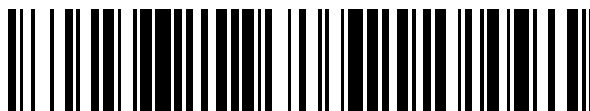


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 406**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00	(2006.01)	A61K 39/395	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)	A61P 37/00	(2006.01)
C12N 5/00	(2006.01)	A61K 38/17	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)	C07K 16/42	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01)	C07K 16/46	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)	A01K 67/027	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)	C07K 14/725	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	G01N 33/50	(2006.01)
A61K 31/00	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06003809 .8**

96 Fecha de presentación: **01.03.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **1757621**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE TRASTORNOS INMUNITARIOS.**

30 Prioridad:
03.03.1995 US 398833
07.06.1995 US 487748

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.12.2011

73 Titular/es:
MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
40 LANDSDOWNE STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:
Levinson, Douglas A.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 370 406 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

Composiciones y procedimientos para el tratamiento y diagnóstico de trastornos inmunitarios

Introducción

5 La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de trastornos inmunitarios, especialmente trastornos relacionados con linfocitos T cooperadores (TH) y similares a linfocitos TH. La invención proporciona procedimientos de diagnóstico y composiciones para el tratamiento de tales trastornos, y para monitorizar la eficacia de compuestos usados en ensayos clínicos.

2. Antecedentes de la invención

10 Se reconocen dos tipos distintos de linfocitos T: linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) y linfocitos T cooperadores CD4⁺ (linfocitos TH). Los CTL reconocen y destruyen células que presentan xenoantígenos en sus superficies. Los precursores de CTL presentan preceptores de linfocitos T que reconocen péptidos procesados derivados de proteínas exógenas, junto con moléculas de MHC de clase I, sobre otras superficies celulares. Este procedimiento de reconocimiento provoca la activación, la maduración y la proliferación de los CTL precursores, dando como resultado clones de CTL que pueden destruir las células que presentan los antígenos reconocidos como xenoantígenos.

15 Los linfocitos TH están implicados en las formas tanto humorales como mediadas por células de las respuestas inmunitarias efectoras. Con respecto a la respuesta inmunitaria humoral, o de anticuerpo, se producen anticuerpos por los linfocitos B a través de interacciones con linfocitos TH. Específicamente, los antígenos extracelulares se endocitan por células que presentan antígenos (APC), se procesan, y se presentan de forma preferente junto con moléculas de complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC) para linfocitos TH CD4⁺ restringidos a MHC de clase II. Estos linfocitos TH activan a su vez linfocitos B, dando como resultado la producción de anticuerpos.

20 La respuesta inmunitaria mediada por células o celular, funciona para neutralizar microbios que habitan en lugares intracelulares. Los xenoantígenos, tales como, por ejemplo, antígenos víricos, se sintetizan dentro de células infectadas y se presentan sobre las superficies de tales células junto con moléculas de MHC de clase I. Esto, luego, conduce a la estimulación de los CTL CD8⁺ restringidos a MHC de clase I.

25 Algunos agentes, tales como micobacterias, que provocan tuberculosis y lepra, son engullidos por macrófagos y procesados en vacuolas que contienen enzimas proteolíticas y otras sustancias tóxicas, aunque estos componentes macrófagos pueden destruir y digerir la mayoría de los microbios, agentes tales como micobacterias sobreviven y se multiplican. Sin embargo, los antígenos de los agentes son procesados por los macrófagos y se presentan de forma preferente junto con moléculas de MHC de clase II para linfocitos TH CD4⁺ restringidos a MHC de clase II, que se estimulan para segregar interferón- γ , que, a su vez, activa macrófagos. Esta activación da como resultado células que presentan un incremento en su capacidad bactericida.

30 Los linfocitos TH están compuestos al menos de dos subpoblaciones distintas, denominadas subpoblaciones de linfocitos TH1 y TH2. La evidencia sugiere que los subtipos TH1 y TH2 representan poblaciones extremadamente polarizadas de linfocitos TH. Aunque estas subpoblaciones se descubrieron originalmente en sistemas murinos (revisados en Mosmann, T.R. y Coffman, R.L., 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:145), también se ha establecido en seres humanos la existencia de subpoblaciones similares a TH1 y TH2 (Del Prete, A.F. y cols., 1991, J. Clin. Invest. 88:346; Wiernenga, E.A. y cols., 1990, J. Imm. 144:4651; Yamamura, M. y cols. 1991, Science 254:277; Robinson, D. y cols., 1993, J. Allergy Clin. Imm. 92:313). Aunque los linfocitos similares a TH1 y TH2 pueden representar las subpoblaciones de linfocitos TH más extremadamente polarizadas, otras subpoblaciones de linfocitos TH, tales como linfocitos TH0 (Firestein, G.S. y cols., 1989, J. Imm. 143:518), representan linfocitos TH que tienen características de subpoblaciones de linfocitos TH1 y TH2.

35 Parece que las células similares a TH1 y TH2, funcionan como parte de las diferentes funciones efectoras del sistema inmunitario (Mosmann, T.R. y Coffmann, R.L., 1989, Ann. Rev. Imm. 1:145). Específicamente, las células similares a TH1 dirigen el desarrollo de la inmunidad mediada por células, provocando defensas del huésped mediadas por fagocitos, y están asociadas con la hipersensibilidad retardada. En consecuencia, las infecciones con microbios intracelulares tienden a inducir respuestas de tipo TH1. Los linfocitos TH2 conducen respuestas inmunitarias humorales, que se asocian, por ejemplo, con defensas frente a determinados parásitos helmínticos, y están implicados en respuestas de anticuerpos y alérgicas.

40 Se ha observado que la capacidad de los diferentes tipos de linfocitos TH para conducir diferentes respuestas efectoras inmunitarias es debida a las combinaciones exclusivas de citocinas que se expresan dentro de una subpoblación de linfocitos TH particular. Por ejemplo, se sabe que los linfocitos TH1 segregan interleucina-2 (IL-2), interferón- γ (IFN- γ), y linfoxina, mientras que los linfocitos TH2 segregaron interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10).

Se cree que las subpoblaciones de TH1 y TH2 surgen de un precursor indiferenciado común (denominado THP). Por ejemplo, se pueden inducir linfocitos CD4+ indiferenciados de ratones que expresen un único receptor de linfocitos T transgénico para que se desarrollen tanto el tipo de linfocitos TH1 como el TH2. La condición de la estimulación de antígeno, incluyendo la naturaleza y la cantidad de antígeno implicado, el tipo de células que presentan antígenos, y el tipo de moléculas de hormonas y citocinas presentes, parece representar los determinantes del patrón de la diferenciación de TH1 frente a TH2, perteneciendo, quizás, el papel decisivo a las citocinas presentes. Con una serie de posibles determinantes tan compleja, un recuento completo de los factores exactos importantes en la conducción de la diferenciación de TH1 o TH2 es, en gran parte, desconocido.

Además, se ha observado recientemente que, además de los linfocitos TH CD4+, los CTL CD8+, bajo determinadas condiciones, también pueden presentar perfiles citocínicos similares a TH1 o similares a TH2 (Seder, R.A. y cols., 1995, J. Cad. Med. 181:5-7; Manetti, R. y cols., 1994, J. Cad. Med. 180:2407-2411; Maggi, E. y cols., 1994, J. Cad. Med. 180:489-495). Aunque actualmente se desconoce el papel funcional preciso de estos linfocitos similares a TH CD8+, parece que estas subpoblaciones celulares tienen una gran relevancia para respuestas inmunitarias frente a agentes infecciosos, tales como virus y parásitos intracelulares.

Una vez se expanden las subpoblaciones de TH1 y TH2, los tipos de linfocitos tienden a regularse negativamente entre sí a través de las acciones de citocinas únicas a cada una. Por ejemplo, el IFN- γ producido por TH1 regula negativamente linfocitos TH2, mientras que la IL-10 producida por TH2 regula negativamente linfocitos TH1. Además, las citocinas producidas por T1 y T2 antagonizan las funciones efectoras entre sí (Mosmann, T.R. y Moore, 1991, Immunol. Today 12:49).

A menudo, el fallo al controlar o al resolver un proceso infeccioso da como resultado una respuesta inmunitaria inapropiada, en lugar de insuficiente, y puede ser la razón de muchos trastornos inmunológicos. Estos trastornos pueden incluir, por ejemplo, condiciones atópicas (es decir, afecciones alérgicas mediadas por IgE), tales como asma, alergia, incluyendo rinitis alérgica, dermatitis, incluyendo soriasis, sensibilidades a patógenos, enfermedad inflamatoria crónica, autoinmunidad específica de órganos, rechazo de injerto y enfermedad de injerto contra huésped. Por ejemplo, las formas de leishmaniasis humana y murina que no cicatrizan son resultado de respuestas inmunitarias dominadas similares a TH2 fuertes pero contraproducentes. Parece que la lepra lepromatosa también presenta una respuesta similar a TH2, prevalente, aunque inapropiada.

Es posible que otro ejemplo pueda ser la infección por VIH. En este documento, se ha sugerido que un descenso en la proporción de linfocitos similares a TH1 con respecto a otras subpoblaciones de linfocitos TH puede desempeñar un papel esencial en la progresión hacia los síntomas de la enfermedad. Además, se ha observado que, al menos in vitro, parece que los clones similares a TH2 son soportes más eficaces de la replicación vírica del VIH que los clones similares a TH1.

Además, aunque las respuestas inflamatorias mediadas por TH1 para muchos microorganismos son beneficiosas, estas respuestas a los propios antígenos normalmente son adversas. Se ha sugerido que la activación preferente de respuestas similares a TH1 es esencial para la patogénesis de estas enfermedades autoinmunitarias inflamatorias humanas como la esclerosis múltiple y la diabetes dependiente de insulina. Por ejemplo, las citocinas de tipo TH1 predominan en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con esclerosis múltiple, en las pancreasas de pacientes con diabetes dependiente de insulina, en la glándula tiroides de pacientes con tiroiditis de Hashimoto, y en el intestino de pacientes con la enfermedad de Crohn, lo que sugiere que en estos pacientes aumenta una respuesta similar a TH1, no similar a TH2, al/a los antígeno(s) implicado(s) en la etiopatogénesis de estos trastornos.

Por lo tanto, un objetivo principal, por razones tanto diagnósticas como terapéuticas, sería la capacidad para identificar, aislar y/o dirigir miembros de una subpoblación de linfocitos TH particular. Se requiere la capacidad para identificar estos genes que se expresan diferencialmente dentro y/o entre estas subpoblaciones de linfocitos TH para lograr un objetivo de este tipo. Hasta la fecha, las investigaciones se han centrado en la expresión de un número limitado de citocinas conocidas específicas y de receptores de citocinas en la población de linfocitos TH. Sin embargo, las citocinas ejercen efectos sobre los tipos de linfocitos además de subpoblaciones de linfocitos TH específicas, es decir, presentan muchos efectos pleiotrópicos. Por lo tanto, sería beneficioso identificar marcadores fiables (por ejemplo, secuencias génicas) de las subpoblaciones de linfocitos TH cuyos efectos son específicos de las subpoblaciones de linfocitos TH, por ejemplo, que, a diferencia de las citocinas secretadas, son específicos de las subpoblaciones de linfocitos TH.

Werenskiold, European Journal of Biochemistry (1992) 204: 1041-1047 describe el péptido T1 y se da a conocer un antisuero policlonal usado para detectar este péptido en muestras. Sin embargo, no se atribuye una función al péptido T1 ni ninguna indicación de un uso diagnóstico o terapéutico del antisuero.

Bergers y cols, EMBO (1994) 13:1176 - 1188 describe el gen Fit-1 y la proteína codificada, así como los anticuerpos que describen los mismos.

Shin-Ichi, Biochimica et Biophysica Acta (1992) 1171:215-218 describe la secuencia de nucleótidos del gen ST2 y da a conocer que el homólogo humano del gen ST2 murino se expresa en los linfocitos TH.

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento que se une específicamente a un péptido codificado por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 2, o un péptido codificado por el gen T1, ST2 o Fit-1 para un uso seleccionado de aislamiento de una subpoblación de linfocitos TH2; reducción del número de linfocitos TH2 presentes en una población celular; y tratamiento de un trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH2. La invención también se refiere a un procedimiento in vitro de separación de linfocitos TH2 de una población celular que comprende la unión a un péptido presente en la célula deseada de interés y codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 2 o por el gen T1, ST2 o Fit-1 con un anticuerpo o fragmento específicos para el dominio extracelular de dicho péptido, y la retirada de células unidas por dicho anticuerpo o fragmento.

En las reivindicaciones dependientes se dan otras características de la invención.

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de trastornos inmunitarios, especialmente trastornos relacionados con linfocitos T cooperadores (TH) y similares a linfocitos TH. En primer lugar, se identifican y se describen los genes que se expresan diferencialmente dentro y entre linfocitos TH y subpoblaciones de linfocitos TH. En segundo lugar, se identifican y se describen los genes que se expresan diferencialmente dentro de subpoblaciones de linfocitos TH en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. La modulación de la expresión de los genes identificados y/o la actividad de los productos génicos identificados se puede utilizar terapéuticamente para mejorar los síntomas de trastornos inmunitarios y para modular la reactividad de linfocitos TH, por ejemplo, la reactividad a antígeno. Además, los genes y/o los productos génicos identificados se pueden usar para diagnosticar a individuos que presentan o están predispuestos a tales trastornos inmunitarios. Aún más, los genes y/o los productos génicos identificados se pueden usar para detectar la reactividad de linfocitos TH, por ejemplo, la reactividad a antígeno.

"Expresión diferencial", como se usa en el presente documento, se refiere a diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en los patrones de expresión temporal y/o celular de genes dentro y entre las subpoblaciones de linfocitos TH. Los genes expresados diferencialmente pueden representar "genes identificados" y/o "genes diana".

"Gen identificador", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen expresado diferencialmente cuyo patrón de expresión se puede utilizar como parte de una evaluación de pronóstico o diagnóstico de trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos relacionados con linfocitos TH, o que, alternativamente, se puede usar en procedimientos para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de estos trastornos. Por ejemplo, se puede usar el efecto del compuesto sobre la expresión del gen identificador que normalmente se muestra junto con el trastorno, para evaluar la eficacia del compuesto como tratamiento para un trastorno de este tipo, o se puede usar, adicionalmente, para monitorizar pacientes sometidos a evaluación clínica para el tratamiento de estos trastornos.

"Patrón identificador", como se usa en el presente documento, se refiere al patrón generado cuando se determina el patrón de expresión de una serie (que puede variar desde dos hasta todos los genes identificadores que existen para un estado dado) de los genes identificadores. Se puede usar un patrón identificador en los mismos procedimientos de diagnóstico, pronóstico e identificación de compuesto como la expresión de un único gen identificador.

"Gen diana", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen expresado diferencialmente implicado en trastornos inmunitarios por ejemplo, trastornos relacionados con linfocitos TH, de modo que la modulación del nivel de expresión del gen diana o de una actividad del producto génico diana puede actuar para mejorar el trastorno inmunitario. Se pueden usar compuestos que modulan la expresión del gen diana o la actividad del producto génico diana en el tratamiento de trastornos inmunitarios.

Además, "genes de ruta" se define por medio de la capacidad de sus productos génicos para interactuar con productos génicos implicados en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o para interactuar con productos génicos que están implicados en la diferenciación y función efectora de las subpoblaciones de linfocitos TH. Los genes de ruta también pueden presentar características de genes diana o de genes identificadores.

Aunque los genes diana, identificadores y/o de ruta descritos en el presente documento se pueden expresar diferencialmente dentro y/o entre subpoblaciones de linfocitos TH, y/o pueden interactuar con productos génicos de subpoblaciones de linfocitos TH, los genes también pueden estar implicados en mecanismos importantes para los procedimientos inmunitarios adicionales.

La presente invención también se refiere a procedimientos para la evaluación de pronóstico y diagnóstico de diferentes trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, y para la identificación de sujetos que están predispuestos a estos trastornos. Además, la invención proporciona procedimientos para evaluar la eficacia de fármacos para trastornos inmunitarios, y para monitorizar el progreso de pacientes implicados en ensayos clínicos para el tratamiento de estos trastornos.

Los trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, trastornos relacionados con TH1 o con similares a TH1 o pueden incluir, alternativamente, trastornos relacionados con TH2 o con similares a TH2. Ejemplos de trastornos relacionados con TH1 o con similares a TH1 incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como enfermedad de Crohn, artritis reactiva, incluyendo enfermedad de Lyme, diabetes dependiente de insulina, autoinmunidad específica de órganos, incluyendo esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Grave, dermatitis de contacto, soriasis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped y sarcoidosis. Ejemplos de trastornos relacionados con TH2 o similares a TH2 incluyen afecciones atópicas, tales como asma y alergia, incluyendo rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, incluyendo las alergias alimentarias, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, determinadas sensibilidades a patógenos tales como infecciones helmínticas (por ejemplo, leishmaniasis) y determinadas infecciones víricas, incluyendo VIH e infecciones bacterianas, incluyendo tuberculosis y lepra lepromatosa.

También se contempla que los procedimientos y las composiciones descritas en el presente documento se pueden utilizar en la evaluación de pronóstico y diagnóstico de trastornos que implican otras células inmunitarias, incluyendo CTL CD8⁺, que presentan patrones y/o actividad de expresión génica de subpoblaciones celulares similares a TH. También se contempla que los procedimientos y las composiciones descritas en el presente documento se pueden utilizar en la mejora de síntomas que derivan de trastornos que implican dichas células inmunitarias, especialmente dichas CTL CD8⁺, que presentan patrones y/o actividad de expresión génica de subpoblaciones celulares similares a TH.

En el presente documento también se describen procedimientos para la identificación de compuestos que modulan la expresión de genes o la actividad de productos génicos implicados en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y procedimientos relevantes para la diferenciación, el mantenimiento y/o la función efectora de la subpoblaciones. Aún más, en el presente documento se describen procedimientos para el tratamiento de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH que pueden, por ejemplo, implicar la administración de dichos compuestos moduladores a individuos que presentan síntomas o tendencias de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Además, el tratamiento puede dar como resultado la estimulación o reducción de una o más de las subpoblaciones de linfocitos TH.

"Estimulación", como se usa en el presente documento, se puede referir a un incremento eficaz en el número de células que pertenecen a una subpoblación de linfocitos TH por medio, por ejemplo, de la proliferación de tales células de la subpoblación de linfocitos TH. El término también se puede referir a un incremento en la actividad de células que pertenecen a una subpoblación de linfocitos TH, como se demuestra, por ejemplo, por un incremento por célula en la expresión del patrón de citocinas específico de subpoblación de linfocitos TH.

"Disminución", como se usa en el presente documento, se puede referir a una reducción eficaz en el número de células que pertenecen a una subpoblación de linfocitos TH por medio, por ejemplo, de la reducción en la proliferación de tales células de la subpoblación de linfocitos TH. El término también se puede referir a una disminución en la actividad de células que pertenecen a una subpoblación de linfocitos TH, como se demuestra, por ejemplo, por una disminución por célula en la expresión del patrón de citocinas específico de subpoblación de linfocitos TH.

La invención se basa, en parte sobre las estrategias de búsqueda sistemática que implican paradigmas que utilizan linfocitos TH0, TH1, TH2, similares a TH1 y similares a TH2, en sistemas de imitan la actividad del sistema inmunitario o trastornos inmunitarios, acoplados con ensayos de expresión génica de alto rendimiento, para identificar genes expresados diferencialmente dentro y/o entre subpoblaciones de linfocitos TH. A diferencia de los enfoques que simplemente evalúan la expresión de un único producto génico conocido que se supone que desempeña un papel en algunos procesos o trastornos relacionados con células inmunitarias, las estrategias y ensayos de búsqueda usados en el presente documento permiten la identificación de todos los genes, sean conocidos o novedosos, que se expresan diferencialmente dentro y entre subpoblaciones de linfocitos TH, así como haciendo posible la caracterización de su regulación y función temporal en la respuesta de linfocitos TH o y/o en trastornos mediados por linfocitos TH. Este enfoque y evaluación comprensivos permite el descubrimiento de genes novedosos y de productos génicos, así como la identificación de una constelación de genes y de productos génicos (tanto novedosos como conocidos) implicados en rutas novedosas (por ejemplo, rutas de modulación) que desempeñan un papel importante en las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos TH y en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Por tanto, la presente invención hace posible la identificación y caracterización de dianas útiles para pronóstico, diagnóstico, monitorización, diseño correcto de fármacos, y/o intervención terapéutica de trastornos del sistema inmunitario.

El ejemplo descrito en la Sección 7, a continuación, demuestra el uso exitoso de las estrategias de búsqueda de la invención para identificar genes que se expresan diferencialmente entre y/o dentro de las subpoblaciones de linfocitos TH.

El gen 103 representa un gen que, aunque conocido previamente, se sabe en el presente documento que se expresa diferencialmente entre subpoblaciones de linfocitos TH.

El gen 103 corresponde a un gen conocido como el gen T1, ST-2 o Fit-1, que codifica, posiblemente por medio de ajuste alternativo, productos génicos tanto transmembranarios como solubles. Los productos del gen 103 pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas, y tienen un gran parecido con el receptor de interleucina-1 (IL-1). Los resultados presentados en el presente documento demuestran, por primera vez, que este gen se expresa, in vivo, de una forma específica de TH2 perfectamente controlada. Por tanto, dado este estatus tanto como un marcador específico de subpoblaciones de linfocitos TH2 como de proteína de superficie celular, los productos del gen 103 se pueden utilizar en muchos procedimientos para diagnosticar y/o modular trastornos del sistema inmunitario, en particular trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH.

