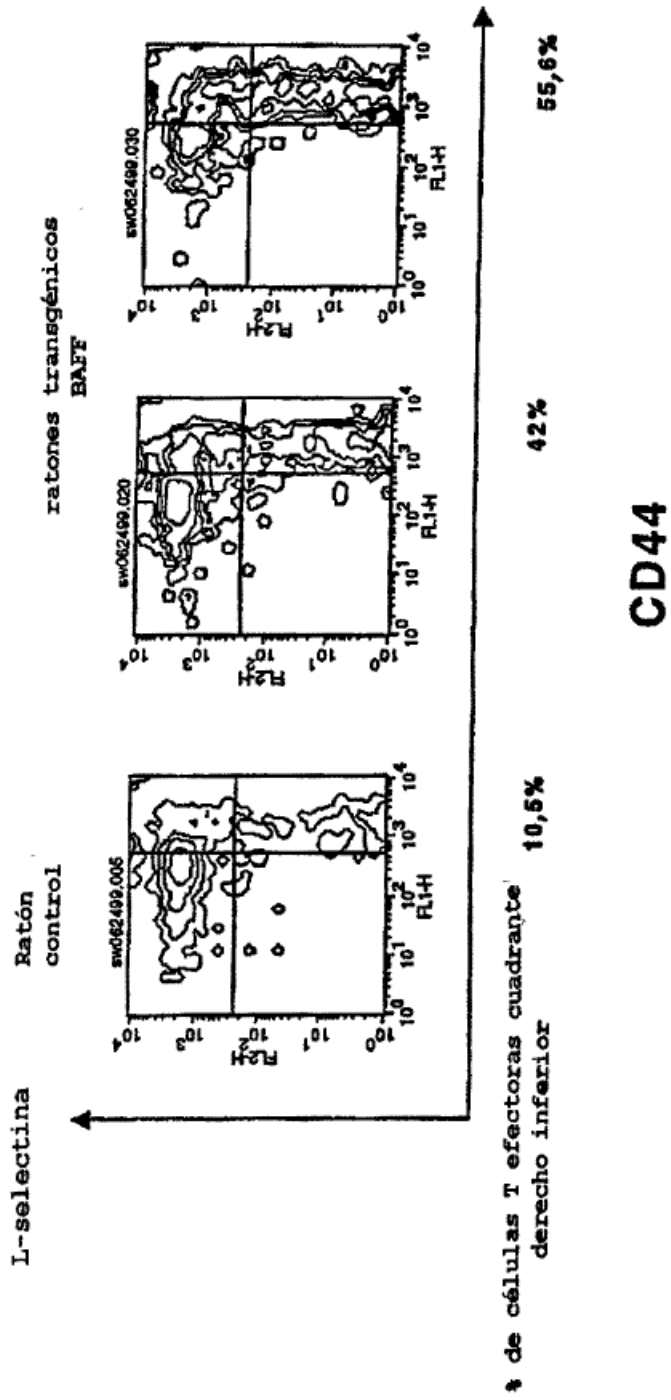


Figura 7F

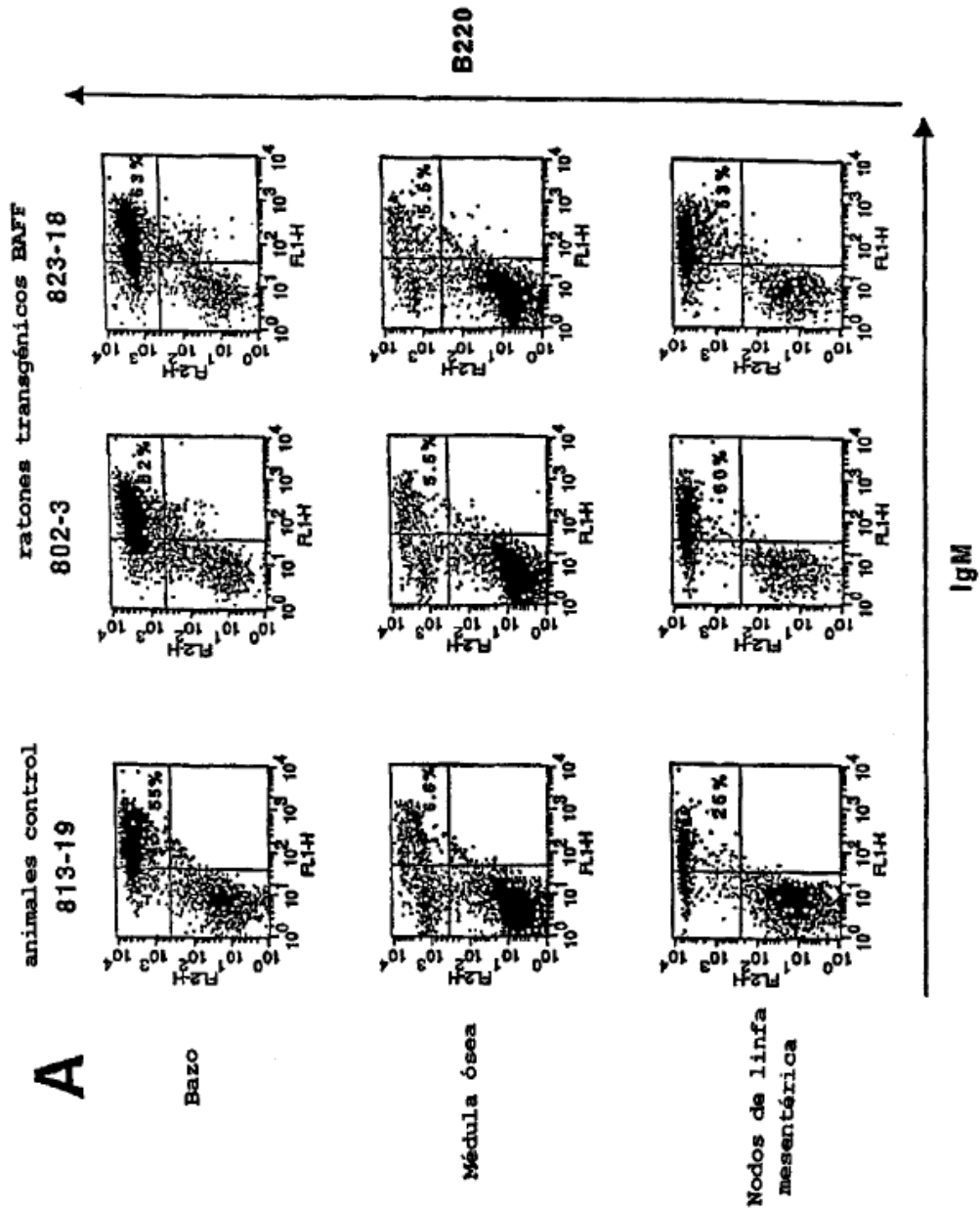