Se puede usar la identificación de marcadores específicos de subpoblaciones de linfocitos TH en el tratamiento de muchos trastornos inmunitarios, especialmente trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Por ejemplo, se pueden usar marcadores para la subpoblación de TH2 para mejorar afecciones que implican una respuesta inmunitaria de IgE inapropiada, incluyendo pero sin limitarse a los síntomas que acompañan afecciones atópicas tales como alergia y/o asma. Los anticuerpos de tipo IgE se producen por los linfocitos B estimulados lo que requiere, al menos en parte, IL-4 producida por la subpoblación de linfocitos TH2. Por lo tanto, un tratamiento que reduzca la concentración eficaz de IL-4, por ejemplo, por reducción de la actividad o del número de linfocitos TH2, dará lugar a una reducción en el nivel de IgE circulante, lo que lleva, a su vez, a la mejora o a la eliminación de afecciones atópicas. Por lo tanto, cualquiera de los productos génicos específicos de TH2 descritos en el presente documento se pueden usar como diana para reducir o disminuir el número y/o la actividad de células de subpoblaciones de linfocitos TH2 para el tratamiento de tales afecciones.

El gen 103 puede ser particularmente adecuado para este fin ya que uno de sus productos génicos es una molécula de subpoblación de linfocitos TH2 unida a membrana. En consecuencia, se pueden usar ligandos naturales, derivados de ligandos naturales y anticuerpos que se unen a este producto del gen 103, para reducir el número de linfocitos TH2 presentes separando físicamente estas células de otras células en una población, o bien, de forma alternativa, dirigiendo la destrucción específica de linfocitos TH2 o bien inhibiendo la proliferación de tales linfocitos TH2. Además, se pueden utilizar compuestos tales como secuencias del gen o productos del gen 103 para reducir el nivel de actividad de los linfocitos TH2, para provocar una reducción en la producción de IL-4, y, finalmente, para dar lugar a la mejora en trastornos relacionados con IgE. Por ejemplo, los compuestos puede competir con el ligando endógeno (es decir, natural) por el producto del gen 103. La reducción resultante en la cantidad de proteína transmembranaria del gen 103 unida a ligando modulará la actividad celular de TH2. Las proteínas o péptidos solubles, tales como péptidos que comprenden el dominio extracelular, o porciones y/o análogos a los mismos, del producto del gen 103, incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión solubles, tales como proteínas de fusión con cola de Ig, puede ser particularmente útil para este fin.

Se puede usar la identificación de marcadores específicos de subpoblaciones de linfocitos TH en el tratamiento de un trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH1. Por ejemplo, se pueden usar marcadores para la subpoblación de linfocitos TH1 para mejorar afecciones que implican una respuesta inmunitaria mediada por células inapropiada, incluyendo, pero sin limitarse a trastornos inflamatorios y autoinmunitarios crónicos. Además, se pueden usar animales transgénicos que sobreexpresan o que expresan de forma incorrecta dichas secuencias génicas y/o animales transgénicos "inactivados" que presentan poca o ninguna expresión de dichos genes, como modelos animales para trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. El ejemplo presentado en la Sección 11, a continuación, describe la producción de animales transgénicos de 103.

El ejemplo presentado en la Sección 10, a continuación, describe la construcción y la expresión de proteínas y construcciones de fusión de Ig con el producto de gen 103.

3.1 Definiciones

La expresión "subpoblación de linfocitos TH", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de linfocitos TH que presentan un patrón de expresión génica (por ejemplo, un patrón discreto de citocinas y/o receptor u otras moléculas de superficie celular) y de actividad que son diferentes del patrón de expresión y de la actividad de otros linfocitos TH. Estas subpoblaciones de linfocitos TH pueden incluir, pero no se limitan a, subpoblaciones de TH0, TH1 y TH2, que, por claridad y ejemplo, y después a modo de limitación, se podrán usar frecuentemente en el presente documento como subpoblaciones de linfocitos TH representativas.

La expresión "subpoblación celular similar a TH" (por ejemplo, "similar a TH1" o "similar a TH2"), como se usa en el presente documento pretende referirse no sólo a una población de linfocitos TH CD4⁺ que tienen las propiedades descritas, anteriormente, para una subpoblación de linfocitos TH, sino que también se refiere a linfocitos CD4⁺, incluyendo CD8+CTL, que presentan patrones de expresión de citocinas similares a TH.

"Expresión diferencial", como se usa en el presente documento, se refiere a diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en los patrones de expresión temporal y/o celular de genes.

"Gen diana", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen expresado diferencialmente implicado en trastornos inmunitarios y/o en la diferenciación, el mantenimiento y/o la función efectora de subpoblaciones de

linfocitos TH, de modo que la modulación del nivel de expresión génica diana o de la presencia y/o actividad de producto génico diana puede actuar, por ejemplo, para dar como resultado la reducción o represión específica, o, de forma alternativa, la estimulación o el aumento de una o más subpoblaciones de linfocitos TH, dando lugar, a su vez, a la mejora de los síntomas de trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Un gen diana también puede presentar características de genes identificadores o de genes de ruta.

"Gen identificador", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen expresado diferencialmente cuyo patrón de expresión de ARNm, nivel proteico y/o actividad se puede utilizar como parte de un pronóstico o diagnóstico en la evaluación de trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, o que, de forma alternativa, se puede usar en procedimientos para la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de estos trastornos, por ejemplo, evaluando el efecto del compuesto sobre la expresión del gen identificador mostrado normalmente junto con la enfermedad. Un gen identificador también puede presentar características de genes diana o de ruta.

"Patrón identificador", como se usa en el presente documento, se refiere al patrón generado cuando se determina el patrón de expresión de ARNm, el nivel proteico y/o la actividad de una serie (que puede variar desde dos hasta todos los genes identificadores que existen para un estado dado) de los genes identificadores. Un patrón identificador puede ser una parte de los mismos procedimientos descritos, anteriormente, para la expresión de un único gen identificador.

"Genes de ruta", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen cuyo producto presenta una capacidad para interactuar con productos génicos implicados en trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o para interactuar con productos génicos que están implicados en la diferenciación y en la función efectora de subpoblaciones de linfocitos TH. Los genes de ruta también pueden presentar características de genes diana o de genes identificadores.

"Modulación negativa", como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción en el nivel y/o en la actividad de producto génico diana con relación al nivel y/o a la actividad del producto génico diana en ausencia del tratamiento modulador. De forma alternativa, el término, como se usa en el presente documento, se refiere a una reducción en el número y/o en la actividad de células que pertenecen a la subpoblación de linfocitos TH con relación al número y/o a la actividad de la subpoblación de linfocitos TH en ausencia del tratamiento modulador.

"Modulación positiva", como se usa en el presente documento, se refiere a un incremento en el nivel y/o en la actividad de producto génico diana con relación al nivel y/o a la actividad del producto génico diana en ausencia del tratamiento modulador. De forma alternativa, el término, como se usa en el presente documento, se refiere a un incremento en el número y/o en la actividad de células que pertenecen a la subpoblación de linfocitos TH con relación al número y/o a la actividad de la subpoblación de linfocitos TH en ausencia del tratamiento modulador.

4. Descripción de las figuras

FIG. 1. Análisis de presentación diferencial de ARN a partir de subconjuntos de linfocitos T murinos. Se diferenciaron in vitro linfocitos T esplénicos derivados de ratones transgénicos receptores de linfocitos T para convertir poblaciones polarizadas de subtipos TH1 o TH2. Carril 1: población de TH2 24 horas después de estimulación terciaria; carril 2: población de TH1 24 horas después de estimulación terciaria; carril 3: población de TH2 1 semana después de estimulación secundaria; carril 4: población de TH1 1 semana después de estimulación secundaria; carril 5: línea celular TA3, que se usó como células presentadoras de antígenos (APC) para estimulación in vitro. (Esta muestra se usó como control negativo.) Cada conjunto de carriles consiste en duplicados (a y b), en los que los ADNc se generaron independientemente a partir de la misma fuente de ARN.

Todos los carriles son productos de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los que se usó T₁₁GG como el oligonucleótido en dirección 3' y se usó un oligonucleótido de 10 mero al azar (Oligo n.º 4, OP-D kit, Operon, Inc.) como el oligonucleótido en dirección 5'.

FIG. 4A. Clon de secuencia de nucleótidos 103.1 de banda 103 (SEC ID N.º:2). El gen correspondiente a la banda 103 se denomina en el presente documento como gen 103.

FIG. 4B. Productos del gen 103. Este esquema ilustra la relación entre la banda 103, los productos del gen 103 (también conocidos como ST-2, T1 y Fit-1) y la estructura de polipéptidos del receptor IL-1. Los dominios extracelular, transmembranario y citoplásmico de las proteínas se anotan, junto con los residuos de aminoácidos marcando los enlaces de estos dominios. (Adaptado de Yanagisawa et al., 1993, FEBS 318:83-87.)

FIG. 5. Análisis por RT-PCR cuantitativo de la expresión del gen 103 en poblaciones polarizadas de linfocitos TH murinos. Se recogieron muestras de ARN a partir de poblaciones de linfocitos T cultivadas 24 horas después de estimulación terciaria con antígeno. Se amplificaron por PCR muestras de ADNc y se sometieron a electroforesis los productos de esas reacciones sobre un gel de agarosa al 1% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. La expresión del gen 103 se muestra en el panel superior. Se incluyeron datos de γ -actina, panel inferior, como control

para determinar diferencias en la calidad de la muestra. Los números sobre cada carril representan los factores de dilución de cada ADNc. Se usaron las mismas muestras de ADNc para las amplificaciones tanto del gen 103 como de la γ -actina.

5 FIG. 6. Análisis de bandas Northern de expresión del gen 103 en líneas celulares de THE murinas (THE2: CDC25, D10.G4, DAX; TH1: AE7.A, Dorris, D1.1). Los clones no se estimularon (-) o bien se estimularon (+) durante 6 horas con un anticuerpo anti-CD3 unido a placa. Se cargaron diez microgramos de ARN total por carril. Las posiciones de ARN ribosómico 18s y 28s se muestran como marcadores de referencia.

10 FIG. 7. Análisis de bandas Northern de expresión del gen 103 en linfocito T, clones y tejidos murinos. Carril 1: Células DAX sin estimulación; carril 2, células AE7, estimulación, carril 3, células AE7, sin estimulación; carril 4, células D10.G4, estimulación; carril 5, células D10.G4, sin estimulación; carril 6, cerebro; carril 7, corazón; carril 8, pulmón; carril 9, bazo; carril 10, hígado. Los clones se estimularon con anticuerpo anti-CD3 unido a placa durante 6 horas. Se usaron 7,5 y 10 microgramos de ARN total para cada línea celular y para cada tejido, respectivamente. Las flechas a, b, y c se refieren a ARN codificante de longitud completa (a) y formas truncadas (b, c) del gen 103. Se muestran las posiciones de marcadores de ARN ribosómico 18s y 28s.

15 FIG. 8. Análisis de protección de RNasa de ARN de gen 103, ilustrando la regulación de la expresión del gen 103 en clones de linfocitos TH murinos. Carriles 2-6: protección de β -actina; carriles 9-13: protección del gen 103; carriles 1 y 8: marcadores; carriles 2 y 9: clones de TH1 no estimulados; carriles 3 y 10: clones de TH1 estimulados; carriles 4 y 11: clones de TH2 no estimulados; carriles 5 y 12: clones de TH2 estimulados; carriles 6 y 13: sonda no protegida digerida totalmente por RNasa A; carriles 7 y 14: sonda sola, en ausencia de RNasa añadida.

20 Tamaño de fragmentos esperado:

sonda protegida con β -actina: 250 nucleótidos;

sonda de longitud completa con β -actina: 330 nucleótidos;

fragmento de forma larga del gen 103: 257 nucleótidos;

fragmento de forma corta del gen 103: 173 nucleótidos;

25 sonda de longitud completa del gen 103: 329 nucleótidos.

5. Descripción detallada de la invención

30 Se describen procedimientos y composiciones para el tratamiento y el diagnóstico de trastornos inmunitarios, especialmente trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, incluyendo, pero sin limitarse a, afecciones atópicas, tales como asma y alergia, incluyendo rinitis alérgica, soriasis, los efectos de infección por patógenos, enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunidad específica de órganos, rechazo de injerto y enfermedad de injerto contra huésped. La invención se basa, en parte, en la evaluación de la expresión y el papel de todos los genes que se expresan diferencialmente dentro y/o entre subpoblaciones de linfocitos TH en paradigmas que son fisiológicamente relevantes para trastornos relacionados con respuesta inmunitaria mediada por TH y/o subpoblaciones de TH. Esto permite la definición de rutas de enfermedad que son útiles tanto diagnósticamente como terapéuticamente.

35 En la Sección 5.4 se describen genes, denominados "genes diana" y/o "genes identificadores", que se expresan diferencialmente dentro y entre linfocitos TH y subpoblaciones de linfocitos TH en estados normales y/o de enfermedad, y/o durante la diferenciación en estas subpoblaciones maduras. Además, en la Sección 5.4 se describen genes, denominados "genes de ruta", cuyos productos génicos presentan una capacidad para interactuar con productos génicos implicados en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o con productos génicos que están implicados en la diferenciación y en la función efectora de la subpoblación. Los genes de ruta también pueden tener adicionalmente características de genes identificadores y/o diana. En las Secciones 5.1 y 5.2 también se describen procedimientos para la identificación de tales genes identificadores, diana y de ruta.

45 Además, en la Sección 5.5 se describen los productos génicos de tales genes identificadores, diana y de ruta, en la Sección 5.6 se describen anticuerpos, para tales productos génicos, ya que son modelos basados en células y animales de diferenciación de subpoblaciones de linfocitos TH y en la Sección 5.7 se describen trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH para los que tales productos génicos pueden contribuir.

50 En la Sección 5.11 se describen procedimientos para la evaluación de pronóstico y diagnóstico de diversos trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, para la identificación de sujetos que presentan una predisposición a tales trastornos, y para la monitorización de la eficacia de compuestos usados en ensayos clínicos.

En la Sección 5.8 se describen procedimientos para la identificación de compuestos que modulan la expresión de genes o la actividad de productos génicos implicados en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y para la diferenciación y la función efectora de subpoblaciones de linfocitos TH, y en la Sección 5.9 se describen procedimientos para el tratamiento de trastornos inmunitarios.

5 **5.1 Identificación de genes expresados diferencialmente**

En el presente documento se describen procedimientos para la identificación de genes expresados diferencialmente que están implicados en trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, y/o que están implicados en la diferenciación, el mantenimiento y la función efectora de las subpoblaciones. Existe un número de niveles en los que se puede presentar la expresión diferencial de tales genes. Por ejemplo, la expresión diferencial se puede producir en linfocitos TH no diferenciados frente a linfocitos TH diferenciados o en diferenciación (aunque no necesariamente dentro de una subpoblación de linfocitos TH frente a otra), en linfocitos TH indiferenciados frente a linfocitos TH de memoria, dentro de una subpoblación de linfocitos TH frente a otra (por ejemplo, subpoblaciones TH1 frente a TH2), en células estimuladas maduras, frente a células no estimuladas maduras de una subpoblación de linfocitos TH dada o, en estados de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH con relación a su expresión en estados sin trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, normales. Estos genes expresados diferencialmente pueden representar genes diana y/o genes identificados.

A continuación, en la Sección 5.1.1, se describen procedimientos para la identificación de estos genes expresados diferencialmente. A continuación, en la Sección 5.3, se presentan procedimientos para la caracterización adicional de tales genes expresados diferencialmente, y para su categorización como genes diana y/o identificadores.

"Expresión diferencial", como se usa en el presente documento, se refiere a diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en los patrones de expresión temporal y/o de tipo celular de genes. Por tanto, un gen expresado diferencialmente puede tener cualitativamente su expresión activada o completamente inactivada, por ejemplo, en estados normales frente a trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, en una subpoblación de linfocitos TH frente a otra (por ejemplo, TH1 frente a TH2), en conjuntos estimulados frente a no estimulados de antígenos de linfocitos TH, o en linfocitos TH no diferenciados frente a diferenciados o en diferenciación. Un gen regulado cualitativamente de este tipo presentará un patrón de expresión dentro de un estado o tipo celular que se puede detectar por técnicas estándar en un estado o tipo celular de este tipo, pero no se puede detectar en ambos.

De forma alternativa, un gen expresado diferencialmente puede presentar un nivel de expresión que difiere, es decir, se incrementa o se disminuye cuantitativamente, en estados normales frente a trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, en conjuntos estimulados frente a no estimulados de antígenos de linfocitos TH, en una subpoblación de linfocitos TH frente a otra, o en linfocitos TH no diferenciados frente a diferenciados o en diferenciación. Debido a que la diferenciación es un suceso multifase, los genes que se expresan diferencialmente también se pueden identificar en cualquier fase diferenciativa intermedia.

El grado en el que difiere la expresión sólo necesita ser lo suficientemente grande para visualizarse por medio de técnicas de caracterización estándar, tales como por ejemplo, la técnica de presentación diferencial descrita a continuación. Otras técnicas de caracterización estándar de este tipo por las que se pueden visualizar diferencias de expresión incluyen, pero no se limitan a, análisis por RT (transcriptasa inversa) PCR cuantitativa y análisis de Northern y técnicas de protección de RNasa.

Los genes expresados diferencialmente se pueden describir además como genes diana y/o genes identificadores. "Gen identificador", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen expresado diferencialmente cuyo patrón de expresión se puede utilizar como parte de una evaluación de pronóstico o diagnóstico de un trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH o que, de forma alternativa, se puede usar en procedimientos para identificar compuestos útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Un gen identificador también puede tener las características de un gen diana o de un gen de ruta (véase a continuación, en la Sección 5.2).

"Patrón identificador", como se usa en el presente documento, se refiere al patrón generado cuando se determina el patrón de expresión de una serie (que puede variar desde dos hasta todos los genes identificadores que existen para un estado dado) de los genes identificadores. Un patrón identificador también se puede usar en procedimientos para identificar compuestos útiles en el tratamiento de trastornos inmunitarios, por ejemplo, evaluando el efecto del compuesto sobre el patrón identificador mostrado normalmente junto con las enfermedades.

"Gen diana", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen expresado diferencialmente implicado en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o en la diferenciación, el mantenimiento y/o la función efectora de las subpoblaciones de forma que la modulación del nivel de la expresión génica diana o de la actividad del producto génico diana puede actuar para mejorar síntomas de trastornos relacionados con subpoblación de linfocitos TH. Por ejemplo, tal modulación puede producir la reducción o bien la estimulación de una o más

subpoblaciones de linfocitos TH, que, a su vez, da lugar a la mejora de los síntomas de un trastorno inmunitario, por ejemplo, de trastorno de subpoblación de linfocitos TH.

"Estimulación", como se usa en el presente documento, se puede referir a un incremento eficaz en el número de células que pertenecen a una población de linfocitos TH, tal como una subpoblación de linfocitos TH, por medio, por ejemplo, de la proliferación de tales células de la subpoblación de linfocitos TH. El término también se puede referir a un incremento en la actividad de células que pertenecen a una subpoblación de linfocitos TH, como se demuestra, por ejemplo, por un incremento por célula en la expresión del patrón de citocinas específico de subpoblación de linfocitos TH.

"Reducción", como se usa en el presente documento, se puede referir a una reducción eficaz en el número de células que pertenecen a una población de linfocitos TH, tal como una subpoblación de linfocitos TH, por medio, por ejemplo, de una disminución de tales células de la subpoblación de linfocitos TH. El término también se puede referir a una disminución en la actividad de células que pertenecen a una subpoblación de linfocitos TH, como se demuestra, por ejemplo, por una disminución por célula en la expresión del patrón de citocinas específico de subpoblación de linfocitos TH.

Los trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH incluyen, por ejemplo, afecciones atópicas, tales como asma y alergia, incluyendo rinitis alérgica, los efectos de patógenos, incluyendo víricos, infección, enfermedades inflamatorias crónicas, soriasis, nefritis glomerular, autoinmunidad específica de órgano, rechazo de injerto y enfermedad de injerto contra huésped. Un gen diana también puede tener las características de un gen identificador y/o de un gen de ruta (véase a continuación, en la Sección 5.2).

5.1.1 Procedimientos para la identificación de genes expresados diferencialmente

Se pueden utilizar muchos procedimientos para la identificación de genes que están implicados en estados de trastornos inmunitarios, por ejemplo, estados de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, y/o que están implicados en la diferenciación, el mantenimiento y la función efectora de las subpoblaciones. En la Sección 5.1.1.1 se describen paradigmas experimentales que se pueden utilizar para la generación de sujetos y de muestras que se pueden usar para la identificación de tales genes. Se puede caracterizar el material generado en categorías de paradigmas para determinar la presencia de secuencias de genes expresados diferencialmente y discutidos a continuación, en la Sección 5.1.1.2.

5.1.1.1 Paradigmas para la identificación de genes expresados diferencialmente

En el presente documento se describen paradigmas que representan modelos de respuestas inmunitarias normales y anormales. Estos paradigmas se pueden utilizar para la identificación de genes que se expresan diferencialmente dentro y entre subpoblaciones de linfocitos TH, incluyendo, pero sin limitarse a subpoblaciones TH1 y TH2. Tales genes pueden estar implicados en, por ejemplo, la diferenciación, el mantenimiento, y/o la función efectora de subpoblaciones de linfocitos TH, y en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Por ejemplo, se pueden inducir linfocitos TH para diferenciarse en estados TH1 o bien TH2, se pueden estimular con, por ejemplo, un antígeno exógeno, y se pueden recoger en diferentes puntos durante el procedimiento para el análisis de expresión génica diferencial.

En una realización de un paradigma de este tipo, denominado en el presente documento "paradigma de linfocito T transgénico", se utilizan animales transgénicos, preferentemente ratones, que se han modificado genéticamente para expresar un receptor de linfocitos T particular, de modo que la población de linfocitos T predominante del sistema inmunitario de un animal transgénico de este tipo sólo reconoce un antígeno. Se prefiere un sistema de este tipo ya que proporciona una fuente para una gran población de linfocitos T idénticos pudiéndose asegurar su indiferenciación, y asegurándose también que se reconoce su respuesta a un único antígeno. Se inducen in vitro linfocitos T cooperadores de un animal transgénico de este tipo, para diferenciarse en subpoblaciones de linfocitos TH tales como subpoblaciones de linfocitos TH1, TH2 o TH0. En una realización específica, se expone un grupo de linfocitos cooperadores T (el grupo TH1) a IL-12, una citocina conocida para inducir diferenciación en el estado TH1, se expone un segundo grupo de linfocitos cooperadores T (el grupo TH2) a IL-4, una citocina conocida para inducir diferenciación en el estado TH2, y se permite que un tercer grupo, por una ausencia de inducción mediada por citocinas, entre en un estado no dirigido por TH.

Se puede utilizar un segundo paradigma, denominado en el presente documento "paradigma de línea celular T", que usa clones de linfocitos TH maduros, tales como líneas celulares TH1 y TH2 y similares a TH1 y similares a TH2, preferentemente líneas celulares humanas. Estas líneas celulares TH pueden incluir, pero no se limitan a las siguientes líneas celulares murinas muy conocidas: Doris, AE7, D10.G4, DAX, D1.1 y CDC25. Estas líneas celulares T se pueden derivar de individuos normales así como de individuos que presentan trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias crónicas y trastornos, tales como enfermedad de Crohn, artritis reactiva, incluyendo enfermedad de Lyme, diabetes dependiente de insulina, autoinmunidad específica de órgano, incluyendo esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Grave, dermatitis por contacto, soriasis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, sarcoidosis, afecciones

atópicas, tales como asma y alergia, incluyendo la rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, incluyendo alergias a alimentos, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, determinadas sensibilidades a patógenos tales como infecciones helmínticas (por ejemplo, leishmaniasis) y determinadas infecciones víricas, incluyendo VIH, e infecciones bacterianas, incluyendo tuberculosis y lepra lepromatosa.

5 Los clones de linfocitos TH se pueden estimular de muchas formas. Estos procedimientos de estimulación incluyen, pero no se limitan a, procedimientos farmacológicos, tales como exposición a ésteres de forbol, ionóforos de calcio, o lectinas (por ejemplo, Concanavalina A), por el tratamiento con anticuerpos dirigidos contra epítopos de receptor de linfocitos T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD3) o exposición, en presencia de una célula presentadora de antígenos (APC) apropiada, a un antígeno que se sabe que los linfocitos TH particulares reconocen. Después de
10 esta estimulación primaria, se pueden mantener las células en cultivo sin estimulación y, por ejemplo, en presencia de IL-2, utilizando técnicas estándar muy conocidas por los expertos en la técnica. Después, se pueden exponer las células a uno o más ciclos adicionales de estimulación y mantenimiento.

También se puede utilizar un tercer paradigma, denominado en el presente documento "paradigma in vivo", para descubrir secuencias de genes expresados diferencialmente. La estimulación in vivo de modelos animales forma la base para este paradigma. Se puede probar que la naturaleza in vivo de la estimulación es especialmente predictiva de las respuestas análogas en pacientes vivos. Se puede llevar a cabo la estimulación por medio de muchos procedimientos. Por ejemplo, a animales, tales como animales transgénicos descritos antes en esta Sección, se les puede inyectar un antígeno apropiado y una citocina apropiada para lograr la diferenciación de linfocitos TH deseada. Después se pueden recoger ganglios linfáticos de drenaje en distintos puntos de tiempo después de la
15 estimulación. Los ganglios linfáticos de, por ejemplo, animales dirigidos por TH1 se pueden comparar con los de animales dirigidos por TH2.

Para este paradigma in vivo se pueden utilizar una amplia variedad de modelos animales, que representan modelos tanto de diferenciación inmunitaria normal como de función así como los que representan trastornos inmunitarios. Por ejemplo, se pueden usar cualquiera de los modelos animales, tanto recombinante como no recombinante,
20 descritos, a continuación, en la Sección 5.7.1.

Se pueden recoger muestras de células durante cualquier punto de un procedimiento de este tipo. Por ejemplo, se pueden obtener células después de cualquier periodo de estimulación y/o cualquier periodo de mantenimiento. Además, se pueden recoger células durante diferentes puntos durante el procedimiento de diferenciación de linfocitos TH. El ARN recogido de tales muestras se puede comparar y analizar de acuerdo con, por ejemplo,
25 procedimientos descritos, a continuación, en la Sección 5.1.1.2. Por ejemplo, después, se puede analizar y comparar el ARN de los grupos TH0, TH1 y The aislado a un punto de tiempo dado. Además, también se puede comparar y analizar el ARN de células estimuladas y no estimuladas dentro de un grupo de linfocitos TH dado. Además, el ARN recogido de linfocitos TH no diferenciados se puede comparar con el ARN recogido de células, en distintas fases durante el procedimiento de diferenciación que finalmente proporciona subpoblaciones de linfocitos TH.

35 **5.1.1.2 Análisis de material de paradigma**

Para identificar genes expresados diferencialmente, se puede aislar ARN, total o bien ARNm, de los linfocitos TH utilizados en paradigmas tales como los descritos en la Sección 5.1.1.1. Se puede utilizar cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione frente al aislamiento de ARNm para la purificación de tales muestras de ARN. Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds., 1987-1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Además, se puede procesar rápidamente un gran número de muestras celulares usando técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el procedimiento de aislamiento de ARN en una única etapa de Chomczynski, P. (1989, patente de EE. UU. N.º 4.843.155), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Se pueden identificar transcritos dentro de las muestras de ARN recogido que representan ARN producido por genes expresados diferencialmente, utilizando muchos procedimientos que son muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar rastreo diferencial (Tedder, T.P. y cols., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:208-212), hibridación sustractiva (Hedrick, S.M. y cols., 1984, Nature 308:149-153; Lee, S.W. y cols., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2825), y, preferentemente, representación diferencial (Liang, P; y Pardee, A.B., 1992, Science 257:967-971; patente de los EE.UU. N.º 5.262.311, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad), para identificar secuencias de ácidos nucleicos derivados de genes que se expresan diferencialmente.

El rastreo diferencial implica el rastreo duplicado de una colección de ADNc en la que se rastrea una copia de la colección con una sonda de ADNc celular total correspondiente a la población de ARNm de un tipo celular mientras que una copia duplicada de la colección de ADNc se rastrea con una sonda de ADNc total correspondiente a la población de ARNm de un segundo tipo celular. Por ejemplo, una sonda de ADNc puede corresponder a una sonda de ADNc celular total de un tipo celular o tejido derivado de un sujeto de control, mientras que la segunda sonda de ADNc puede corresponder a una sonda de ADNc celular total del mismo tipo celular o tejido derivado de un sujeto

experimental. Los clones que se hibridan a una sonda pero no a la otra representan potencialmente clones derivados de genes expresados diferencialmente en el tipo celular de interés en sujetos de control frente a experimentales.

5 En general, las técnicas de hibridación sustractivas implican el aislamiento de ARNm tomado a partir de dos fuentes diferentes, la hibridación del ARNm o ADNc monocatenario transcrito de forma inversa a partir del ARNm aislado, y la retirada de todas las secuencias hibridadas y, por lo tanto bicatenarias. Los restantes ADNc monocatenarios, no hibridados representan potencialmente clones derivados de genes que se expresan diferencialmente entre las dos fuentes de ARNm. Después, estos ADNc bicatenarios se usan como material de partida para la construcción de una colección que comprende clones derivados de genes expresados diferencialmente.

10 La técnica de presentación diferencial es un procedimiento, que utiliza reacción en cadena de la polimerasa (PCR; la realización experimental se representa en Mullis, K.B., 1987, patente de los EE.UUU. N.º 4.683.202) muy conocida, lo que permite la identificación de secuencias derivadas de genes que se expresan diferencialmente. En primer lugar, el ARN aislado se transcribe de forma inversa en ADNc monocatenario, utilizando técnicas estándar que son muy conocidas por los expertos en la técnica. Los cebadores para la reacción de la transcriptasa inversa pueden
15 incluir, pero no se limitan a, cebadores que contienen oligo dT, preferentemente del tipo de cebadores 3' de oligonucleótido descrito a continuación.

A continuación, esta técnica usa pares de cebadores de PCR, como se describe a continuación, que permite la amplificación de clones que representan un subconjunto reproducible de los transcritos de ARN presentes dentro de cualquier célula dada. La utilización de diferentes pares de cebadores permite que se amplifique cada uno de los
20 transcritos de ARNm cebados presentes en una célula. Entre estos transcritos amplificados se pueden identificar los que se han producido a partir de genes expresados diferencialmente.

El cebador de oligonucleótidos en 3' de los pares de cebadores puede contener un tramo de oligo dT de 10-13, preferentemente 11, nucleótidos dT en su extremo 5', que se hibrida a la cola poli(A) de ARNm o al complemento de un ADNc transcrito de forma inversa a partir de una cola de poli(A) de ARNm para incrementar la especificidad del
25 cebador en 3', después, el cebador puede contener uno o más, preferentemente dos, nucleótidos adicionales en su extremo 3'. Ya que, estadísticamente, sólo un subconjunto del ARNm deriva secuencias presentes en la muestra de interés se hibridará a estos cebadores, los nucleótidos adicionales permiten que los cebadores amplifiquen sólo un subconjunto de las secuencias derivadas de ARNm presentes en la muestra de interés. Esto se prefiere ya que permite una visualización y caracterización más cuidadosa y completa de cada una de las bandas que representan
30 secuencias amplificadas.

El cebador en 5' puede contener una secuencia de nucleótidos esperada, estadísticamente, para tener la capacidad para hibridarse a secuencias de ADNc derivadas de las células o tejidos de interés. La secuencia de nucleótidos puede ser una arbitraria, y la longitud del cebador de oligonucleótido en 5' puede variar de desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 15 nucleótidos, siendo preferido aproximadamente 13 nucleótidos.

35 Las secuencias de cebador arbitrarias hacen que las longitudes de los ADNc parciales amplificados producidos sean variables, permitiendo por lo tanto, que se puedan separar diferentes clones usando electroforesis en gel para secuenciación de desnaturalización estándar.

Se deben elegir condiciones para la reacción PCR que optimicen el rendimiento y la especificidad del producto amplificado, y, adicionalmente, que produzcan productos amplificados de longitudes que se puedan resolver
40 utilizando técnicas de electroforesis en gel estándar. Estas condiciones de reacción son muy conocidas por los expertos en la técnica, y parámetros de reacción importantes incluyen, por ejemplo, longitud y secuencia de nucleótidos de cebadores de oligonucleótidos como se discute anteriormente, y temperaturas de las etapas de apareamiento y elongación y tiempos de reacción.

45 El patrón de clones que resultan de la transcripción inversa y de la amplificación del ARNm de dos tipos celulares diferentes se representa por medio de electroforesis en gel de secuenciación y se compara. Los genes expresados diferencialmente se indican por diferencias en los dos patrones de bandas.

Una vez se han identificado potencialmente las secuencias de genes expresados diferencialmente por medio de técnicas en bloque, tales como, por ejemplo, las descritas anteriormente, se debe corroborar teóricamente la expresión diferencial de tales genes expresados diferencialmente. Se puede llevar a cabo la corroboración por
50 medio de, por ejemplo, tales técnicas muy conocidas como análisis de Northern, RT/PCR cuantitativa, o protección de RNasa.

Después de la corroboración, se pueden caracterizar adicionalmente los genes expresados diferencialmente, y se pueden identificar como diana: y/o genes identificadores, como se discute, a continuación, en la Sección 5.3.

55 Se pueden usar las secuencias amplificadas de genes expresados diferencialmente obtenidos a través, por ejemplo, de representación diferencial para aislar clones de longitud completa del gen correspondiente. La porción de

codificación de longitud completa del gen se puede aislar fácilmente, sin experimentación indebida, por técnicas biológicas moleculares muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede marcar el fragmento amplificado expresado diferencialmente aislado y se puede usar para rastrear una colección de ADNc. De forma alternativa, se puede usar el fragmento marcado para rastrear una colección genómica.

- 5 También se puede utilizar tecnología de PCR para aislar secuencias de ADNc de longitud completa. Como se describe, anteriormente, en esta sección, los fragmentos de genes amplificados obtenidos a través de representación diferencial tienen extremos terminales 5' en algún punto aleatorio dentro del gen y normalmente tienen extremos terminales 3' en una posición que corresponde con el extremo 3' de la porción transcrita del gen. Una vez que se obtiene la información de la secuencia de nucleótidos de un fragmento amplificado, se puede obtener el resto del gen (es decir, el extremo 5' del gen, cuando se utiliza representación diferencial) usando, por ejemplo, RT-PCR.

10 En una realización de un procedimiento de este tipo para la identificación y la clonación de secuencias génicas de longitud completa, se puede aislar ARN, siguiendo procedimientos estándar, a partir de un tejido apropiado o de una fuente celular. Después, se puede realizar una reacción de transcripción inversa sobre el ARN usando un cebador de oligonucleótido complementario al ARNm que corresponde con el fragmento amplificado, para el cebado de la síntesis de la primera hebra. Debido a que el primero es anti-paralelo al ARNm, se procederá la extensión hacia el extremo 5' del ARNm. Después, al híbrido de ARN/ADN resultante se le puede "añadir una cola" con guaninas usando una reacción de transferasa terminal estándar, se puede digerir el el híbrido con ARNasa H, y después, se puede cebar la síntesis de la segunda hebra con un cebador poli-C. Usando los dos cebadores, se amplifica la porción 5' del gen usando PCR. Después, se pueden aislar y recombinar las secuencias obtenidas con secuencias previamente aisladas para generar un ADNc de longitud completa de los genes expresados diferencialmente de la invención. Para una revisión de estrategias de clonación y técnicas de ADN recombinantes, véase por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (volúmenes 1-3) Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel y col., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

5.2 Procedimientos para la identificación de genes de ruta

En el presente documento se describen procedimientos de genes de ruta. "Gen de ruta", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen cuyo producto génico presenta la capacidad para interactuar con productos génicos implicados en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o para interactuar con productos génicos que están implicados en la diferenciación, el mantenimiento y/o en la función efectora de subpoblaciones de linfocitos TH. Un gen de ruta se puede expresar diferencialmente y, por lo tanto, puede tener las características de un gen diana y/o identificador, como se describe, anteriormente, en la Sección 5.1.

35 Se puede emplear cualquier procedimiento adecuado para detectar interacciones proteína-proteína para la identificación de productos génicos de ruta entre productos génicos y productos génicos conocidos por estar implicados en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o implicados en la diferenciación, el mantenimiento, y/o la función efectora de la subpoblaciones. Estos productos génicos conocidos pueden ser proteínas celulares o extracelulares. Esos productos génicos que interactúan con tales productos génicos conocidos, representan productos génicos de ruta y los genes que los codifican, representan genes de ruta.

40 Entre los procedimientos tradicionales que se pueden emplear están co-inmunoprecipitación, reticulación y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. La utilización de procedimientos tales como éstos permite la identificación de productos génicos de ruta. Una vez identificado, se puede usar un producto génico de ruta, junto con técnicas estándar, para identificar su correspondiente gen de ruta. Por ejemplo, se puede evaluar al menos una porción de la secuencia de aminoácidos del producto génico de ruta usando técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica, tales como por medio de la técnica de degradación de Edman (véase, por ejemplo, Creighton, 1983, "Proteins: structures and Molecular Principles", W.H. Freeman y Co., N.Y., páginas 34-49). Se puede usar la secuencia de aminoácidos obtenida como una guía para la generación de mezclas de oligonucleótidos que se pueden usar para rastrear secuencias génicas de ruta. Se puede llevar a cabo el rastreo, por ejemplo, por hibridación estándar o por técnicas de PCR. Las técnicas para la generación de mezclas de oligonucleótidos y para el rastreo son muy conocidas. (Véase, por ejemplo, Ausubel, supra., y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, Innis, M. y col., eds. Academic Press, Inc., Nueva York).

55 Adicionalmente, se pueden emplear procedimientos que dan como resultado la identificación simultánea de genes de ruta que codifican proteínas que interactúan con una proteína implicada en estados de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o en la diferenciación, el mantenimiento, y/o la función efectora de la subpoblaciones. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, colecciones de expresión de cebado con proteínas marcadas conocidas porque o que se sabe que están implicadas en los trastornos y/o en la diferenciación, el mantenimiento, y/o la función efectora de la subpoblación, usando esta proteína, de forma similar a la técnica muy conocida de cebado de anticuerpos de colecciones Agt11.

Se describe en detalle un procedimiento que detecta interacciones entre proteínas in vivo, el sistema de doble híbrido, sólo con fines de ilustración y sin limitación. Se ha descrito una versión de este sistema (Chien y cols., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582) y está comercialmente disponible de Clontech (Palo Alto, CA).

5 En resumen, utilizando un sistema de este tipo, se construyen plásmidos que codifican dos proteínas híbridas: uno
 10 consiste en el dominio de unión a ADN de una proteína activadora de transcripción fusionada a una proteína conocida, en este caso, una proteína conocida por estar implicada en la diferenciación de subpoblaciones de linfocitos TH o en la función efectora, o en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos THE, y el otro
 15 consiste en el dominio de activación de la proteína activadora fusionada a una proteína desconocida que se codifica por un ADNc que se ha recombinado en este plásmido como parte de una colección de ADNc. Los plásmidos se transforman en una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que contiene un gen indicador (por ejemplo, lacZ) cuya región reguladora contiene los sitios de unión al activador de la transcripción. Ninguna proteína híbrida sola puede activar la transcripción del gen indicador, el híbrido de dominio de unión a ADN no puede porque no proporciona función de activación, y el híbrido de dominio de activación no puede porque no puede localizar los sitios de unión del activador. La interacción de las dos proteínas híbridas reconstituye la proteína activadora funcional y da como resultado la expresión del gen indicador, que se detecta por un ensayo para determinar el producto génico indicador.

20 Se puede usar el sistema de doble híbrido o la metodología relacionada para rastrear las colecciones de dominio de activación para proteínas que interactúan con un producto génico "cebo" conocido. A modo de ejemplo, y sin limitación, se pueden usar productos génicos conocidos por estar implicados en trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o en la diferenciación, el mantenimiento, y/o la función efectora de la subpoblaciones como los productos génicos cebo. Las secuencias de ADNc o genómicas totales se fusionan al ADN que codifica un dominio de activación. Esta colección y un plásmido que codifica un híbrido del producto génico cebo fusionado al dominio de unión de ADN se cotransforma en una cepa indicadora de levadura, y se rastrean los transformantes resultantes para determinar los que expresan el gen indicador. Por ejemplo, y sin limitación, se
 25 puede clonar el gen cebo en un vector de modo que se fusione traduccionalmente al ADN que codifica el dominio de unión a ADN de la proteína GAL4. Se purifican estas colonias y se aíslan los plásmidos de la colección responsables de la expresión génica indicadora. Después se usa la secuenciación de ADN para identificar las proteínas codificadas por los plásmidos de la colección.

30 Se puede preparar una colección de ADNc de la línea celular a partir de la que se van a detectar las proteínas que interactúan con el producto génico cebo usando procedimientos practicados de forma rutinaria en la técnica. De acuerdo con el sistema particular descrito en el presente documento, por ejemplo, se pueden insertar los fragmentos de ADNc en un vector de modo que estén fusionados traduccionalmente al dominio de activación de GAL4. Esta colección se puede co-transformar junto con el plásmido de fusión gen cebo-GAL4 en una cepa de levadura que contiene un gen lacZ conducido por un promotor que contiene secuencia de activación GAL4. Un ADNc que codifica proteína, fusionado al dominio de activación GAL4, que interactúa con producto génico cebo reconstituirá una proteína GAL4 activa y conduciendo de este modo la expresión del gen lacZ. Se pueden detectar colonias que expresan lacZ por su color azul en presencia de x-gal. Después, se puede purificar el ADNc a partir de estas cepas y, usar para producir y aislar la proteína que interactúa con el gen usando técnicas practicadas de forma rutinaria en la técnica.

40 Una vez se ha identificado y aislado un gen de ruta, se puede caracterizar, por ejemplo, como se discute a continuación, en la Sección 5.3.

5.3 Caracterización de genes expresados diferencialmente y de ruta

45 Se pueden caracterizar genes expresados diferencialmente, tales como los identificados por medio de procedimientos discutidos anteriormente, en la Sección 5.1, y genes de ruta, tales como los identificados por medio de procedimientos discutidos anteriormente; en la Sección 5.2 anterior, así como los genes identificados por medios alternativos, se pueden caracterizar además utilizando, por ejemplo, procedimientos tales como los discutidos en el presente documento. Tales genes se denominarán "genes identificados".

50 Análisis tales como los descritos en el presente documento proporcionan información respecto a la función biológica de los genes identificados. Una evaluación de la función biológica de los genes expresados diferencialmente, además, permitirá su designación como genes diana y/identificadores.

55 Específicamente, cualquiera de los genes expresados diferencialmente cuya caracterización adicional indica que una modulación de la expresión del gen o una modulación de la actividad del producto génico puede mejorar cualquiera de los trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH de interés se designará como "genes diana", como se define, anteriormente, en la Sección 5.1. Tales genes diana y y productos génicos diana, junto con los discutidos a continuación, constituirán el foco de las estrategias para el descubrimiento de compuestos discutidos, a continuación, en la Sección 5.8. Además, tales genes diana, productos génicos diana y/o compuestos de modulación, se pueden usar como parte de los procedimientos de tratamiento de trastornos de subpoblaciones

de linfocitos THE descritos, a continuación, en la Sección 5.9. Tales procedimientos pueden incluir, por ejemplo, procedimientos en los que la subpoblación de linfocitos TH de interés se reduce o se reprime selectivamente, o, de forma alternativa, se estimula o se aumenta.

5 Cualquiera de los genes expresados diferencialmente cuya caracterización adicional indique que tales modulaciones no pueden afectar positivamente a trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH de interés de, pero cuyo patrón de expresión contribuya a un patrón "identificador" de expresión génica correlativo de, por ejemplo, un estado de trastorno relacionado con TH1/TH2, designará un "gen identificador". Los "patrones identificadores" se discutirán con más detalle, a continuación, en la Sección 5.11.1. Se debe indicar que cada uno de los genes diana también puede funcionar como gen identificador, así como pueden todos o una porción de los genes de ruta.