Figura 8A

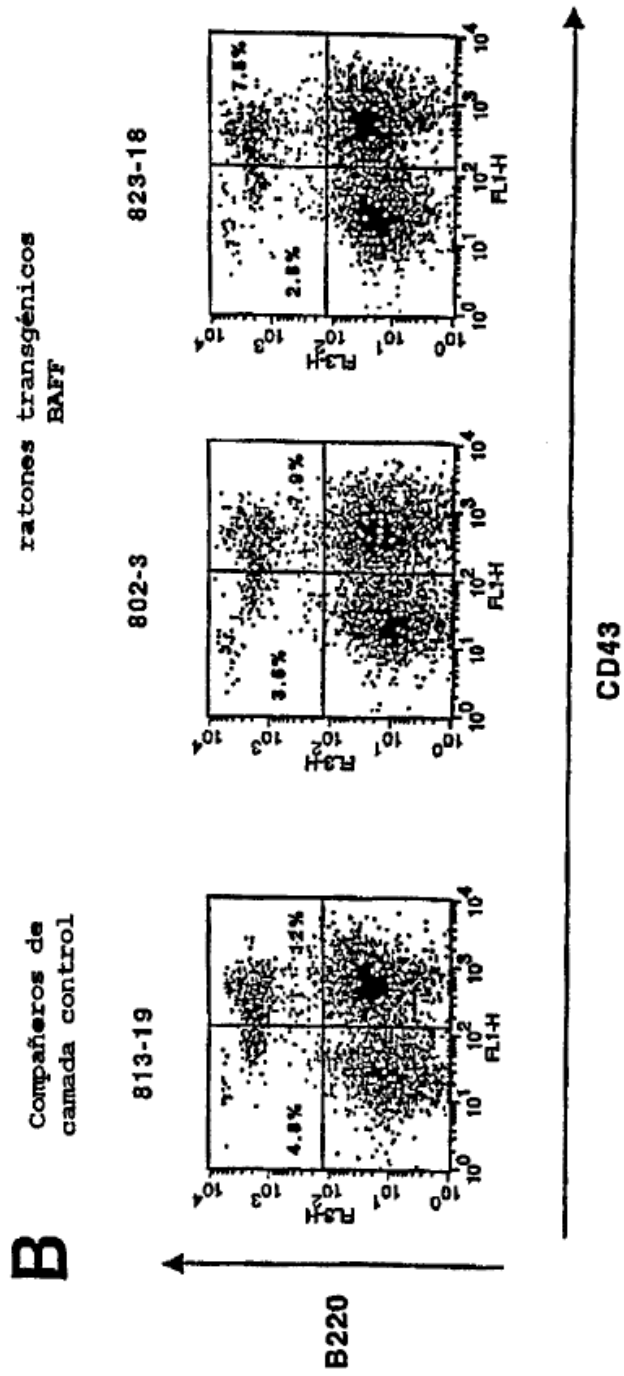


Figura 8B