10 Se debe indicar además que también se pueden caracterizar los genes de ruta de acuerdo con técnicas tales como las descritas en el presente documento. Los genes de ruta que proporcionan información, indicando que la modulación de la expresión de los genes o una modulación de la actividad del producto génico puede mejorar cualquier trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH también se designarán como "genes diana".
 15 Tales genes diana y y productos génicos diana, junto con los discutidos a continuación, constituirán el foco de las estrategias para el descubrimiento de compuestos discutidos, a continuación, en la Sección 5.8, y se pueden usar como parte de los procedimientos de tratamiento descritos en la Sección 5.9, a continuación.

En ejemplos en los que una caracterización de los genes de ruta indique que la modulación de la expresión génica o la actividad del producto génico no pueda afectar positivamente a trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH de interés, pero cuya expresión se expresa diferencialmente y contribuye a un patrón identificador de
 20 expresión génica correlativo de, por ejemplo, un estado de trastorno relacionado con TH1/TH2, se pueden designar adicionalmente tales genes de ruta como genes identificadores.

Se pueden utilizar muchas técnicas para caracterizar adicionalmente los genes identificados. En primer lugar, la secuencia de nucleótidos de los genes identificados, que se puede obtener utilizando técnicas estándar muy conocidas para los expertos en la técnica, se puede usar, por ejemplo, para revelar homologías para uno o más
 25 motivos de secuencias conocidos que pueden proporcionar información con respecto a la función biológica del producto génico identificado.

En segundo lugar, se puede llevar a cabo un análisis, del tejido y/o de la distribución del tipo celular del ARNm producido por los genes identificados, utilizando técnicas estándar muy conocidas por los expertos en la técnica. Tales técnicas pueden incluir, por ejemplo, análisis Northern, protección de ARNasa y análisis RT-PCR. Tales
 30 análisis proporcionan información de si, por ejemplo, los genes identificados se expresan en tipos celulares que se espera que contribuya con los trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH específicos de interés. Tales análisis también pueden proporcionar información cuantitativa con respecto a la regulación de ARNm de estado estacionario, datos proporcionados respecto de cuáles de los genes identificados presentan un nivel alto de regulación en tipos celulares que se puede esperar que contribuyan a los trastornos relacionados con
 35 subpoblaciones de linfocitos THE de interés. Adicionalmente, se pueden utilizar técnicas de hibridación in situ estándar para proporcionar información con respecto a cuáles de las células dentro de un tejido dado o de una población de células expresan el gen identificado. Un análisis de este tipo puede proporcionar información con respecto a la actividad biológica de un gen identificado con relación a uno dado. Un trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH en ejemplos en los que se cree que sólo un subconjunto de las células dentro de un
 40 tejido o una población de células, es relevante para el trastorno.

En tercer lugar, se pueden usar las secuencias de los genes identificados, utilizando técnicas estándar, para colocar los genes sobre mapas genéticos, por ejemplo, mapas genéticos de ratón (Copeland, N.G. y Jenkins, N.A., 1991, Trends in Genetics 7:113-118) y de seres humanos (cohen, D., y cols., 1993, Nature 366:698-701). Tal información de mapeo puede proporcionar información con respecto a la importancia de los genes para una enfermedad
 45 humana, por ejemplo, identificando genes que se mapean dentro de regiones genéticas en las que se mapean trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH conocidos. Tales regiones incluyen, por ejemplo, el locus Scl-1 de ratón, que se sospecha que está implicado en Leishmaniasis, o la región cromosómica 5q31.1 humana que contiene uno o más locus que se cree que regulan la producción de IgE de una forma no específica de antígeno, y, por lo tanto, pueden estar implicadas en la alergia, un trastorno relacionado con similares a TH2 (MARsh, D. y cols., 1994, Science 264:1152-1156).
 50

En cuarto lugar, la función biológica de los genes identificados se puede evaluar más directamente utilizando sistemas in vivo e in vitro relevantes. Los sistemas in vivo pueden incluir, pero no se limitan a, sistemas animales que presentan de forma natural los síntomas de trastornos inmunitarios, o los que se han modificado genéticamente para que muestren tales síntomas. Además, estos sistemas pueden incluir sistemas para la caracterización adicional
 55 de la diferenciación del tipo celular y de la función efectora, y pueden incluir, pero no se limitan a, sistemas de animales transgénico tales como los descritos, anteriormente, en la Sección 5.1.1.1, y en la Sección 5.7.1, a continuación. Los sistemas in vitro pueden incluir, pero no se limitan a, sistemas basados en células que comprenden, por ejemplo, tipos celulares Th1 o TH2. Las células de las subpoblaciones de TH pueden ser células

de tipo natural, o pueden ser células de tipo no natural que contienen modificaciones conocidas o que se sospecha que contribuyen al trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos THE de interés. Tales técnicas se discuten en detalle, a continuación, en la Sección 5.7.2.

5 En la caracterización adicional de la función biológica de los genes identificados, se puede modular la expresión de estos genes dentro de los sistemas in vivo e/o in vitro, es decir, sobreexpresados o bien subexpresados en, por ejemplo, animales transgénicos y/o líneas celulares, y después se puede evaluar su efecto posterior sobre el sistema. De forma alternativa, la actividad del producto del gen identificado se puede modular incrementando o bien disminuyendo el nivel de actividad en el sistema in vivo e/o in vitro de interés, y después se ensaya su efecto posterior.

10 La información obtenida a través de tales caracterizaciones puede sugerir procedimientos relevantes para el tratamiento o el control de trastornos inmunitarios, tales como trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, implicando el gen de interés. Por ejemplo, el tratamiento relevante puede incluir no sólo una modulación de la expresión génica y/o de la actividad del producto génico, sino que también puede incluir una reducción o estimulación selectiva de la subpoblación de linfocitos TH de interés. Los procedimientos de
 15 caracterización tales como los descritos en el presente documento pueden indicar si esta modulación debe ser positiva o negativa. Como se usa en el presente documento, "modulación positiva" se refiere a un incremento en la expresión génica o en la actividad del gen o del producto génico de interés, o a una estimulación de una subpoblación de linfocitos TH, con relación a lo observado en ausencia del tratamiento modulador. "Modulación negativa", como se usa en el presente documento, se refiere a una disminución en la expresión génica o en la
 20 actividad, o una reducción de una subpoblación de linfocitos TH, con relación a lo observado en ausencia del tratamiento modulador. La "estimulación" y la "reducción" son, como se definen, anteriormente, en la Sección 3. Los procedimientos de tratamiento se discuten, a continuación, en la Sección 5.9.

5.4 Genes expresados diferencialmente y de ruta

25 En el presente documento se describen genes expresados diferencialmente tales como los identificados en la Sección 5.1.1, anteriormente, y genes de ruta, tales como los identificados en la Sección 5.2, anteriormente. Los genes expresados diferencialmente y de ruta de la invención se enumeran a continuación, en la tabla 1. Las secuencias de los genes expresados diferencialmente se muestran en las FIG. 4A. Las secuencias de nucleótidos identificadas por medio del análisis de presentación diferencial se denominan en el presente documento banda 103. Los genes correspondientes a estas secuencias se denominan en el presente documento como el gen 103. La tabla
 30 1 enumera genes expresados diferencialmente identificados a través, por ejemplo, de paradigmas discutidos, anteriormente, en la Sección 5.1.1.1, y a continuación, en los ejemplos presentados en la Sección 7.

La tabla 1 resume información con respecto a la caracterización adicional de tales genes.

35 En la tabla 1, la columna titulada "Exp. dif." detalla la expresión diferencial característica por la que se ha identificado la secuencia. Bajo esta columna, "TH inducible", se refiere a los casos en los que la expresión diferencial surge de la exposición del tipo celular de interés a un agente que puede dar lugar a una estimulación o activación de linfocitos TH. Estas secuencias, por lo tanto, se expresan diferencialmente en linfocitos TH no diferenciados, parcialmente o totalmente diferenciados, y los genes correspondientes a estas secuencias se expresan en subpoblaciones de linfocitos tanto TH1 como TH2.

40 "TH1", bajo esta columna, se refiere a una secuencia correspondiente a un gen expresado de forma preferente en linfocitos TH1 completamente diferenciados, maduros, con relación a linfocitos TH2. "TH2", bajo esta columna, se refiere a una secuencia correspondiente a un gen expresado de forma preferente en subpoblaciones de linfocitos TH2 completamente diferenciados, maduros, con relación a subpoblaciones de linfocitos TH1. La expresión preferente puede ser cualitativa o cuantitativa, como se describe, anteriormente, en la Sección 5.1.

45 Los patrones de expresión tisulares también se resumen en la tabla 1. La columna titulada "Dist. tejido/célula" enumera tejidos y/o tipos de células en los que se ha sometido a prueba el gen y si se ha observado expresión del gen dentro del tejido o tipo celular. Específicamente, "+" indica ARNm detectable a partir del gen de interés, mientras que "-" se refiere a un ARNm no detectable a partir del gen de interés. A menos que se establezca de otro modo, "+" y "-" se refieren a todas las muestras de un tejido o tipo celular dados sometidos a prueba. "Detectable", como se usa en el presente documento, es como se describe, anteriormente, en la Sección 5.1.

50 Adicionalmente, el locus físico para el que los mapas génicos sobre el mapa cromosómico de humano y/o de ratón se indica en la columna titulada "Locus". Además, en los ejemplos en los que los genes corresponden con genes conocidos por encontrarse en bases de datos de ácidos nucleicos, las referencias (es decir, citas y/o nombre de genes) para tales genes conocidos se enumera en la columna titulada "Ref."

55 Los genes enumerados en la tabla 1 se pueden obtener usando procedimientos de clonación muy conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen pero no se limitan al uso sondas apropiadas para detectar los genes dentro de una colección de ADNc o ADNg (ADN genómico) apropiado. (Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.) Las sondas para las secuencias comunicadas en el presente documento se pueden obtener directamente a partir de clones aislados depositados con el NRRL, como se indica en la tabla 2, a continuación. De forma alternativa, las sondas de oligonucleótidos para los genes se pueden sintetizar basándose en las secuencias de ADN dadas a conocer en el presente documento en las FIG. 4A. Con respecto a los genes comunicados previamente, los oligonucleótidos sintéticos se pueden sintetizar o producir basándose en las secuencias proporcionadas para los genes previamente conocidos descritos en las siguientes referencias: ST-2, T1, Fit-1: Klemenz, R. y cols., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5708-5712; Tominaga, S., 1989, FEBS Lett. 258:301-301; Werenskiold, A.K. y cols., 1989, Mol. Cell. Biol. 9:5207-5214; Tominaga, S. y cols., 1992, Biochem. Biophys. Acta. 1171:215-218; Werenskiold, A.K., 1992, Eur. J. Biochem. 204:1041-1047; Yanagisawa, K. y cols., 1993, FEBS Lett. 318:83-87; y Bergers, G. y cols., 1994, EMBO J. 13:1176-1188.

Las sondas se pueden usar para rastrear colecciones de ADNc preparadas a partir de una célula o una línea celular apropiadas en las que se transcriba el gen. Las líneas celulares apropiadas pueden incluir, por ejemplo, las líneas celulares Dorris, AE7, D10.G4, DAX, D1.1 y CDC25. Además, se pueden usar linfocitos T naturales primarios purificados derivados de cepas transgénicas o bien no transgénicas. De forma alternativa, los genes descritos en el presente documento se pueden clonar a partir de una colección de ADNc construida a partir, por ejemplo, de líneas celulares NIH 3T3 transferidas de forma estable con el gen Ha-ras(EJ), células 5C10, y linfocitos de sangre periférica.

TABLA 1

Genes expresados diferencialmente y de ruta				
Gen	Exp. Dif.	Dist. tejido/célula	Locus	Ref.
103	TH2	(+) TH2 (-) Ganglios linfáticos; bazo; timo; cerebro; pulmón; médula ósea; corazón; bazo.		ref2
² Klemenz, R. y cols., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 5708-5712; Tominaga, S., 1989, FEBS Lett. 258: 301-301; Werenskiold, A.K. y cols., 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 5207-5214; Tominaga, S. y cols., 1992, Biochem. Biophys. Acta. 1121: 215-218; Werenskiold, A.K., 1992, Eur. J. Biochem. 204: 1041-1047; Yanagisawa, K. y cols., 1993, FEBS Lett. 318:83-87; Bergers, G. y cols., 1994, EMBO J. 13: 1176-1188).				

Como se usa en el presente documento, "gen expresado diferencialmente" (es decir, gen diana e identificador) o "gen de ruta" se refiere a (a) un gen que contiene: al menos una de las secuencias de ADN dadas a conocer en el presente documento (como se muestra en las FIG. 4A), (b) cualquier secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos codificada por: las secuencias de ADN dadas a conocer en el presente documento (como se muestra en las FIG. 4A) contenidas dentro de la región codificante del gen a la que pertenecen las secuencias de ADN dadas a conocer en el presente documento (como se muestra en las FIG. 4A) (c) cualquier secuencia de ADN que hibrida el complemento de: las secuencias codificantes dadas a conocer en el presente documento (como se muestra en las FIG. 4A) o contenidas dentro de la región codificante del gen a la que pertenecen las secuencias de ADN dadas a conocer en el presente documento (como se muestra en las FIG. 4A) bajo condiciones altamente restrictivas, por ejemplo, hibridación a ADN unido a filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS), al 7%, EDTA 1 mM a

65°C, y lavado en 0,1xSSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel F.M. y cols., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & sons, Inc., Nueva York, en la p. 2.10.3), y codifica un producto génico funcionalmente equivalente a un producto génico codificado por un gen de (a), anterior; y/o (d) cualquier secuencia de ADN que hibrida al complemento de: las secuencias codificantes dadas a conocer en el presente documento (como se muestra en las FIG. 4A) pertenecientes o contenidas dentro de la región codificante del gen a la que pertenecen las secuencias de ADN dadas a conocer en el presente documento (como se muestra en las FIG. 4A), bajo condiciones menos restrictivas, tales como condiciones moderadamente restrictivas, por ejemplo, lavado en 0,2xSSC/SDS al 0,1% a 42°C (Ausubel y cols., 1989, supra), que aún codifica un producto génico funcionalmente equivalente a un producto génico codificado por un gen de (a), anterior. La invención también incluye variantes degeneradas de secuencias (a), a través de (d).

Además de las secuencias génicas descritas anteriormente, se pueden identificar y aislar homólogos de estas secuencias génicas y/o secuencias codificantes de longitud completa de estos genes, como se puede presentar en la misma o en otras especies, sin experimentación indebida, por técnicas biológicas moleculares muy conocidas en la técnica. Además, pueden existir genes en otros locus genéticos dentro del genoma de las mismas especies que codifican proteínas que tienen una homología extensa para uno o más dominios de estos productos génicos. Estos genes también se pueden identificar por medio de técnicas similares.

Por ejemplo, la secuencia de genes expresados diferencialmente se puede marcar y usar para rastrear una colección de ADNc construida a partir de ARNm obtenido a partir del organismo de interés. Las condiciones de hibridación deben ser de una rigurosidad menor cuando la colección de ADNc se derivó de un organismo diferente del tipo de organismo del que se derivó la secuencia marcada. El rastreo de ADNc también puede identificar clones derivados de transcritos ajustados de forma alternativa en la misma o en o diferentes especies. De forma alternativa, el fragmento marcado se puede usar para rastrear una colección genómica derivada del organismo de interés, de nuevo, usando condiciones apropiadamente rigurosas. Las condiciones de rigurosidad baja serán muy conocidas para los expertos en la técnica, y variarán de forma predictiva dependiendo de los organismos específicos a partir de los que se derivan la colección y las secuencias marcadas. Para que sirva de guía con respecto a estas condiciones véase, por ejemplo, Sambrook y cols., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, N.Y.; y Ausubel y cols., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.).

Además, una secuencia de tipo de gen de ruta o expresada diferencialmente previamente desconocida se puede aislar realizando PCR usando dos grupos de cebadores de oligonucleótidos degenerados diseñados sobre la base de secuencias de aminoácidos dentro del gen de interés. El molde para la reacción se puede obtener por ADNc por transcripción inversa de ARNm preparado a partir de líneas celulares o tejido humano o no humano conocido porque o que se sospecha que expresa un alelo de gen expresado diferencialmente o de ruta. El producto de PCR se puede subclonar y secuenciar para asegurar que las secuencias amplificadas representen las secuencias de una secuencia de ácidos nucleicos de tipo gen expresado diferencialmente o de ruta.

Después, se puede usar el fragmento de PCR para aislar un clon de ADNc de longitud completa por muchos procedimientos. Por ejemplo, se puede usar el fragmento amplificado para rastrear una colección de ADNc de bacteriófago. De forma alternativa, se puede usar el fragmento marcado para rastrear una colección genómica.

También se puede utilizar tecnología de PCR para aislar secuencias de ADNc de longitud completa. Por ejemplo, se puede aislar ARN, siguiendo procedimientos estándar, a partir de una fuente celular o tisular apropiada. Se puede realizar una reacción de transcripción inversa sobre el ARN usando un cebador de oligonucleótido específico para la mayoría de los extremos 5' del fragmento amplificado, para el cebado de la síntesis de la primera hebra. Después, al híbrido de ARN/ADN resultante se le puede "añadir una cola" con guaninas usando una reacción de transferasa terminal estándar, se puede digerir el híbrido con ARNasa H, y después, se puede cebar la síntesis de la segunda hebra con un cebador poli-C. Por tanto, las secuencias de ADNc aguas arriba del fragmento amplificado se pueden aislar fácilmente. Para una revisión de estrategias que se pueden usar, véase por ejemplo, Sambrook y cols., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold springs Harbor Press, N.Y., y Ausubel y cols., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates and wily Interscience, N.Y.).

En los casos en los que el gen expresado diferencialmente o de ruta identificado es el gen normal, o natural, este gen se puede usar para aislar alelos mutantes del gen. Es preferible un aislamiento de este tipo en procedimientos y en trastornos que se sabe que o que se sospecha que tienen una base genética. Se pueden aislar alelos mutantes a partir de individuos que se sabe o bien que se sospecha que tienen un genotipo que contribuye a síntomas relacionados con trastornos de subpoblaciones de linfocitos TH. Después, se pueden utilizar alelos mutantes y productos de alelos mutantes en los sistemas de ensayo terapéutico y diagnóstico descritos a continuación.

Se puede aislar un ADNc de un gen mutante, por ejemplo, usando PCR, una técnica que es muy conocida para los expertos en la técnica. En este caso, la primera hebra de ADNc se puede sintetizar hibridando un oligonucleótido oligo-dt a ARNm aislado a partir de tejido conocido porque, o que se sospecha que, estar expresado en un individuo que porta teóricamente el alelo mutante, y extendiendo la nueva cepa con transcriptasa inversa. Después, se

5 sintetiza la segunda cepa del ADNc usando un oligonucleótido que hibrida específicamente al extremo 5' del gen normal. Usando estos dos cebadores, después se amplifica el producto por medio de PCR, clonado en un vector adecuado, y se somete a análisis de secuencia de ADN a través de procedimientos muy conocidos para los expertos en la técnica. Comparando la secuencia de ADN del gen mutante con la del gen normal, se puede(n) evaluar la(s) mutación/mutaciones responsable(s) de la pérdida o de la alteración de la función del producto génico mutante.

10 De forma alternativa, se puede construir una colección genómica o de ADNc y se puede rastrear usando ADN o ARN, respectivamente, a partir de un tejido conocido porque o que se sospecha que expresa el gen de interés en un individuo sospechoso porque o conocido porque porta el alelo mutante. Después, se puede marcar el gen normal o cualquier fragmento adecuado del mismo y se puede usar como una sonda para identificar el alelo mutante correspondiente en la colección. Después, se puede purificar el clon que contiene este gen a través de procedimientos practicados de forma rutinaria en la técnica, y se puede someter a análisis de secuencias como se describe, anteriormente, en esta sección.

15 Adicionalmente, se puede construir una colección genómica de expresión utilizando ADN a partir de o ADNc sintetizado a partir de un tejido conocido porque o que se sospecha que expresa el gen de interés en un individuo sospechoso porque o conocido porque porta el alelo mutante. De esta forma, los productos génicos preparados por el tejido teóricamente mutante se puede expresar y rastrear usando técnicas de rastreo de anticuerpos estándar junto con anticuerpos obtenidos contra el producto génico normal, como se describe, a continuación, en la Sección 5.6. (Para técnicas de rastreo, véase, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, eds., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.) En los casos en los que los resultados de la mutación en un producto génico expresado con la función alterada (por ejemplo, como resultado de una mutación sin sentido), es probable que un conjunto policlonal de anticuerpos reaccione de forma cruzada con el producto génico mutante. Los clones de la colección detectados por medio de su reacción con tales anticuerpos marcados se pueden purificar y someter a análisis de secuencias como se describe en esta Sección, anteriormente.

5.5 Productos génicos expresados diferencialmente y productos génicos de ruta

25 Los productos génicos expresados diferencialmente y los productos génicos de ruta incluyen aquellas proteínas codificadas por los genes expresados diferencialmente y por los genes de ruta correspondientes a las secuencias génicas descritas en la Sección 5.4, anteriormente.

30 Además, los productos génicos expresados diferencialmente y los productos génicos de ruta pueden incluir proteínas que representan productos génicos funcionalmente equivalentes. Un equivalente tal expresado diferencialmente o un producto génico de ruta puede contener deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias génicas expresadas diferencialmente o por las secuencias génicas de ruta descritas, anteriormente, en la Sección 5.4, pero que dan como resultado un cambio silencioso, produciendo así un producto génico expresado diferencialmente equivalente o un producto génico de ruta equivalente. Las sustituciones aminoacídicas pueden hacerse sobre la base de similaridad en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o sobre la base de la naturaleza anfipática de los restos implicados. Por ejemplo, aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; aminoácidos polares/neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; (c) aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. "Funcionalmente equivalente", como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una proteína capaz de presentar una actividad sustancialmente similar in vivo a los productos génicos diferencialmente expresados endógenos o a los productos génicos de ruta endógenos codificados por las secuencias génicas expresadas diferencialmente o por las secuencias génicas de ruta descritas en la Sección 5.4, anteriormente. Alternativamente, cuando se utiliza como parte de ensayos tales como aquellos descritos, más adelante, en la Sección 5.3, "funcionalmente equivalente" puede hacer referencia a péptidos capaces de interactuar con otras moléculas celulares o extracelulares en una manera sustancialmente similar al modo en que debería la parte correspondiente del producto génico expresado diferencialmente o de ruta.

50 Los péptidos correspondientes a uno o más dominios de los productos génicos expresados diferencialmente o de ruta (por ejemplo, TM, BCD o CD), correspondientes a productos génicos expresados diferencialmente o de ruta truncados o delecionados (por ejemplo, en el caso de productos génicos de tipo receptor, correspondientes a proteínas en las que están los productos génicos expresados diferencialmente o de ruta de longitud completa, correspondientes a un péptido génico expresado diferencialmente o de ruta o a un producto génico expresado diferencialmente o de ruta truncado que se fusiona con una proteína no relacionada también están dentro del ámbito de la invención y pueden diseñarse sobre la base de nucleótidos de genes expresados diferencialmente o de ruta y de secuencias de aminoácidos dadas a conocer en esta Sección y en la Sección 5.4, anteriormente. Tales proteínas de fusión incluyen pero no se limitan a fusiones de IgFC que estabilizan el gen expresado diferencialmente o de ruta y prolongan semivida in vivo; o fusiones a cualquier secuencia de aminoácidos que permita unirse a la proteína de fusión a la membrana celular, permitiendo a los péptidos presentarse en la superficie celular; o fusiones a una enzima, proteína fluorescente, o proteína luminiscente que proporcione una función marcadora.

Otras mutaciones para la secuencia codificante del producto génico expresado diferencialmente o de ruta pueden hacerse para generar polipéptidos que se adecúen mejor para expresión, ampliación, etc., en las células huésped elegidas. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden quitarse o sustituirse con otro aminoácido con el fin de eliminar puentes disulfuro; en el caso de proteínas segregadas o transmembranarias, los sitios de glicosilación engarzados a N pueden alterarse o eliminarse para lograr, por ejemplo, la expresión de un producto homogéneo que se recupera y purifica más fácilmente a partir de huéspedes de levadura que se conocen por hiperglicosilar sitios engarzados a N. Para este fin, una diversidad de sustituciones aminoacídicas en una o ambas de las posiciones aminoacídicas primera o tercera de una cualquiera o más de las secuencias de reconocimiento de glicosilación (N-X-S o N-X-T), y/o una delección de aminoácido en la segunda posición de una cualquiera o más de tales secuencias de reconocimiento prevendrán la glicosilación de la proteína en la secuencia tripeptídica modificada. (Véase, por ejemplo, Miyajima y cols., 1986, EMBO J. 5 (6): 1193-1197).

Los productos génicos expresados diferencialmente o de ruta pueden producirse por técnicas de síntesis o por medio de tecnología del ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Así, se describen en el presente documento procedimientos para preparar los polipéptidos y péptidos de genes expresados diferencialmente o de ruta de la invención como se describen en el presente documento. Primero, los polipéptidos y péptidos de la invención pueden sintetizarse o prepararse por técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Creighton, 1983, "Proteins: Structures and Molecular Principles", W.H. Freeman y Co., N.Y., que se incorporan en el presente documento mediante referencia en su totalidad. Los péptidos pueden, por ejemplo, sintetizarse sobre un soporte sólido o en solución.

Alternativamente, los procedimientos de ADN recombinante que se conocen bien por aquellos expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de proteínas de genes expresados diferencialmente o de ruta y señales de control transcripcionales/traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación in vivo/recombinación genética. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y cols., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. que se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad y en Ausubel, 1989, supra. Alternativamente, el ARN capaz de codificar secuencias proteicas de genes expresados diferencialmente o de ruta puede sintetizarse químicamente usando, por ejemplo, sintetizadores. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M.J. ed., IRL Press, Oxford, que se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

Una diversidad de sistemas de vectores de expresión en huésped pueden utilizarse para expresar las secuencias codificantes de genes expresados diferencialmente o de ruta de la invención. Tales sistemas de expresión en huésped representan vehículos, por los que las secuencias codificantes de interés se pueden producir y subsiguientemente purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos, presentar la proteína de gen expresado diferencialmente o de ruta de la invención in situ. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriofago, ADN de plásmido o ADN de cósmido recombinantes que contienen secuencias codificantes de proteínas de genes expresados diferencialmente o de ruta; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de proteínas de genes expresados diferencialmente o de ruta; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de proteínas de genes expresados diferencialmente o de ruta; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de proteínas de genes expresados diferencialmente o de ruta; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vaccinia).

En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente un número de vectores de expresión dependiendo del uso deseado para la proteína de gen expresado diferencialmente o de ruta que se exprese. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de una proteína tal, para la generación de anticuerpos o para rastrear bibliotecas de péptidos, por ejemplo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pURa78 (Ruther y cols., 1983, EMBO J. 2: 1791), en el que la secuencia codificante de proteína del gen expresado diferencialmente o de ruta puede ligarse individualmente dentro del vector en fase con la región codificante de lacZ de tal forma que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye y Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509); y similares, los vectores pGEX pueden usarse también para expresar polipéptidos exógenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por absorción a perlas de glutatión-agarosa seguida por elución en presencia de glutatión

libre. Los vectores de pGEX están diseñados para incluir trombina o sitios de escisión por la proteasa factor Xa de tal forma que la proteína de gen diana clonado pueda liberarse a partir del resto GST.

5 - En un sistema de insecto, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes exógenos. El virus crece en las células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del gen expresado diferencialmente o de ruta puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y ponerse sometida al control de un promotor AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina). La inserción exitosa de secuencia codificante del gen expresado diferencialmente o de ruta dará como resultado la inactivación del gen de polihedrina y la producción de virus recombinantes no ocluidos - (es decir, virus que carecen de la cobertura proteínica codificada por el gen de polihedrina). Estos virus recombinantes se usan después para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado (por ejemplo, véanse Smith y cols., 1983, J. Viol. 46: 584; Smith, Patente de los EE.UU. N.º 4.215.051).

10 En células huésped de mamíferos, se puede utilizar un número de sistemas de expresión basados en virus. En casos donde un adenovirus se usa como un vector de expresión, la secuencia codificante de gen expresado diferencialmente o de ruta de interés puede estar ligado a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse dentro del genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar proteína de gen expresado diferencialmente o de ruta en huéspedes infectados (por ejemplo, véanse Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655-3659). Se pueden requerir también señales de iniciación específicas para traducción eficiente de secuencias codificantes de genes expresados diferencialmente o de ruta insertados. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En casos donde un gen expresado diferencialmente o de ruta entero, incluyendo su propio codón de iniciación y secuencias adyacentes, está insertado en el vector de expresión apropiado, no puede necesitarse ninguna señal de control traduccional adicional. Sin embargo, en casos donde sólo una parte de la secuencia codificante del gen expresado diferencialmente o de ruta está insertado, se deben proporcionar señales de control traduccional exógenas, incluyendo, quizás, el codón de iniciación de ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con la fase de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar traducción del inserto entero. Estas señales de control traduccional exógenas y codones de iniciación pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de transcripción apropiados, terminadores de transcripción, etc. (véase Bittner y cols., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

15 Además, se puede elegir una cepa de células huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en la manera deseada específica. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y para la modificación de proteínas. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas de huéspedes apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína ajena expresada. Para este fin, las células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito principal, se pueden usar glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen pero no se limitan a CHO, VERO, EHK, HeLa, COS, MDCK, 293,- 3T3, WI38, etc.

20 Para producción de proteínas recombinantes a largo plazo, de alto rendimiento, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de forma estable la proteína del gen expresado diferencialmente o de ruta pueden manipularse. Más que usando vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiada (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, mordeduras de poliadeninación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN ajeno, las células manipuladas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar establemente el plásmido dentro de sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan la proteína del gen expresado diferencialmente o de ruta. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en rastreo y evaluación de compuestos que afectan la actividad endógena de la proteína del gen expresado diferencialmente o de ruta.

25 Puede utilizarse un número de sistemas de selección, incluyendo pero no limitados a los genes de la timidina quinasa (Wigler, y cols., 1977, 11: 223), la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026), y la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy, y cols., 1980, Cell 22: 817) del virus herpes simplex que se pueden emplear en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Asimismo, la resistencia a antimetabolito se puede usar como la base de selección para los genes dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, y cols., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare, y cols., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo,

que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin, y cols., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, y cols., 1984. Gen 30: 147).

Alternativamente, cualquier proteína de fusión puede ser fácilmente purificada utilizando un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se esté empleando. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht y cols. permite la purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht, y cols., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8976). En este sistema, el gen de interés está subclonado dentro un plásmido de recombinación tal que la fase de lectura abierta del gen está condensada traduccionalmente a una marca aminoterminal que consiste en seis residuos de histidina. Extractos de células infectadas con virus vaccinia recombinante se cargan en columnas de ácido nitriloacético Ni^{2+} -agarosa y proteínas marcadas con histidina se eluyen selectivamente con tampones que contienen imidazol.

Cuando se usa como componente en los sistemas de ensayo tales como aquellos descritos en el presente documento, la proteína de gen expresado diferencialmente o de ruta puede estar marcada, bien directamente o bien indirectamente, para facilitar detección de un complejo formado entre la proteína ser proteína génica con 14c, directamente o indirectamente, para facilitar la detección de un complejo formado entre la proteína de gen expresado diferencialmente o de ruta y una sustancia de prueba. Se puede usar cualquiera de una diversidad de sistemas marcadores adecuados incluyendo pero no limitados a radioisótopos tales como ^{125}I ; sistemas marcadores enzimáticos que generan una señal colorimétrica detectable o luz cuando se exponen al sustrato; y marcas fluorescentes.

El etiquetado indirecto implica el uso de una proteína, tal como un anticuerpo marcado, que se une específicamente bien a un producto génico marcado diferencialmente o bien a un producto génico de ruta. Tales anticuerpos incluyen pero no se limitan a policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab.

Donde se usa tecnología de ADN recombinante para producir la proteína génica expresada diferencialmente o de ruta para tales sistemas de ensayo, puede ser ventajoso manipular las proteínas de fusión que pueden facilitar marcado (bien directo o bien indirecto), inmovilización, solubilidad y/o detección.

Las proteínas de fusión, que pueden facilitar solubilidad y/o expresión y pueden incrementar la semivida de la proteína en la sangre, pueden incluir, pero no se limitan a proteínas de fusión con cola de Ig solubles. Los procedimientos para manipular tales proteínas de fusión con cola de Ig solubles se conocen bien por aquellos de habilidad en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 5.116.964, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Adicionalmente, además de la región Ig codificada por el vector IgG1, la parte Fc de la región Ig utilizada se puede modificar, por sustituciones aminoacídicas, para reducir la activación del complemento y la unión de Fc. (Véase, por ejemplo, Patente Europea N.º 239400 B1, 3 de agosto, 1994).

Entre las proteínas de fusión con cola de Ig que se pueden producir están las proteínas de fusión con cola de Ig que contienen productos del gen 103. El producto del gen 103 contenido dentro de tales proteínas de fusión puede comprender, respectivamente, por ejemplo, el dominio extracelular del gen 103 o partes del gen 103, preferentemente partes de unión a ligando, del mismo.

Se conocen las secuencias de aminoácidos de los productos del gen 103. (Véanse, por ejemplo, Klemenz, R. y cols., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5708-5712; Tominaga, S., 1989, FEBS Lett. 258: 301-301; Werenskiold, A.K. y cols., 1989, Mol. Cell. Biol. 9: 5207-5214; Tominaga, S. y cols., 1992, Biochem. Biophys. Acta. 1171: 215-218; Werenskiold, A.K., 1992, Eur. J. Biochem. 204: 1041-1047; Yanagisawa, K. y cols., 1993, FEBS Lett. 318: 83-87; Bergers, G. y cols., 1994, EMBO J. 13: 1176-1188). Adicionalmente, como se indica en la FIG. 4B, se conocen también los residuos de aminoácidos que delinear los dominios extracelulares, transmembranarios y citoplásmicos de los productos del gen 103 se conocen también. Por lo tanto, utilizando técnicas bien conocidas, alguien de habilidad en la técnica sería capaz fácilmente de producir tales proteínas de fusión de productos de gen 103 con cola de Ig solubles. El ejemplo presentado más adelante, en la Sección 10, más adelante, describe la construcción de una proteína de fusión producto de gen 103-Ig.

5.6. Anticuerpos específicos para productos génicos expresados diferencialmente o productos génicos de ruta

En el presente documento se describen procedimientos para la producción de anticuerpos capaz de reconocer específicamente uno o más epitopos de producto génico expresado diferencialmente o de ruta. Tales anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (MAbs), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena individual, fragmentos Fab, fragmentos F(ab)'_2 , fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epitopo de cualquiera de los anteriores. Las colas de Ig de tales anticuerpos pueden modificarse para reducir la activación del complemento y la unión de Fc. (Véase, por ejemplo, N.º de Patente Europea 239400 B1, 3 de agosto, 1994).

Tales anticuerpos pueden utilizarse, por ejemplo, en la detección de un producto de gen identificador, diana, o de ruta en una muestra biológica, y se pueden usar como parte de técnicas de diagnóstico. Alternativamente, tales anticuerpos pueden utilizarse como parte de un procedimiento de tratamiento de trastorno inmunitario, como se describe, más adelante, en la Sección 5.9. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse para modular actividad génica diana, puede usarse para modular diferenciación de subpoblación de linfocitos TH, función de mantenimiento y/o función efectora, o, en el caso de anticuerpos dirigidos a epitopos de superficies celulares, se pueden usar para aislar una subpoblación de linfocitos TH de interés, bien para propósitos de disminución o bien para propósitos de aumento.

Para la producción de anticuerpos para un gen expresado diferencialmente o para un gen de ruta, se pueden inmunizar diversos animales por inyección con una proteína de gen expresado diferencialmente o de gen de ruta, o con una parte de la misma. Tales animales huésped pueden incluir pero no se limitan a conejos, ratones y ratas, para nombrar algunos. Pueden usarse varios coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del huésped, incluyendo pero no limitados a, coadyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de los animales inmunizados con un antígeno, tales como producto de gen diana, o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, los animales huésped tales como aquellos descritos anteriormente, se pueden inmunizar por inyección con producto de gen expresado diferencialmente o de ruta suplementado con coadyuvantes como se describe anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular, se pueden obtener por cualquier técnica que se proporcione para la producción de moléculas de anticuerpo por líneas de células continuas en cultivo. Estos incluyen, pero no se limitan a la técnica de hibridoma de Kohler y Milstein, (1975, *Nature* 256: 495-497; y Patente de los Estados Unidos 4.376.110), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor y cols., 1983, *Immunology Today* 4: 72; Cole y cols., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030), y la técnica de EBV-hibridoma (Cole y cols., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce la mAb de esta invención puede cultivarse in vitro o in vivo. La producción de altas titulaciones de mAb in vivo hace de este el procedimiento de producción preferido actualmente.

Además, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y cols., 1964, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851-6855; Neuberger y cols., 1984, *Nature*, 312: 604-608; Takeda y cols., 1985, *Nature*, 314: 452-454; Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567) ajustando los genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno adecuada conjuntamente con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo se derivan de especies animales diferentes, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena individual (Patente de los Estados Unidos N.º 4.946.778; Ave, 1988, *Science* 242: 423-426; Huston y cols., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; y Ward y cols., 1989, *Nature* 334: 544-546) y para fabricar anticuerpos monoclonales, humanizados (Patente de los Estados Unidos N.º 5.225.539) se pueden utilizar para producir anticuerpos de productos génicos expresados anti-diferencialmente o anti-ruta.

Fragmentos de anticuerpo que reconocen epitopos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a: los fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse por digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que puede generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, las bibliotecas de expresión de Fab pueden construirse (Huse y cols., 1989, *Science*, 246: 1275-1281) para permitir identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Los anticuerpos para los productos génicos expresados diferencialmente o de ruta, pueden, a su vez, usarse para generar anticuerpos anti-idiotípicos que "imitan" tales productos génicos, usando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Greenspan y Bona, 1993, *FASEB J* 7 (5): 437-444, y Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147 (8): 2429; 2438). Por ejemplo, en el caso de anticuerpos para moléculas de tipo receptor (por ejemplo, productos de los genes 10, 103 y 200) que se unen a la ECD e inhiben competitivamente la unión de ligando al receptor pueden usarse para generar anti-idiotipos que imitan a la ECD y, por lo tanto, se unen y neutralizan al ligando. Tales anti-idiotipos neutralizantes o fragmentos Fab de tales anti-idiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH.

5.7. Sistemas de modelos basados en células y de modelos basados en animales

Se describen en el presente documento sistemas basados en células y sistemas basados en animales que actúan como modelos para trastornos inmunitarios y para modelos de diferenciación, mantenimiento y/o función efectora de subpoblaciones de linfocitos TH. Estos sistemas pueden usarse en una diversidad de solicitudes. Por ejemplo, los sistemas modelo basados en animales se pueden utilizar para identificar diferencialmente genes expresados por medio del paradigma in vivo descrito, anteriormente, en la Sección 5.1.1.1. Los sistemas de modelo basados en células y basados en animales se pueden usar también para caracterizar adicionalmente genes expresados diferencialmente y de ruta, como se describe, anteriormente, en la Sección 5.3. Tal caracterización adicional puede, por ejemplo, indicar que un gen expresado diferencialmente es un gen diana. Segundo, tales ensayos se pueden utilizar como parte de estrategias de rastreo diseñadas para identificar compuestos que son capaces de mejorar síntomas de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos T, como se describe más adelante. Por lo tanto, los modelos basados en animales y en células se pueden usar para identificar fármacos; productos farmacéuticos, terapias e intervenciones que pueden ser eficaces en tratar trastornos inmunes tales como trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Además, como se describe en detalle, más adelante, en la Sección 5.10.1, tales modelos animales se pueden usar para determinar la DL₅₀ y la DE₅₀ en sujetos animales y tales datos pueden usarse para determinar la eficacia in vivo de los tratamientos de trastornos inmunes potenciales.

5.7.1 Sistemas basados en animales

Los sistemas basados en modelos animales de trastornos relacionados con subpoblaciones de células TH pueden incluir tanto animales no recombinantes así como animal transgénico manipulado recombinantemente.

Los modelos animales para trastornos relacionados con subpoblación de células TH pueden incluir, por ejemplo, modelos genéticos. Por ejemplo, tales modelos animales pueden incluir modelos de resistencia a Leishmania, modelos de encefalomiелitis alérgica experimental y ratones F1 (BALB/c Cr x DEA/2Cr). Estos últimos ratones desarrollan una enfermedad diseminada mortal por infección sistémica con *Candida albicans* virulentas asociadas con respuestas similares a las de TH2 fuertes. Adicionalmente, un modelo de ratón bien conocido para asma se puede utilizar para estudiar la mejora de los síntomas causados por una respuesta similar a TH2. (Véase, por ejemplo, Lukacs, N.W. y cols., 1994, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 10: 526-532; Gavett, S.H. y cols., 1994, Am. J. Cell Mol. Biol. 10: 587-593). Adicionalmente, el modelo animal, síndrome de inmunodeficiencia adquirida murina (SIDAM; Kanagawa, B. y cols., 1993, Science 262: 240 Makino, M. y cols., 1990, J. Imm. 144: 4347) puede utilizarse para tales estudios.

Alternativamente, tales modelos animales bien conocidos como ratones SCIDhu (véase por ejemplo, Kenshima, H. y cols., 1994, Curr. Opin. Imm. 6327-333) que representan un modelo in vivo del sistema hematolinfoide humano, pueden utilizarse. Además, la técnica de complementación del blastocisto deficiente en RAG-2 (Chen, J. y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4528-4532; Shinkai, Y. y cols., 1992, 68: 855-867) se puede utilizar para producir ratones que contengan, por ejemplo, linfocitos humanizados y/o que expresen secuencias génicas diana. Aun adicionalmente, las técnicas de marcar como diana dirigidas específicamente a células T, por ejemplo, la técnica de Gu y cols. (Gu, H. y cols., 1994, Science 265: 103-106) se pueden utilizar para producir animales que contienen transgenes sólo en poblaciones de linfocitos T.

Modelos animales que muestran síntomas similares a trastornos relacionados con subpoblación de células TH se pueden manipular utilizando, por ejemplo, secuencias génicas tales como aquellas descritas, anteriormente, en la sección 5.4, en conjunción con técnicas para producir animales transgénicos que se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, secuencias de genes diana se pueden introducir en, y sobreexpresarse y/o expresarse de forma incorrecta en el genoma del animal de interés, o, si están presentes secuencias génicas diana endógenas, pueden bien sobreexpresarse, bien expresarse de forma incorrecta, o bien, alternativamente, pueden desbaratarse con el fin de subexpresar o inactivar la expresión de gen diana. La construcción y caracterización de animales transgénicos en gen 103 se describe en la Sección 11, más adelante.

Con el fin de sobreexpresar o expresar de forma incorrecta una secuencia génica diana, la parte codificante de la secuencia génica diana puede estar ligada a una secuencia reguladora que es capaz de dirigir expresión génica de nivel alto o expresión en un tipo celular en el que el gen no se expresa normalmente en el animal y/o tipo celular de interés. Tales regiones reguladoras serán bien conocidas para aquellos de habilidad en la técnica y se pueden utilizar en ausencia de experimentación indebida.