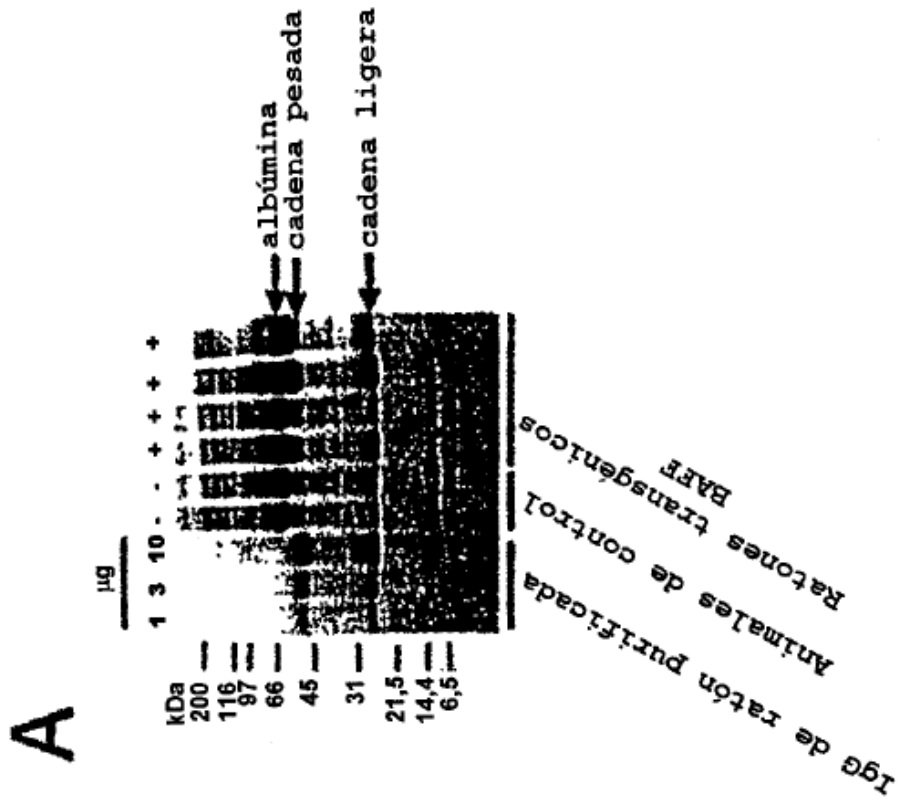


Figura 9A

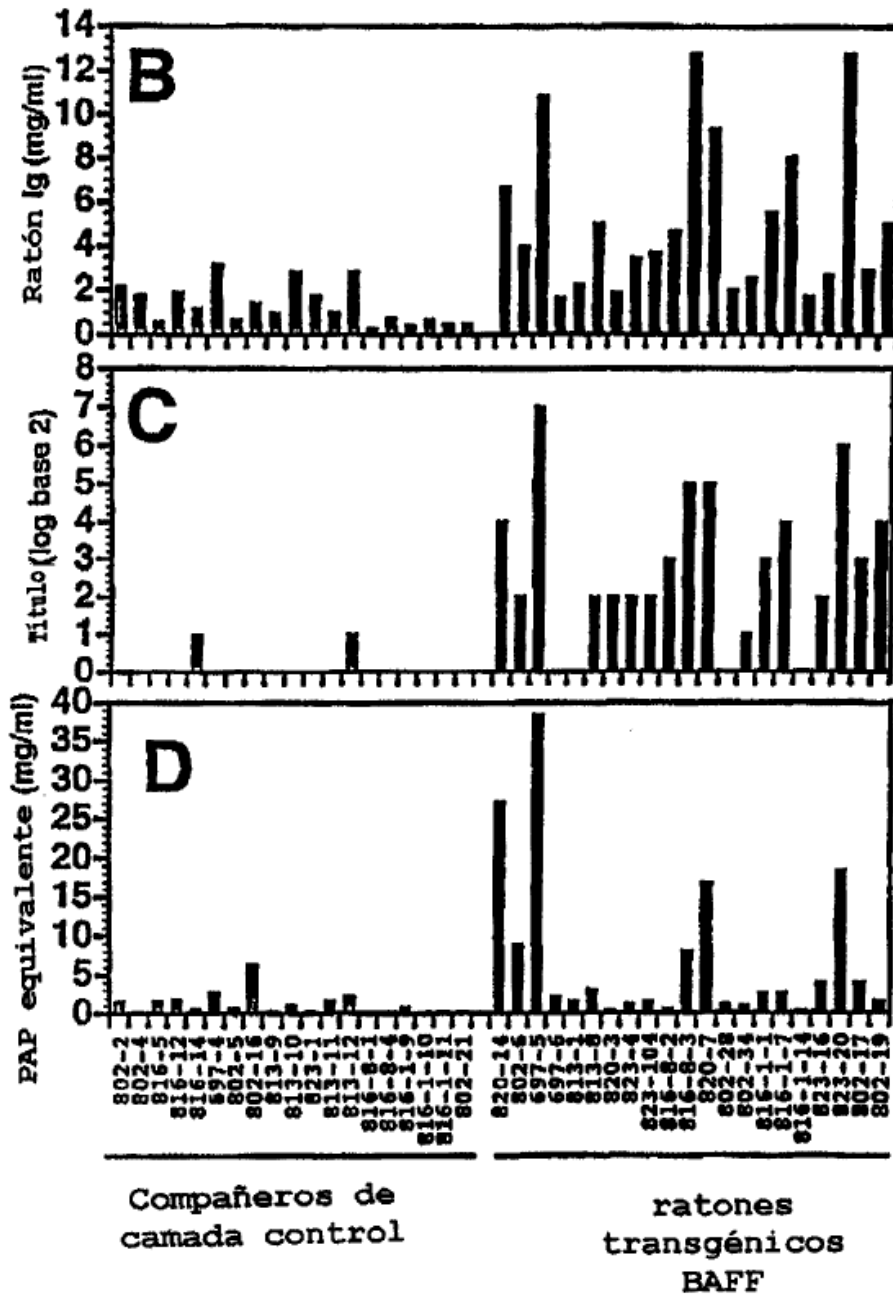