Para subexpresión de una secuencia génica diana endógena, una secuencia tal puede aislarse y manipularse de tal forma que cuando se reintroduzca en el genoma del animal de interés, los alelos de genes diana endógenos se inactiven. Preferentemente, la secuencia génica diana manipulada se introduce por medio de marcado como diana del gen de tal forma que la secuencia endógena se desbarata tras la integración de la secuencia génica diana manipulada dentro del genoma del animal. El marcado genético se discutió, más adelante, en esta Sección. ,

Los animales de cualquier especie, incluyendo, pero no limitados a, ratones, ratas, conejos, cobayas, cerdos, microcerdos, cabras y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, monos ardilla y chimpancés se pueden usar para generar modelos animales de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH.

5 Cualquier técnica conocida en la técnica se puede usar para introducir un transgén de gen diana dentro de animales para producir las líneas fundadoras de animales transgénicos. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a microinyección pronuclear (Hoppe, P.C. y Wagner, T.E., 1989, Patente de los EE.UU. N.º 4.873.191); transferencia de genes mediados por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten y cols., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152); marcado como diana de genes en células madre embrionarias (Thompson y cols., 1989, 56: 313-321); electroporación de los embriones (Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3: 1803-1814); y transferencia génica mediada por esperma (Lavitrano y cols., 1989, 57: 717-723); etc. Para una revisión de tales técnicas, véase Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

15 La presente invención estipula animales transgénicos que llevan el transgén en todas sus células, así como animales que llevan el transgén en algunas, pero no en todas sus células, es decir, animales mosaico. (Véanse, por ejemplo, técnicas descritas por Jakobovits, 1994, Curr. Biol. 4: 761-763). El transgén puede integrarse como un transgén único o en concatámeros, por ejemplo, formaciones en tándem cabeza-cabeza o cabeza-cola. El transgén también puede introducirse selectivamente dentro y activarse en un tipo celular particular siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Lasko y cols. (Lasko, M. y cols., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236). Las secuencias reguladoras requeridas para una activación específica de tipo celular dependerán del tipo celular particular de interés, y serán patentes para expertos en la técnica.

20 Cuando se desea que el transgén del gen diana se integre dentro del sitio cromosómico del gen diana endógeno, se prefiere marcar como diana el gen. Brevemente, cuando una técnica tal está utilizándose, los vectores que contienen algunas secuencias de nucleótidos homólogas al gen diana endógeno de interés se diseñan para el propósito de integrarse, por medio de recombinación homóloga con secuencias cromosómicas, dentro y desbaratando la función de, la secuencia de nucleótidos del gen diana endógeno. El transgén también puede introducirse selectivamente dentro de un tipo celular en particular, inactivando así el gen endógeno de interés en sólo ese tipo celular, siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Gu y cols. (Gu, H. y cols., 1994, Science 265: 103-106). Las secuencias reguladoras requeridas para una inactivación específica de tipo celular tal dependerán del tipo celular particular de interés y serán patentes para aquellos de habilidad en la técnica.

30 Una vez se han generado los animales transgénicos, la expresión del gen diana recombinante y de la proteína se puede ensayar utilizando técnicas estándar. El rastreo inicial puede llevarse a cabo por análisis de bandas de Southern o por técnicas de PCR para analizar tejidos animales para ensayar si la integración del transgén puede tener lugar. El nivel de expresión de mRNA del transgén en los tejidos de los animales transgénicos también puede evaluarse usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a análisis de bandas de Northern de muestras de tejidos obtenidas del animal, análisis de hibridación in situ y RT-PCR. Muestras de tejidos que expresan gen diana, pueden evaluarse también inmunocitoquímicamente usando anticuerpos específicos para el producto del gen transgén del gen diana de interés.

40 Los animales transgénicos en el gen diana que expresan el ARNm del gen diana o el péptido transgénico del gen diana (detectado inmunológicamente usando anticuerpos dirigidos contra los epitopos del producto del gen diana) a niveles fácilmente detectables pueden evaluarse adicionalmente para identificar aquellos animales que manifiestan síntomas parecidos al trastorno relacionado con la subpoblación de linfocitos TH característicos, o presentan fenotipos de diferenciación de subpoblación de linfocitos TH característicos. Los síntomas del trastorno similar a los relacionados con TH1 pueden incluir, por ejemplo, aquellos asociados con enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como enfermedad de Crohn, artritis reactiva, incluyendo enfermedad de Lyme, diabetes dependiente de insulina, autoinmunidad específica de órganos, incluyendo esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves, dermatitis de contacto, soriasis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped y sarcoidosis. Los síntomas de trastornos similares a los relacionados con TH2 pueden incluir, aquellos asociados con afecciones atópicas, tales como asma y alergia, incluyendo rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, incluyendo las alergias alimentarias, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, ciertas sensibilidades a patógenos tales como infecciones helmínticas (por ejemplo, leishmaniasis) y ciertas infecciones víricas, incluyendo el VIH y bacterianas, incluyendo tuberculosis y lepra lepromatosa.

55 Además, tipos celulares específicos dentro de animales transgénicos se pueden analizar y someter a ensayos en busca de característica de fenotipos celulares de los trastornos relacionados con subpoblación de linfocitos TH. Tales fenotipos celulares pueden incluir, por ejemplo, característica de expresión de citoquina de la subpoblación de linfocitos TH de interés. Adicionalmente, tales fenotipos celulares pueden incluir una valoración de un patrón de expresión indicador del tipo celular particular y su comparación con perfiles de expresión indicadores conocidos del tipo celular particular en animales que presentan trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Tales animales transgénicos sirven como sistemas de modelos adecuados para trastornos relacionados con células TH.

Una vez se producen animales fundadores transgénicos del gen diana (es decir, aquellos animales que expresan proteínas de genes diana en células o tejidos de interés y que, preferentemente, muestran síntomas de los trastornos relacionados con subpoblación de células TH), éstos pueden criarse, cruzarse endogámicamente, cruzarse exogámicamente, o entrecruzarse para producir colonias del animal particular. Ejemplos de tales estrategias de cría incluyen pero no se limitan a: cruzamiento exogámico de animales fundadores con más de un sitio de integración con el fin de establecer líneas separadas; cruzamiento endogámico de líneas separadas con el fin de producir transgénicos de genes diana compuestos que expresen el transgén de gen diana de interés a niveles más altos debido a los efectos de expresión aditiva de cada transgén de gen diana; cruzamiento de animales transgénico heterocigotos para producir animales homocigotos para un sitio de integración dado con el fin tanto de aumentar expresión como de eliminar la posible necesidad para rastreo de animales por análisis de ADN; cruce de líneas homocigóticas separadas para producir líneas heterocigóticas u homocigóticas; criar animales para antecedentes genéticos de endogamia diferentes tal como para examinar efectos de modificar alelos en expresión del transgén de gen diana y el desarrollo de los síntomas similares al trastorno relacionados con subpoblación de células TH. Un enfoque tal es cruzar los animales fundadores transgénicos en gen diana con una cepa natural para producir una generación F1 que presenta síntomas similares al trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH, tales como aquellos descritos anteriormente. La generación F1 puede entonces cruzarse endogámicamente con el fin de desarrollar una línea homocigótica, si se encuentra que los animales transgénicos de gen diana homocigotos son viables.

5.7.2. Ensayos basados en células

Las células que contienen y expresan secuencias de genes diana que codifican proteína de de gen diana y adicionalmente presentan fenotipos celulares asociados a trastorno de subpoblaciones relacionadas de interés, pueden utilizarse para identificar compuestos que presentan una capacidad para mejorar síntomas de trastornos relacionados con subpoblaciones de células TH. Los fenotipos celulares que pueden indicar una capacidad de mejorar síntomas de trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH pueden incluir, por ejemplo, una inhibición o potenciación de citocina o expresión de marcador de superficie celular asociado con la subpoblación de células TH de interés, o, alternativamente, una inhibición o potenciación de subpoblaciones de linfocitos TH específicos.

Además, el patrón indicador de expresión génica de células de interés puede analizarse y compararse con el patrón indicador de trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH. Aquellos compuestos que causan que las células que presentan fenotipos celulares similares al trastorno relacionado con la subpoblación de linfocitos TH produzcan un patrón indicador que se asemeje más cercanamente a un patrón indicador normal para la célula de interés se pueden considerar candidatos para realización de pruebas adicionales respecto a una capacidad para mejorar los síntomas de trastorno relacionado con subpoblación de células TH.

Las células que se pueden utilizar para tales ensayos pueden, por ejemplo, incluir líneas celulares no recombinantes, tales como líneas celulares Dorris, AE7, D10.G4, DAX, D1.1 y CDC25. Además, se pueden usar también linfocitos T no inmunizados primarios purificados de derivados bien de cepas transgénicas o bien de cepas no transgénicas.

Adicionalmente, las células que se pueden usar para tales ensayos pueden incluir también líneas celulares transgénicas, recombinantes. Por ejemplo, los modelos animales de trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH de la invención, discutida, anteriormente, en la sección 5.7.1, puede utilizarse para generar, por ejemplo, líneas celulares similares a TH1 o similares a TH2 que pueden utilizarse como modelos de cultivos celulares para el trastorno de interés. Aunque se pueden utilizar cultivos primarios derivados de animales transgénicos con trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH, se prefiere la generación de líneas celulares continuas. Para ejemplos de técnicas que se pueden usar para derivar una línea de células continua a partir de los animales transgénicos, véase Small y col, 1985, Mol. Cell Biol. 5:642-648

Alternativamente, las células de un tipo celular conocido que están implicadas en trastornos relacionados con subpoblación en células TH se pueden transfectar con secuencias capaces de incrementar o decrecer las cantidad de expresión de gen diana dentro de la célula. Por ejemplo, secuencias de genes diana pueden introducirse dentro de y sobreexpresarse en, el genoma de las células de interés, o, si están presentes secuencias de genes diana, pueden bien sobreexpresarse o, alternativamente, pueden desbaratarse con el fin de subexpresar o inactivar expresión de genes diana inactivados.

Con el fin de sobreexpresar una secuencia de gen diana, la parte codificante de la secuencia de gen diana puede estar ligada a una secuencia reguladora que es capaz de dirigir expresión génica en el tipo de célula de interés. Tales regiones reguladoras serán bien conocidas para aquellos de habilidad en la técnica y se pueden utilizar en ausencia de experimentación indebida.

Para subexpresión de una secuencia de genes diana endógena, una secuencia tal puede estar aislada y manipularse de tal forma que cuando se reintroduce en el genoma del tipo celular de interés, los alelos del gen

diana endógenos se inactivarán. Preferentemente, la secuencia génica diana manipulada se introduce por medio de marcado como diana de genes de tal forma que la secuencia diana endógena se desbarata tras la integración de la secuencia de genes diana manipulada dentro del genoma de la célula. El marcado de genes como diana se discute, anteriormente, en la Sección 5.7.1.

- 5 La transfección de ácidos nucleicos de secuencia de genes diana puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar. Véase, por ejemplo, Ausubel, 1989, supra. Las células transfectadas se evaluarían para la presencia de secuencias génicas diana recombinantes, para expresión y acumulación de ARNm de genes diana y para la presencia de producción de proteínas de genes diana recombinantes. En casos en los que se desea un descenso en expresión del gen diana, las técnicas estándar pueden usarse para demostrar si un descenso en la expresión del gen endógeno y/o en producción de producto de gen diana se logra.

5.8. Ensayos de rastreo para compuestos que interaccionan con el producto del gen diana

- 15 Los siguientes ensayos se diseñan para identificar compuestos que se unen a productos génicos diana, se unen a otras proteínas celulares que interaccionan con un producto de gen diana y a compuestos que interfieren con la interacción del producto del gen diana con otras proteínas celulares. Por ejemplo, en el caso de productos del 103, que son o son se predice que son proteínas de tipo receptor transmembranario, tales técnicas pueden identificar ligandos para tales receptores. Un ligando de producto del gen 103 puede, por ejemplo, actuar como la base para mejora de tales trastornos específicos similares a TH2 como asma o alergia, dado que la expresión del gen 103 es específica de TH2.

- 20 Los compuestos pueden incluir, pero no se limitan a, otras proteínas celulares. Adicionalmente, tales compuestos puede incluir, pero no se limitan a, péptidos tales como, por ejemplo, péptidos solubles, incluyendo, pero no limitados a, péptidos de fusión con cola de Ig, que comprenden partes extracelulares de receptores transmembranarios de producto de gen diana y miembros de bibliotecas de péptidos aleatorios (véase, por ejemplo., Lam, K.S. y cols., 1991, Nature 354: 82-84; Houghten, R. y cols., 1991, Nature 354: 84-85) hecha de aminoácidos de configuración D y configuración L, fosfopéptidos (incluyendo pero no limitados a miembros de librerías de fosfopéptidos aleatorias o parcialmente degeneradas, dirigidas; véase, por ejemplo, Songyang, Z. y cols., 1993, Cell 72: 767-778), anticuerpos (incluyendo, pero no limitados a anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, anti-idiotípicos, quiméricos o anticuerpos de cadena única y fragmentos de bibliotecas de expresión FAb, F(ab')₂ y FAb y fragmentos de unión a epitopos de los mismos) y moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas. En el caso de moléculas diana de tipo receptor, tales compuestos pueden incluir moléculas orgánicas (por ejemplo, peptidomiméticos) que se unen a la ECD y alguno imita la actividad activada por el ligando natural (es decir, agonistas); así como péptidos, anticuerpos o fragmentos ellas, y otros compuestos orgánicos que imitan el ECD (o una parte de las mismas) y se unen a un ligando natural de "neutralizar".

- 35 La modelización por ordenador y las técnicas de búsqueda permiten la identificación de compuestos, o la mejora de compuestos ya identificados, que pueden modular la expresión o actividad de genes diana o la expresión o actividad de genes de ruta. Habiendo identificado un compuesto o composición tal, se identifican los sitios activos o las regiones activas.

- 40 En el caso de compuestos que afectan a moléculas receptoras, tales sitios activos pueden ser típicamente sitios de unión a ligando, tales como los dominios de interacción de ligando con receptor por sí mismo. El sitio activo se puede identificar usando procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, procedimientos de las secuencias de aminoácidos de péptidos, procedimientos de las secuencias de nucleótidos de ácidos nucleicos o procedimientos del estudio de complejos del compuesto o de la composición relevante con su ligando natural. En el último caso, se pueden usar procedimientos químicos o cristalográficos de rayos X para encontrar donde en el factor se encuentra el ligando que forma el complejo.

- 45 A continuación, se determina la estructura geométrica tridimensional del sitio activo. Esto se puede hacer por procedimientos conocidos, incluyendo cristalografía de rayos X, que puede determinar una estructura molecular completa. Por otro lado, se puede usar RMN sólida o líquida para determinar ciertas distancias intramoleculares. Cualquier otro procedimiento experimental de determinación de estructura puede usarse para obtener estructuras geométricas parciales o completas. Las estructuras geométricas pueden medirse con un ligando que forma complejo, natural artificial, que puede incrementar la exactitud de la estructura de sitio activo determinado.

- 50 Si se determina una estructura incompleta o insuficientemente exacta, los procedimientos de modelización numérica basada en ordenadores se pueden usar para completar la estructura o incrementar su seguridad. Se puede usar cualquier procedimiento de modelización reconocido, incluyendo modelos parametrizados específicos para biopolímeros particulares tales como proteínas o ácidos nucleicos, dinámicas moleculares basadas en movimientos moleculares computados, modelos mecánicos estadísticos basados en ensamblajes moleculares, o modelos combinados. Para la mayoría de tipos de modelos animales, los campos de fuerza moleculares estándar, que representan las fuerzas entre átomos y grupos constituyentes, son necesarios y se pueden seleccionar a partir de campos de fuerza conocidos en química física. Las estructuras experimentales incompletas o menos seguras

pueden servir como limitaciones en las estructuras completas y más seguras computadas por estos procedimientos de modelización.

Finalmente, habiendo determinado la estructura del sitio activo, bien experimentalmente, bien por modelización, o bien por una combinación, los compuestos candidatos a modulación se pueden identificar registrando bases de datos que contienen compuestos junto con información de su estructura molecular. Una búsqueda tal busca compuestos que tienen estructuras que se unen a la estructura del sitio activo determinado y que interactúan con los grupos que definen el sitio activo. Una búsqueda tal puede ser manual, pero es preferentemente asistida por ordenador. Estos compuestos encontrados a partir de esta búsqueda son productos génicos diana o productos génicos de ruta potenciales que modulan compuestos.

Alternativamente, estos procedimientos se pueden usar para identificar compuestos moduladores mejorados a partir de un compuesto modulador o ligando ya conocido. La composición del compuesto conocido puede modificarse y los efectos estructurales de modificación se pueden determinar usando los procedimientos de modelización experimentales y por ordenador descritos anteriormente aplicados a la nueva composición. La estructura alterada se compara entonces con la estructura del sitio activo de los compuestos para determinar si resulta un ajuste o una interacción incrementada. De esta manera las variaciones sistemáticas en composición, tales como grupos salientes que varían, pueden evaluarse rápidamente para obtener compuestos o de modulación modificada o ligandos de especificidad o actividad mejorada.

Procedimientos de modelización experimentales y por ordenador útiles para identificar compuestos de modulación basados en identificación de los sitios activos de genes diana o de ruta o productos génicos y factores relacionados con la traducción y la transcripción serán patentes para aquellos de habilidad en la técnica.

Ejemplos de sistemas de modelización molecular son los programas CHARMM y QUANTA (Polygen Corporation, Waltham, MA). CHARMM lleva a cabo la minimización de energía y las funciones dinámicas moleculares. QUANTA lleva a cabo la construcción, modelización gráfica y análisis de estructura molecular. QUANTA permite construcción interactiva, modificación, visualización y análisis del comportamiento de las células unas con otras.

Un número de artículos revisan modelización por ordenador de fármacos que interactúan con proteínas específicas, tales como Rotivinnen, y cols., 1988, Acta Pharmaceutical Fennica 97: 159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (16 de junio, 1988); McKinaly y Rossmann, 1989. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 111-122; Perry y Davies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design páginas 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis y Dean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236: 125-140 y 141-162; y, con respecto a un receptor modelo para componentes de ácido nucleico, Askew, y cols., 1989, J. Am. Chem. Soc. 111: 1082-1090. Otros programas de ordenador que rastrean y representan gráficamente productos químicos están disponibles de compañías tales como BioDesign, Inc. (Pasadena, CA.), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canadá) e Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario). Aunque estos están diseñados principalmente para aplicación a fármacos específicos a proteínas particulares, pueden adaptarse a diseño de fármacos específicos a regiones de ADN o ARN, una vez esa región se identifica.

Aunque se describen generalmente anteriormente con referencia al diseño y generación de compuestos que podrían alterar la unión, alguien podría también rastrear librerías de compuestos conocidos, incluyendo productos naturales o productos químicos sintéticos y materiales biológicamente activos, incluyendo proteínas, para compuestos que son inhibidores o activadores.

Los compuestos identificados por medio de ensayos tales como aquellos descritos en el presente documento pueden ser útiles, por ejemplo, en elaborar la función biológica del producto de gen diana y para mejorar los síntomas de trastornos inmunes. En casos, por ejemplo, en los que una situación de trastorno relacionada con subpoblación de células TH resulta de un nivel general más bajo de expresión de genes diana, productos génicos diana, y/o la actividad del producto de gen diana en una célula o tejido implicado en un trastorno tal, los compuestos que interactúan con el producto de gen diana pueden incluir unos que acentúan o amplifican la actividad de la proteína del gen diana unida. Tales compuestos deberían provocar un incremento eficaz en el nivel de actividad de gen diana, mejorando así los síntomas. En casos en los que mutaciones dentro del gen diana causen las proteínas de gen diana anómalo que se fabrican que tienen un efecto deletéreo que conduce a un trastorno relacionado con subpoblación celular TH, o, alternativamente, en casos en los que la actividad génica diana normal es necesaria para que tenga lugar un trastorno relacionado con subpoblación celular, se pueden identificar los compuestos que unen la proteína génica que inhiben la actividad de la proteína del gen diana unida. Los ensayos para identificar compuestos adicionales así como para probar la eficacia de los compuestos, identificados por, por ejemplo, técnicas tales como aquellas descritas en las Secciones 5.8.1-5.8.3, se discuten, más adelante, en la Sección 5.8.4.

5.8.1. Ensayos de rastreo in vitro en busca de compuestos que se unen a un producto del gen diana

Los sistemas in vitro pueden diseñarse para identificar compuestos capaces de unir los productos de genes diana de la invención. Los compuestos identificados pueden ser útiles, por ejemplo, en modular la actividad de productos génicos naturales y/o los productos génicos mutantes, pueden ser útiles en elaborar la función biológica de los

productos de gen diana, pueden utilizarse en pantallas para identificar compuestos que desbaraten interacciones de productos génicos diana normales, o pueden por sí mismos desbaratar tales interacciones.

5 El principio de los ensayos usados para identificar compuestos que se unen al producto de gen diana implica preparar una mezcla de reacción del producto de gen diana y el compuesto de prueba en condiciones y durante el tiempo suficiente para permitir a los dos componentes interactuar y unirse, formando así un complejo que puede eliminarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de maneras. Por ejemplo, un procedimiento para llevar a cabo un ensayo tal implicaría unir el producto de gen diana o la sustancia de prueba sobre una fase sólida y detectar los complejos de producto de gen diana/compuesto de prueba unidos en la fase sólida al final de la reacción. En una realización de un procedimiento tal, el producto del gen diana se puede unir sobre una superficie sólida, y el compuesto de prueba, que no está unido, se puede marcar, bien directa o bien indirectamente.

10 En la práctica, las placas de microtitulación pueden utilizarse convenientemente como la fase sólida. El componente unido puede inmovilizarse por uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede llevarse a cabo por simple recubrimiento de la superficie sólida con una solución de la proteína y tñendo. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, preferentemente un anticuerpo monoclonal, específico para que la proteína esté inmovilizada se puede usar para unir la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse con antelación y almacenarse.

20 Con el fin de llevar a cabo el ensayo, el componente no inmovilizado se añade a la superficie revestida que contiene el componente unido. Después de que la reacción está completa, los componentes que no reaccionan se retiran (por ejemplo, lavando) en condiciones tales que cualesquiera complejos formados permanecerán inmovilizados en la superficie sólida. La detección de complejos unidos sobre la superficie sólida puede llevarse a cabo en un número de maneras. Donde el componente previamente no inmovilizado está premarcado, la detección de la marca inmovilizada sobre la superficie indica que se formaron los complejos. Cuando el componente previamente no inmovilizado no está premarcado, se puede usar una marca indirecta para detectar complejos unidos en la superficie; por ejemplo, utilizando un anticuerpo específico para el componente previamente no inmovilizado (el anticuerpo, sucesivamente, puede estar marcado o indirectamente marcado con un anticuerpo anti-Ig marcado).

25 Alternativamente, una reacción se puede llevar a cabo en una fase líquida, los productos de reacción se pueden separar de los componentes no reaccionados, y los complejos se pueden detectados; por ejemplo, usando un anticuerpo inmovilizado específico de producto de gen diana o de compuesto de prueba para unir cualesquiera complejos formados en la solución y un anticuerpo específico marcado para el otro componente del complejo posible para detectar complejos unidos.

5.8.2. Ensayos para proteínas celulares que interactúan con la proteína del gen diana

35 Se puede emplear cualquier forma adecuada para detectar interacciones proteína-proteína para identificar interacciones proteína diana novedosa-proteína celular o extracelular. Estos procedimientos se destacan en la Sección 5.2. anteriormente, para la identificación de genes de ruta, y se pueden utilizar en el presente documento con respecto a la identificación de proteínas que interactúan con proteínas diana identificadas.

5.8.3. Ensayos para compuestos que interfieren con interacción macromolecular de producto de gen diana/celular

40 Los productos de gen diana de la invención pueden, in vivo, interactuar con una o más macromoléculas celulares o extracelulares, tales como proteínas. Tales macromoléculas puede incluir, pero no se limitan a, moléculas de ácidos nucleicos y aquellas proteínas identificadas por medio de procedimientos tales como aquellos descritos, anteriormente, en la Sección 5.8.2. Para los propósitos de esta discusión, tales macromoléculas celulares o celulares y extracelulares se refieren en el presente documento como "compañeros de unión". Compuestos que desbaratan tales interacciones pueden ser útiles en regular la actividad de la proteína de gen diana, especialmente proteínas de gen, diana mutante. Tales compuestos pueden incluir, pero no se limitan a moléculas tales como anticuerpos, péptidos y similares, según se describen, por ejemplo, en la sección anterior, 5.8.1.

50 El principio básico de los sistemas de ensayo usados para identificar compuestos que interfieren con la interacción entre las especies de producto del gen y su(s) compañero o compañeros implica preparar una mezcla de reacción que contiene el producto del gen diana y el compañero de unión en condiciones y durante el tiempo suficiente para permitir a los dos interactuar y unirse, formando así un complejo. Con el fin de probar un compuesto para la actividad inhibitoria, la mezcla de reacción se prepara en la presencia y ausencia del compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo puede incluirse inicialmente en la mezcla de reacción, o puede añadirse en un tiempo subsiguiente a la adición de producto del gen diana y su compañero de unión celular o extracelular. Las mezclas de reacción control se incuban sin el compuesto de prueba o con un placebo. La formación de cualesquiera complejos entre la proteína del gen diana y el compañero de unión, celular o extracelular, se detecta después. La formación de un complejo en el control de reacción, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto interfiere con la interacción de la proteína del gen diana y del compañero de unión

interactiva. Adicionalmente, la formación de complejos dentro de las mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y la proteína de gen diana normal puede compararse también con la formación de complejos con mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y una proteína de gen diana mutante. Este comparación puede ser importante en aquellos casos en los que es deseable identificar compuestos que desbaratan interacciones de proteínas génicas pero no normales mutantes.

El ensayo de compuestos que interfieren con la interacción de los productos génicos diana y los compañeros de unión se puede llevar a cabo en un formato heterogéneo u homogéneo. Los ensayos heterogéneos implican unir bien el producto del gen diana o bien el compañero de unión sobre una fase sólida y detectar complejos unidos en la fase sólida al final de la reacción. En ensayos homogéneos, la reacción completa se lleva a cabo en una fase líquida. En algún enfoque, el orden de adición de los reactivos puede variarse para obtener información diferente sobre los compuestos que se están probando. Por ejemplo, los compuestos de ensayo que interfieren con la interacción entre los productos del gen diana y los compañeros de unión, por ejemplo, por competición, pueden identificarse llevando a cabo la reacción en presencia de la sustancia de prueba; es decir, añadiendo la sustancia de prueba a la mezcla de reacción antes de o simultáneamente con la proteína del gen de ensayo y el compañero de unión celular o extracelular interactivo. Alternativamente, los compuestos de prueba que desbaratan los complejos preformados, por ejemplo compuestos con constantes de unión más altas que desplazan uno de los componentes del complejo, pueden probarse añadiendo el compuesto de prueba a la mezcla de reacción después de que se han formado los complejos. Los diversos formatos se describen brevemente más adelante.

En un sistema de ensayo heterogéneo, bien la proteína del gen diana o bien el compañero de unión celular o extracelular interactiva, está unido sobre superficies sólidas, mientras que las especies no unidas están marcadas, bien directamente o bien indirectamente. En la práctica, las placas de microtitulación se utilizan convenientemente. La especie unida puede inmovilizarse por uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede llevarse a cabo simplemente recubriendo la superficie sólida con una solución del producto del gen diana o del compañero de unión y secando. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo inmovilizado específico para las especies a unirse para unir las especies a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse con antelación y almacenarse.

Con el fin de llevar a cabo el ensayo, el compañero de la especie inmovilizada está expuesto en la superficie revestida con o sin el compuesto de ensayo. Después de que la reacción está completa, los compuestos que no han reaccionado se retiran (por ejemplo, por lavado) y cualesquiera complejos formados permanecerán inmóviles sobre la superficie sólida. La detección de complejos unidos en la superficie sólida puede llevarse a cabo en un número de rutas. Donde las especies no inmovilizadas están pro-marcadas, la detección de la marca inmovilizada en la superficie indica que se formaron los complejos. Donde las especies no inmovilizadas no están pre-marcadas, se puede usar una marca indirecta para detectar complejos unidos a la superficie; por ejemplo, usando un anticuerpo específico marcado para las especies inicialmente no inmovilizadas (el anticuerpo, sucesivamente, puede estar marcado directamente o indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado). Dependiendo del orden de adición de los componentes de la reacción, se pueden detectar los compuestos de ensayo que inhiben la formación de complejos o que desbaratan los complejos preformados.

Alternativamente, la reacción puede llevarse a cabo en una fase líquida en la presencia o ausencia del compuesto de ensayo, los productos de reacción separados de los componentes no reaccionados, y los complejos detectados; por ejemplo, usando un anticuerpo inmovilizado específico para uno de los componentes de unión para unir cualesquiera complejos formados en solución y un anticuerpo marcado específico para el otro compañero de unión para detectar compuestos unidos. De nuevo, dependiendo del orden de adición de reactivos a la fase líquida, se pueden identificar los compuestos de ensayo que inhiben complejo o que desbaratan los complejos preformados.

En una realización en variante de la invención, se puede usar un ensayo homogéneo. En este enfoque, se prepara un complejo preformado de la proteína del gen diana y el compañero de unión celular o extracelular en el que está marcado bien el producto del gen diana o bien su compañero, pero la señal generada por la marca se desactiva debido a la formación de complejos (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N.º 4.109.496 por Rubenstein que utiliza este enfoque para inmunoensayos). La adición de una sustancia de prueba que compete con y desplaza una de las especies del complejo preformado dando como resultado la generación de un antecedente anterior a la señal. De este modo, las sustancias de prueba que desbaratan la interacción de proteína de gen diana/compañero de unión celular o extracelular se pueden identificar.

En una realización particular, el producto del gen diana se puede preparar para inmovilización usando las técnicas de ADN recombinante descritas en la Sección 5.5, anteriormente. Por ejemplo, la región codificante del gen diana puede fusionarse a un gen de la glutatión-S-transferasa (GST) usando un vector de fusión, tal como pGEX-5X-1, en una manera tal que su actividad de unión se mantiene en la proteína de condensación resultante. El compañero de unión celular o extracelular interactivo puede purificarse y usarse para elevar un anticuerpo monoclonal, usando procedimientos practicados rutinariamente en la técnica y descritos anteriormente, en la Sección 5.6. Este anticuerpo puede estar marcado con el isótopo radioactivo ¹²⁵I, por ejemplo, por procedimientos practicados rutinariamente en la técnica. En un ensayo heterogéneo, por ejemplo, la proteína de condensación del gen diana-GST puede unirse a perlas de glutatión-agarosa. El compañero de unión celular o extracelular interactivo puede

añadirse después en la presencia o ausencia del compuesto de ensayo en una manera que permita que tengan lugar la interacción y la unión. Al final del periodo de reacción, el material no unido puede retirarse por lavado y el anticuerpo monoclonal marcado se puede añadir al sistema y se deja unirse a los componentes complejados. La interacción entre la proteína del gen diana y el compañero de unión celular o extracelular interactivo se pueden detectar midiendo la cantidad de radiactividad que permanece asociada con las perlas de glutatión-agarosa. Una inhibición exitosa de la interacción por el compuesto de ensayo resultará en un decrecimiento en la radiactividad medida.

Alternativamente, la proteína de condensación del gen GST-diana y el compañero de unión celular o extracelular se puede mezclar conjuntamente en líquido en ausencia de perlas de glutatión-agarosa sólidas. El compuesto de prueba se puede añadir bien durante o bien después de que se permita interaccionar a las especies. Esta mezcla se puede añadir también a las perlas de glutatión-agarosa y el material no unido se retiró por lavado. De nuevo el grado de inhibición de la interacción de producto de gen diana/compañero de unión se puede detectar añadiendo el anticuerpo marcado y midiendo la radiactividad con las perlas.

En otra realización de la invención, estas mismas técnicas se pueden emplear usando fragmentos peptídicos que corresponden a los dominios de unión del producto del gen diana y/o el compañero de unión celular o extracelular (en casos donde el compañero de unión es una proteína), lugar de una o ambas de las de las proteínas de longitud total. Cualquier número de procedimientos practicados de forma rutinaria en la técnica se puede usar para identificar y aislar los sitios de unión. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis del gen que codifica una de las proteínas y rastreo por disminución de unión en un ensayo de co-precipitación. Se pueden seleccionar mutaciones de compensación en el gen que codifica la segunda especie en el complejo. El análisis de secuencia de los genes que codifican las proteínas respectivas revelará las mutaciones que corresponden a la región de la proteína implicada en unión interactiva. Alternativamente, uno de proteínas se puede unir a una superficie sólida usando procedimientos descritos en esta Sección anterior y se dejó interaccionar con y unirse a su compañero de unión marcado, que se ha tratado con una enzima proteolítica, tal como tripsina. Después de lavar, un péptido corto, marcado que comprende el dominio de unión puede permanecer asociado con el material sólido, que puede estar aislado e identificado por la secuenciación de aminoácidos. Además, una vez se obtiene el gen codificador para el compañero de unión celular o extracelular, los segmentos génicos cortos se pueden manipular para expresar fragmentos peptídicos de la proteína, que se puede poner a prueba para actividad de unión y se puede purificar o sintetizar.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, un producto de gen diana se puede unir a un material sólido como se describe, anteriormente, en esta Sección, haciendo una proteína de condensación de gen diana GST y dejándola unirse a perlas de glutatión-agarosa. El compañero de unión celular o extracelular interactivo puede marcarse con un isótopo radioactivo, tal como ²⁵S y se escindió con una enzima proteolítica tal como una tripsina. Los productos de escisión se pueden añadir a la proteína de condensación de GST-gen diana y se dejan unirse. Después de retirar por lavado péptidos no unidos, el material unido marcado, que representa el dominio de unión del compañero de unión celular o extracelular, puede eluirse, purificarse y analizarse para secuencia de aminoácidos por procedimientos bien conocidos. Los péptidos así identificados se pueden producir sintéticamente o se pueden condensar a proteínas facilitadoras apropiadas usando tecnología de ADN recombinante bien conocida.

5.8.4 Ensayos para la mejora de síntomas de trastorno inmune y/o la modulación de producto del gen diana

Cualquiera de los compuestos de unión, incluyendo, pero no limitados a, compuestos tales como aquellos identificados en los sistemas de ensayo precedentes, pueden probarse en su capacidad para mejorar síntomas de trastornos inmunitarios por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblación de linfocitos T. Los ensayos basados en células y basados en modelos animales para la identificación de los compuestos que presentan una capacidad tal para mejorar los síntomas del trastorno inmune se describen a continuación. Adicionalmente, los ensayos basados en células para la identificación de compuestos que modulan la función del producto del gen diana, en casos donde el producto del gen diana es un receptor que tiene una secuencia de siete dominios transmembrana, se describen, más adelante, en la Sección 5.8.4.1.

Primero, los sistemas basados en células tales como aquellos descritos, anteriormente, en la Sección 5.7.2, se pueden usar para identificar compuestos que pueden actuar para mejorar síntomas de trastornos relacionados con subpoblación de linfocitos TH. Por ejemplo, tales sistemas celulares se pueden exponer a un compuesto, sospechoso de presentar una capacidad de mejorar los síntomas del trastorno, a una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para facilitar una mejora tal en las células expuestas. Después de la exposición, las células se examinan para determinar si uno o más de los fenotipos celulares similares a trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH se han alterado para parecerse a un fenotipo que es más probable que produzca una incidencia o gravedad más baja de los síntomas del trastorno. Los ensayos basados en células adicionales se discuten, más adelante, en la Sección 5.8.4.1.

Tomando el trastorno relacionado con la subpoblación de linfocitos TH asma, que es, específicamente, un trastorno similar a los relacionados con TH2, puede utilizarse cualquier sistema de linfocitos TH2 o de células similares a

linfocitos TH2. Tras la exposición tales sistemas celulares, los compuestos se pueden someter a ensayo en su capacidad para modular el fenotipo similar a TH2 de tales células, de tal forma que las células presentan menos de un fenotipo similar a TH2. Los compuestos con tal capacidad moduladora de TH2 representan algunos que pueden presentar potencialmente la capacidad para mejorar los síntomas relacionados con asma in vivo.

5 Además, los sistemas basados en animales, tales como aquellos descritos, anteriormente, en la Sección 5.7.1, se pueden usar para identificar compuestos capaces de mejorar síntomas similares al trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH. Tales modelos animales pueden utilizarse como sustratos de prueba para la identificación de fármacos, productos farmacéuticos, terapias e intervenciones que pueden ser efectivas en tratar tales trastornos. Por ejemplo, los modelos animales pueden exponerse a un compuesto, sospechoso de presentar
10 una capacidad para mejorar los síntomas de trastorno relacionado con subpoblación de linfocitos TH, a una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para desencadenar una mejora tal de los síntomas en los animales expuestos. La respuesta de los animales a la exposición, y por lo tanto, la eficacia del compuesto en cuestión, pueden monitorizarse evaluando la reversión de los trastornos asociados con trastornos relacionados con subpoblación de células TH de interés. Con respecto a la intervención, cualesquiera tratamientos que reviertan
15 cualquier aspecto de los síntomas similares a trastornos relacionados con la subpoblación de células T se considerarían como candidatos para intervención terapéutica de trastorno relacionado con subpoblación de células TH humanas correspondientes. Las dosificaciones de agentes de ensayo se pueden determinar derivando curvas de respuesta a dosis, como se discute en la Sección 5.10, más adelante.

Los patrones de expresión génica se pueden utilizar de acuerdo con sistemas bien basados en células o bien
20 basados en animales, para evaluar la capacidad de un compuesto para mejorar los síntomas similares a trastornos relacionados con la subpoblación de células T. Por ejemplo, el patrón de expresión de uno o más genes identificadores pueden formar parte de un perfil identificador que se puede usar después en una valoración tal. Los perfiles identificadores se describen, más adelante, en la Sección 5.11. Los perfiles identificadores pueden caracterizarse por estados conocidos, bien por estados de trastorno relacionados con subpoblación de células TH, o
25 bien por estados de diferenciación de células TH normales, dentro de los sistemas de modelos basados en células y/o basados en animales.

5.8.4.1. Procedimientos para la identificación de compuestos que modulan función de productos de genes diana

En esta Sección, se describen procedimientos para la identificación de compuestos que actúan bien como agonistas o bien como antagonistas de productos de genes diana de receptores.
30

Los compuestos ensayados pueden ser, por ejemplo, compuestos tales como aquellos identificados por medio de los ensayos descritos, anteriormente, en las Secciones 5.8.1 a 5.8.3. Tales compuestos pueden incluir, pero no se limitan a péptidos tales como, por ejemplo, péptidos solubles, incluyendo, pero no limitados a, péptidos de condensación con cola de Ig, que comprenden partes extracelulares de receptores transmembrana de productos de genes diana y miembros de bibliotecas de péptidos aleatorios (véase, por ejemplo, Lam, K.S. y cols., 1991, Nature
35 354: 82-84; Houghten, R. y cols., 1991, Nature 354: 84-86) hechas de aminoácidos de configuración D y configuración L, fosfopéptidos (incluyendo pero no limitados a los miembros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidas, aleatorias o parcialmente degeneradas, véase, por ejemplo, Songyang, Z. y cols., 1993, Cell 72: 767-778), anticuerpos (incluyendo, pero no limitados a anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, anti-idiotípicos,
40 quiméricos o de cadena simple y FAb, F(ab') y fragmentos de bibliotecas de expresión FAb y fragmentos de unión a epitopos de los mismos), y moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas.

Los ensayos descritos en el presente documento son ensayos funcionales que identifican compuestos que afectan la actividad de los genes diana de receptores afectando el nivel de liberación de calcio intracelular dentro de las células que expresan tal proteína receptora de siete dominios transmembranarios. La liberación de calcio intracelular se mide debido a que tales receptores de siete dominios transmembranarios liberación tienden a ser receptores de proteínas G y debido a que la activación de estos receptores conduce a liberación de calcio intracelular mediado por proteínas G. La modulación (es decir, agonización o antagonización) función del producto del gen diana de receptor, después, daría como resultado una diferencia en niveles de calcio intracelular.
45

Los ensayos comprenden poner en contacto célula que expresa gen diana de receptor de siete dominios transmembrana con un compuesto de prueba y medir el nivel de calcio intracelular. Aquellos compuestos que produzcan un perfil de calcio intracelular que difiera de aquel que la celular presentaría en ausencia del compuesto representa bien agonistas o bien antagonistas. Un compuesto agonista causaría un incremento en los niveles de calcio intracelular relativo a las células control mientras que un antagonista daría como resultado un decrecimiento en niveles de calcio intracelular relativos a células control.
50

Mientras que cualquier célula que expresa un producto de gen diana de receptor de siete dominios transmembranarios se puede usar en el presente documento, se prefiere que se usen células cuyos niveles de calcio intracelular puedan medirse fácilmente. Los oocitos de *Xenopus*, debido a su gran tamaño, están entre tales
55

células preferidas debido a que pueden inyectarse fácilmente con compuestos comunicadores de calcio intracelular. Adicionalmente, las células de mieloma se pueden utilizar. Tales compuestos comunicadores incluyen, pero no se limitan a, agentes de unión a calcio tales como los complejos bien conocidos FURA-2 e INDO-2. Los complejos de FURA-2/calcio y los complejos de INDO-2/calcio fluorescentes, hacen posible la medida de las diferencias en niveles de calcio intracelular.

Para los fines de los ensayos descritos en el presente documento, los oocitos de *Xenopus* estarían transfectados con secuencias de nucleótidos que codifican la proteína diana de interés (por ejemplo, el producto del gen 10). Las células pueden ser transfectadas y expresar la secuencia de interés por medio de técnicas que se conocen bien por aquellos expertos en la técnica y que pueden incluir, por ejemplo, técnicas tales como aquellas descritas, anteriormente, en la Sección 5.5. Los oocitos de *Xenopus* se pueden inyectar con ARN codificando el producto del gen diana de interés de tal forma que los oocitos inyectados expresen el producto génico.

Los ensayos descritos en esta Sección pueden, primero, usarse para identificar compuestos que actúan como agonistas del producto de gen diana de interés. "Agonista", como se usa en el presente documento, hace referencia a un compuesto que modula la actividad del producto del gen diana, como se evalúa por la capacidad del compuesto para provocar un incremento en el influjo de calcio, que conduce a un incremento en niveles intracelulares de calcio. Entre tales agonistas puede estar, por ejemplo, el ligando natural para el producto del gen diana receptor.

Los agonistas identificados por medio de tales ensayos pueden actuar como agentes terapéuticos para la mejora de un amplio intervalo de trastornos relacionados con los linfocitos, incluyendo, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblación de células TH, en casos en los que tales trastornos están causados por un nivel reducido o ausente de la actividad del producto del gen diana. Cualquiera de los compuestos agonistas identificados en el presente documento puede usarse, por ejemplo, como parte de los procedimientos de tratamiento descritos en la Sección 5.9.2, más adelante. Adicionalmente, tales agonistas se pueden usar para identificar antagonistas del producto de gen diana de interés, por ejemplo, como se describe, a continuación.

"Antagonista", como se usa en el presente documento, hace referencia a un compuesto que modula la actividad de un producto de gen diana decreciendo la actividad del producto de gen diana, según se evalúa por la capacidad del compuesto para provocar un flujo de entrada de calcio. Antagonistas identificados por medio de tales ensayos pueden actuar como agentes terapéuticos para la mejora de un amplio intervalo de trastornos relacionados con linfocitos T, por ejemplo, trastornos de subpoblación de linfocitos T, en casos en los que el trastorno está causado por un nivel incrementado o inapropiado de la actividad del producto de gen diana.