Figura 9BCD

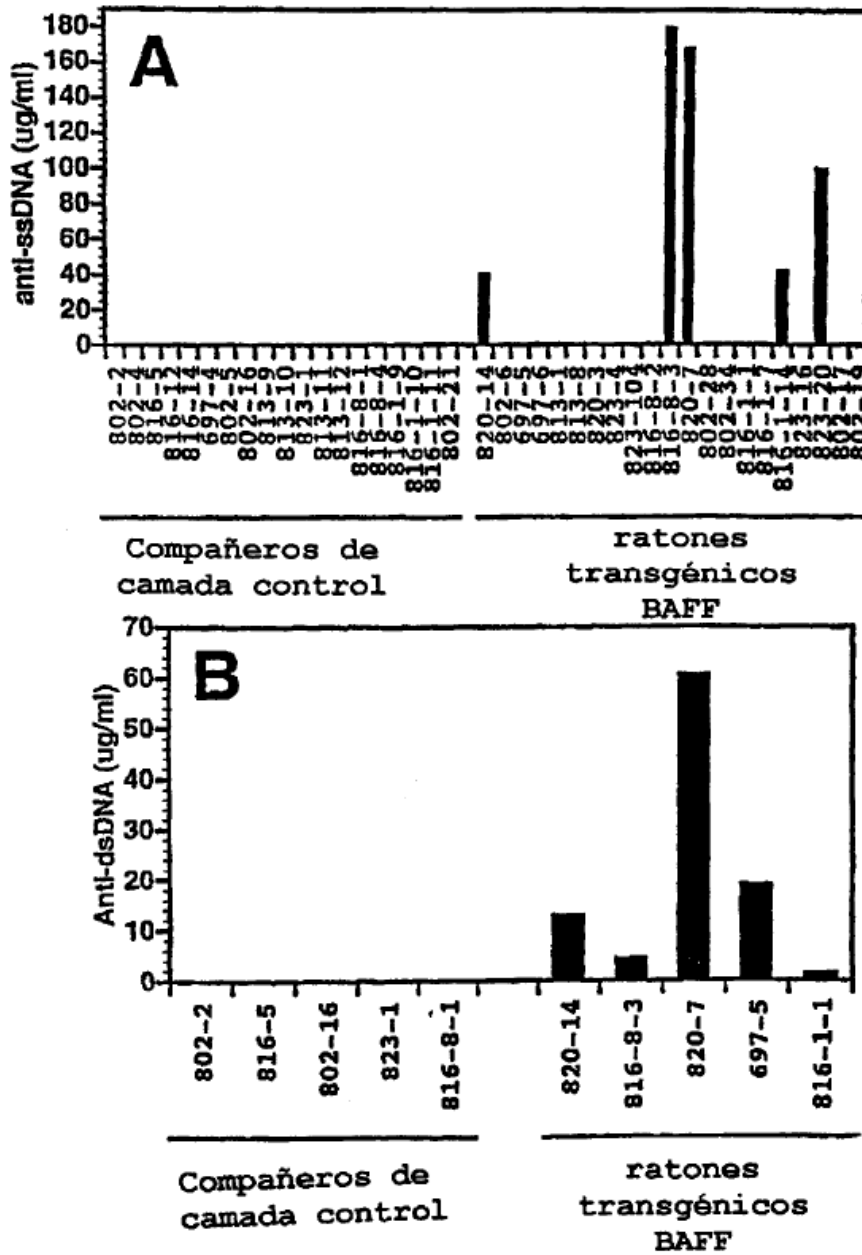


Figura 10-AB

C

Animal de control



ratón transgénico BAFF



Figura 10C

Compañeros de
camada control

ratones
transgénicos
BAFF



Figura 11

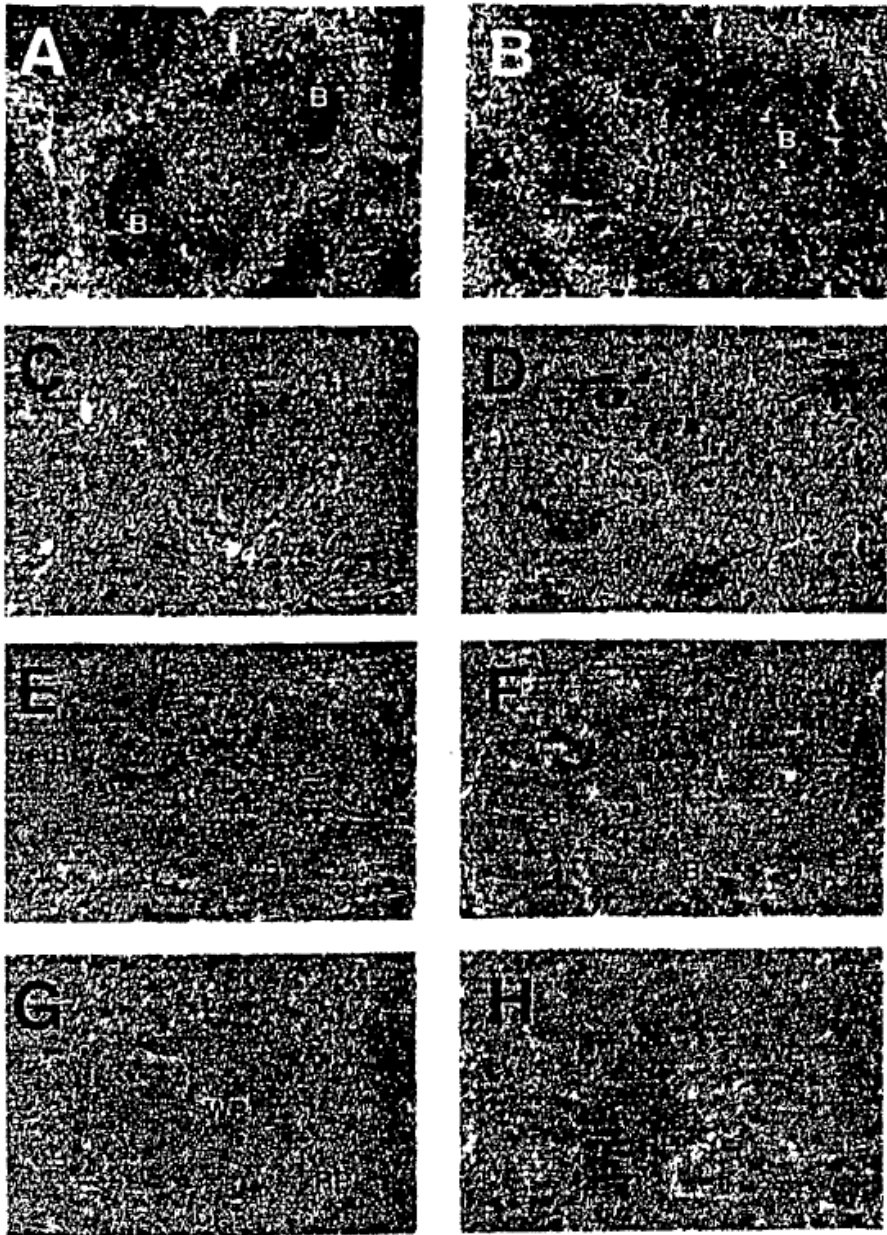


Figura 12



Figura 13