Un rastreo de antagonistas puede llevarse a cabo utilizando células que expresen producto de gen diana como se describen, anteriormente. En aquellos casos en los que el trastorno relacionado con células T está causado por un producto de gen mutante, las células utilizadas en el ensayo de antagonistas pueden ser células que expresen el producto del gen diana implicado en causar el trastorno relacionado con linfocitos T.

Para llevar a cabo un rastreo de antagonistas, una célula que expresa un gen diana se pone en contacto con 1) un agonista de producto de gen diana y 2) un compuesto de prueba durante un periodo de tiempo dado. El nivel de calcio intracelular se midió entonces en las células y en células que se han puesto en contacto con el agonista solo. Un compuesto de prueba se considera que es un antagonista si el nivel de calcio antagonista si el nivel de liberación de calcio intracelular en presencia del compuesto de ensayo es más bajo que el nivel de liberación de calcio intracelular en ausencia del compuesto de ensayo.

Cualquiera de los compuestos agonistas identificados en el presente documento puede usarse, por ejemplo, como parte de los procedimientos de tratamiento descritos en la Sección 5.9.1.

Entre los compuestos antagonistas potenciales de los productos del gen diana de receptor de siete dominios transmembranarios descritos en el presente documento están péptidos que contienen uno o más de los dominios extracelulares del producto del gen diana receptor, preferentemente aquellos dominios son dominios que son responsables de unión a ligando de tal forma que los péptidos actúan para competir con el receptor endógeno para ligando. Tales compuestos antagonistas del dominio extracelular pueden comprender proteínas de fusión con cola de Ig que pueden producirse utilizando técnicas tales como aquellas descritas, anteriormente, en la Sección 5.5.

5.9. Compuestos y procedimientos para el tratamiento de trastornos inmunes y para la modulación de responsividad de linfocitos TH

A continuación se describen procedimientos que se pueden usar para mejorar síntomas de trastornos inmunes por medio de, por ejemplo, una modulación de la subpoblación de células TH de interés. Tal modulación puede ser de una naturaleza positiva o negativa, dependiendo de la situación específica involucrada, pero cada suceso modulador proporciona un resultado neto en el que los síntomas del trastorno inmunitario se mejoran. Adicionalmente, se describen a continuación procedimientos para la modulación de la responsividad de las células TH al antígeno.

"Modulación negativa", como se usa en el presente documento, hace referencia a una reducción en el nivel y/o la actividad de producto de gen diana en la ausencia del tratamiento modulador. Alternativamente, el término, como se usa en el presente documento, hace referencia a una reducción de la subpoblación de células T (por ejemplo, por medio de una reducción en el número de células que pertenecen a la misma subpoblación de células TH) en relación al número presente en la ausencia del tratamiento modulador. La "reducción", como se usa en el presente documento, es como se define, anteriormente, en la Sección 3.

"Modulación positiva", como se usa en el presente documento, se refiere a un incremento en el nivel y/o en la actividad de producto de gen diana con relación al nivel y/o a la actividad del producto del gen en ausencia del tratamiento modulador. Alternativamente, el término, como se usa en el presente documento, hace referencia a una estimulación de la subpoblación de células T (por ejemplo, por medio de un aumento en el número de células que pertenecen a la misma subpoblación de células TH) en relación al número presente en la ausencia del tratamiento modulador. La "estimulación", como se usa en el presente documento, es como se define, anteriormente, en la Sección 3.

Es posible que un trastorno relacionado con una subpoblación de linfocitos TH u otro trastorno inmunitario, pueda ocurrir como un resultado de actividad de gen diana normal durante el curso de, por ejemplo, la exposición a un cierto antígeno que facilita una respuesta inmune que conduce al desarrollo del trastorno. Por ejemplo, los trastornos similares a los relacionados con TH2, asma y alergia, son probablemente candidatos a trastornos que tienen un mecanismo tal. Además, un trastorno puede estar provocado, al menos en parte, por un nivel anormalmente alto de producto de gen diana, o por la presencia de un producto de gen diana que muestra una actividad anormal. Como tal, una técnica que desencadena un efecto modulador negativo, es decir, provoca una reducción en el nivel y/o actividad de un producto de gen diana, o alternativamente, lleva a una reducción de la subpoblación de linfocitos TH (por ejemplo, por medio de una reducción física en el número de células que pertenece a la subpoblación de las células TH), efectuaría una mejora de los síntomas del trastorno, relacionado con subpoblación de linfocitos TH, en cualquiera de los escenarios anteriores.

Las técnicas moduladoras negativas para la reducción de niveles de expresión de gen diana o de niveles de actividad de gen diana (bien normales o bien anormales) y para la reducción en el número de células de subpoblación de linfocitos TH se discuten en la Sección 5.9.1, más adelante.

Alternativamente, es posible que un trastorno relacionado con una subpoblación de linfocitos TH u otros trastornos inmunes se pueda provocar, al menos en parte, por la ausencia o reducción del nivel de expresión génica diana, una reducción en el nivel de una actividad del producto de gen diana, o una reducción en el número de células general que pertenece a una subpoblación de células TH específicas. Como tal, una técnica que desencadena un efecto modulador positivo, es decir, provoca un incremento del nivel de la expresión del gen diana y/o de la actividad de tales productos génicos, o, alternativamente, una estimulación de la subpoblación de linfocitos TH (por ejemplo, por medio de un incremento físico en el número de células pertenecientes a una subpoblación de células TH), efectuaría una mejora de los síntomas de trastornos inmunitarios.

Por ejemplo, una reducción en el número total de células similares a TH1 en relación a células similares a TH2 dentro de un individuo infectado con VIH puede correlacionar con la progresión a SIDA (Le, M. y cols., 1993, J. Clin. Invest. 91: 759; Le, M. y cols., 1993, Science 262: 1721; Maggi, E. y cols., 1994, Science 265: 244). Un tratamiento capaz de incrementar el número de células similares a TH1 en relación a células similares a TH2 dentro de un individuo infectado por VIH, puede, por lo tanto, servir para evitar o ralentizar la progresión a enfermedad.

Las técnicas moduladoras positivas para incrementar niveles de expresión de gen diana o niveles de actividad de producto del gen diana y para incrementar el nivel de células de subpoblación de linfocitos TH específicos se discuten, más adelante, en la Sección 5.9.2.

Entre los trastornos inmunes cuyos síntomas pueden mejorarse están trastornos inmunes relacionados con linfocitos TH1 o con células similares a TH1 y trastornos inmunes relacionados con linfocitos TH2 o con células similares a TH2. Ejemplos de trastornos relacionados con TH1 o con similares a TH1 incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como enfermedad de Crohn, artritis reactiva, incluyendo enfermedad de Lyme, diabetes dependiente de insulina, autoinmunidad específica de órganos, incluyendo esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Grave, dermatitis de contacto, soriasis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped y sarcoidosis. Ejemplos de trastornos relacionados con TH2 o similares a TH2 incluyen afecciones atópicas, tales como asma y alergia, incluyendo rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, incluyendo las alergias alimentarias, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, determinadas sensibilidades a patógenos tales como infecciones helmínticas (por ejemplo, leishmaniasis) y determinadas infecciones víricas, incluyendo VIH e infecciones bacterianas, incluyendo tuberculosis y lepra lepromatosa.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden utilizarse adicionalmente modulando el nivel de responsividad, por ejemplo responsividad a antígeno, de una subpoblación de linfocitos TH. Tales métodos son importantes porque muchos trastornos inmunitarios implican respuestas inmunitarias insuficientes, más que

5 inapropiadas. Por ejemplo, trastornos tales como afecciones atópicas, alérgicas mediadas por Ig, incluyendo asma, susceptibilidades a patógenos y enfermedad inflamatoria crónica, implican conllevar respuestas inmunes mediadas por TH2 fuertes pero contraproducentes. Adicionalmente, las respuestas inmunes mediadas por TH1 inapropiadas a autoantígenos son fundamentales para el desarrollo de tales trastornos como esclerosis múltiple, soriasis, diabetes dependiente de insulina, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Crohn.

10 Procedimientos para modular la responsividad de las células TH pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto un compuesto con un linfocito TH de tal forma que la responsividad del linfocito T colaborador está modulada en relación a la responsividad del linfocito T colaborador en ausencia del compuesto. La modulación puede incrementar o disminuir la responsividad de las células TH. Cualesquiera de las técnicas descritas, a continuación, en las Secciones 5.9.1-5.9.3.2 puede utilizarse para llevar a cabo una modulación apropiada de responsividad de linfocitos TH.

5.9.1 Técnicas moduladoras negativas

15 Como se explica, anteriormente, el tratamiento exitoso de ciertos trastornos inmunes se puede provocar por técnicas que sirven para inhibir la expresión o actividad de productos de gen diana, o que, alternativamente, sirven para reducir el número general de células que pertenecen a un subpoblación de linfocitos TH específica.

20 Por ejemplo, compuestos tales como aquellos identificados a través de ensayos descritos anteriormente, en la Sección 5.8, que muestran actividad moduladora negativa pueden usarse de acuerdo con la invención para mejorar determinados síntomas de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Como se discute en la Sección 5.8, anteriormente, tales moléculas pueden incluir, pero no se limitan a péptidos (tales como, por ejemplo, péptidos que representan partes extracelulares solubles de los receptores transmembrana de productos del gen diana), fosfopéptidos, moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas, o anticuerpos (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, anti-idiotípicos, quiméricos o de cadena única y fragmentos de bibliotecas de expresión FAb, F (ab')₂ y FAb y fragmentos de unión a epitopos de los mismos). Las técnicas para la determinación de dosis efectivas y la administración de tales compuestos se describen, más adelante, en la Sección 5.10.

Adicionalmente, moléculas antisentido y ribozimas que inhiben expresión del gen diana pueden usarse también de acuerdo con la invención para reducir el nivel de expresión de gen diana, reduciendo así de forma efectiva el nivel de actividad de gen diana. Aún adicionalmente, las moléculas de triple hélice se pueden utilizar en reducir el nivel de actividad del gen diana. Tales técnicas se describen, adicionalmente, en la Sección 5.9.1.1.

30 Adicionalmente, las técnicas para la reducción de las subpoblaciones de linfocitos THE específicas se discuten, más adelante, en la Sección 5.9.3. Tales técnicas pueden tomar ventaja de, por ejemplo, marcadores de superficie celular novedosos que son específicos para la subpoblación de linfocitos TH a reducirse y pueden incluir destrucción dirigida in vivo o in vitro, o, alternativamente, purificación selectiva aparte de la subpoblación de linfocitos TH de interés.

35 Entre las secuencias relacionadas con subpoblación de células TH identificadas por los procedimientos descritos por la presente invención está un gen designado en el presente documento como el gen 103, como se discute en el ejemplo presentado en la Sección 7, a continuación. Se demuestra en el presente documento que el gen 103 representa un gen específico de TH2 en el que la expresión del gen 103 se encuentra que está ausente de linfocitos TH1 así como de todos los otros tejidos puestos a prueba. Adicionalmente, al menos una de las proteína producida por el gen 103 es una proteína transmembranaria.

45 El gen 103 gen y sus productos pueden, por lo tanto, utilizarse en el tratamiento de los trastornos relacionados con subpoblación de células TH2. Por ejemplo, se pueden utilizar un producto del gen 103 o partes del mismo, bien directamente o bien indirectamente, para mejorar las condiciones que implican respuestas inmunes de IgE inapropiadas, incluyendo, pero no limitadas a los síntomas que acompañan afecciones atópicas tales como alergia y/o asma. Los anticuerpos tipo IgE se producen por células B estimuladas que requieren, al menos en parte, IL-4 producida por la subpoblación de linfocitos TH2. Por lo tanto, cualquier tratamiento, incluyendo, por ejemplo, el uso de un producto del gen 103 o partes del mismo, que reduce la concentración efectiva de IL-4 segregada, por ejemplo, reduciendo el número o actividad de células TH2, puede provocar una reducción en el nivel de IgE, conduciendo; a su vez, a la mejora de las afecciones que surgen de una respuesta inmune de IgE inapropiada.

50 Existe una diversidad de rutas en las que se pueden usar los productos de gen 103 específicos de TH2 para llevar a cabo una reducción tal en la actividad y/o concentración efectiva de los linfocitos TH2. Por ejemplo, se pueden usar ligandos naturales, derivados de ligandos naturales y anticuerpos que se unen a este producto del gen 103 para reducir el número de linfocitos TH2 presentes bien separando físicamente tales células de otras células en una población, eliminando de este modo la subpoblación de linfocitos TH2, o alternativamente, marcando como diana la destrucción específica de las células TH2. Tales técnicas se discuten, más adelante, en la Sección 5.9.3. Adicionalmente, tales compuestos se pueden usar para inhibir la proliferación de células TH2.

Además, compuestos, tales como secuencias de gen 103 o productos génicos se pueden utilizar para reducir el nivel de actividad celular de TH2, causar una reducción en producción de IL-4, y en última instancia, provocar la mejora de los trastornos relacionados con IgE.

5 Por ejemplo, se pueden administrar compuestos que compiten con ligando endógeno para el producto del gen 103. La reducción resultante en la cantidad de proteína transmembrana de gen 103 unida a ligando modulará la actividad celular de TH2. Compuestos que pueden ser particularmente útiles para este propósito, incluyen, por ejemplo, proteínas o péptidos solubles, tales como péptidos que comprenden el dominio extracelular, o partes, y/o análogos de los mismos, de los productos del gen 103, incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión solubles con cola de Ig. (Para una discusión de la producción de proteínas de fusión con cola de Ig véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU N.º 5.16.964).

5.9.1.1. **Enfoques antisentido modulador negativo, de ribozima y de hélice triple**

15 Entre los compuestos que pueden presentar la capacidad de mejorar síntomas de trastorno relacionado con subpoblación de células TH están moléculas antisentido, de ribozima y de hélice triple. Tales moléculas pueden diseñarse para reducir o inhibir bien actividad del gen natural, o bien si es apropiado, inhibir actividad del gen diana mutante. Las técnicas para la producción y el uso de tales moléculas es bien conocido para aquellos de habilidad en la técnica.

20 Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN o bien ARN) que son complementarios a ARNm diana o a ARNm de gen de ruta. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm de gen diana o gen de ruta complementarios y evitarán la traducción. La complementariedad absoluta, aunque se prefiere, no se requiere. Una secuencia "complementaria" a una parte de un ARN, como se refiere en el presente documento, quiere decir una secuencia que tiene complementariedad suficiente para ser capaz de hibridar con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido de doble cadena, una cadena simple del ADN dúplex puede ponerse a prueba así, o se puede ensayar la formación de triplex. La capacidad para hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico que hibrida, más apareamientos erróneos de base con un ARN puede contener y aún formar un dúplex estable (o un triplex, como puede ser el caso). Alguien especializado en la técnica puede determinar un grado tolerable de apareamiento erróneo por el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

30 Los oligonucleótidos que son complementarios con el extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia no traducida 5' hasta el e incluyendo el codón de iniciación AUG, trabajarían más eficientemente en inhibir traducción. Sin embargo, secuencias complementarias a las secuencias no traducidas 3' de ARNm han mostrado recientemente ser efectivas inhibiendo traducción de ARNm también. Véase generalmente, Wagner, R., 1994, Nature 372: 333-335. Así, los oligonucleótidos complementarios a bien las regiones 5' o bien las regiones 3' no traducidas, no codificantes de genes diana o genes de ruta se podrían usar en una aproximación antisentido para inhibir traducción de ARNm de gen diana endógeno o de gen de ruta. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm incluirían el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones codificantes de ARNm son inhibidores menos eficientes de traducción pero podrían usarse de acuerdo con la invención. Si se diseñan para hibridar a la región 5', 3', o región codificante de ARNm de gen diana o gen de ruta, los ácidos nucleicos antisentido serían al menos seis nucleótidos en longitud y son preferentemente oligonucleótidos que varían desde 6 hasta aproximadamente 50 nucleótidos en longitud. En los aspectos específicos el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

45 Independientemente de la elección de la secuencia diana, se prefiere que los estudios in vivo se lleven a cabo primero para cuantificar la habilidad del oligonucleótido antisentido para inhibir expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distingan entre inhibición de genes antisentido y efectos biológicos no específicos de oligonucleótidos. También se prefiere que estos estudios comparen niveles del ARN diana o de la proteína diana con un ARN o proteína de control. Adicionalmente se prevé que los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se comparen con aquellos obtenidos usando un oligonucleótido de control. Se prefiere que el oligonucleótido de control sea de aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido de prueba y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo necesario para evitar la hibridación específica a la secuencia diana.

55 Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o versiones derivadas o modificadas de los mismos, de cadena simple o de cadena doble. El oligonucleótido puede estar modificado en el resto de base, el resto de azúcar, o el armazón de fosfato, por ejemplo, para modificar la estabilidad de las moléculas, la hibridación, etc. Los oligonucleótidos pueden incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para marcar como diana receptores de células huésped in vivo), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véanse, *por ejemplo*, Letsinger y cols., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaître y cols., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; Publicación PCT N.º WO88/09810, publicada el 15 de diciembre, 1988) o la

barrera hematoencefálica (véase, *por ejemplo*, Publicación PCT N.º WO89/10134, publicada el 25 de abril, 1988), agentes de escisión activadores de la hibridación. (Véase, *por ejemplo*, Krol y cols., 1988, BioTechniques 6: 958-976) o agentes intercalantes. (Véase, *por ejemplo*, Zon, 1988, Charm. Res. 5: 539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado con otra molécula, *por ejemplo*, un péptido, agente de reticulación activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación, etc.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificado que está seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metil-inosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-motileitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutóxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluxacilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,5-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En otra realización más, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un armazón de fosfato modificado seleccionado del grupo constituido por un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamiditioato, un fosforamidoato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo y un formacetal o análogo del mismo.

En otra realización más, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido α -anomérico. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos de doble cadena específicos con ARN complementario en los que, contrariamente a las β -unidades usuales, las cadenas correrán paralelas una a la otra (Gautier y cols., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625,6641). El oligonucleótido es un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y cols., 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148), o un análogo de ARN-ADN quiméricos (Inoue y cols., 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

Los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica, *por ejemplo* por el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como están comercialmente disponibles de Biosearch, Aplica Biosystems, etc.). Ejemplos de AB, oligonucleótidos de fosforotioato se pueden sintetizar por el procedimiento de Stein y cols. (1988) Nucl. Acids Res. 16: 3209), se pueden preparar oligonucleótidos metilfosfonato por el uso de respaldos poliméricos de vidrio poroso controlados (Sarin y cols., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7448-7451), etc.

Las moléculas antisentido deberían administrarse a células que expresen el gen diana o el gen de ruta in vivo. Se ha desarrollado un número de procedimientos para administrar ADN o ARN antisentido a las células; por ejemplo; se pueden inyectar directamente moléculas antisentido dentro del sitio del tejido, o moléculas antisentido modificadas, diseñadas para marcar como diana las células deseadas (por ejemplo, antisentido engarzadas a péptidos o anticuerpos que específicamente unen receptores o antígenos expresados en la superficie celular diana) pueden administrarse sistémicamente.

Sin embargo, es con frecuencia difícil alcanzar concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por lo tanto un enfoque preferido utiliza una construcción de ADN recombinante en la que el oligonucleótido antisentido se sitúa sometido al control de un promotor de pol III o de pol II fuerte. El uso de una construcción tal para transfectar células diana en el paciente dará como resultado la transcripción de cantidades suficientes de ARN de cadena simple que formarán bases complementarias con los transcritos del gen diana endógeno del gen de ruta y de este modo evitará la traducción del ARNm del gen diana o de ruta. Por ejemplo, un vector puede introducirse in vivo de tal forma que se asume por una célula y dirige la transcripción de un ARN antisentido. Un vector tal puede permanecer episomal o llegar a estar integrado cromosómicamente, mientras que se pueda transcribir para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores pueden construirse por procedimientos de tecnología de ADN recombinante estándar en la técnica. Los vectores pueden ser plasmídicos, víricos, u otros conocidos en la técnica, usados para replicación y expresión en células de mamíferos. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido puede ser por cualquier promotor conocido en la técnica para actuar en células de mamífero, preferentemente células humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a: la región promotora temprana del SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290: 304-310): el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto y cols., 1980, Cell 22: 787-797), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner y cols., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster y cols., 1982, Nature 296: 39-42), etc. Cualquier tipo de plásmido, cósmido, YAC o vector vírico se puede usar para preparar la construcción de ADN recombinante que se puede introducir directamente en el sitio del tejido. Alternativamente, se pueden usar los vectores víricos que infectan selectivamente el tejido deseado.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN (para una revisión véase, por ejemplo Rossi J., 1994, *Current Biology* 4: 469-471). El mecanismo de acción de ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguido por una escisión endonucleolítica. La composición de moléculas de ribozima debe incluir una o más secuencias complementarias al ARNm de genes diana, y debe incluir la secuencia catalítica bien conocida responsable de la escisión de mARN. Para esta secuencia, véase Patente de los EE.UU. N.º 5.093.246, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad. Como tales, dentro del alcance de la invención están moléculas de ribozima de resto con forma de cabeza de martillo manipuladas que específica y eficientemente catalizan escisión endonucleolítica de secuencias de ARN que codifican proteínas de genes diana.

Las moléculas de ribozima designadas para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm del gen diana o de ruta se pueden usar también para evitar traducción de mRNA del gen diana o de ruta y expresión de gen diana o de gen de ruta. (Véanse, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT 90/11364, publicado el 4 de octubre, 1990; Sarver y col., 1990, *Science* 247: 1222-1225). Mientras que las ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específico de sitio se pueden usar para destruir los ARNm del gen diana o de ruta, se prefiere el uso de ribozimas con forma de cabeza de martillo. Las ribozimas con forma de cabeza de martillo escinden mRNA en localizaciones impuestas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas con forma de cabeza de martillo se conoce bien en la técnica y se describe más plenamente en Haseloff y Gerlach, 1988, *Nature*, 334: 585-591. Preferentemente el ribozima está manipulado de tal forma que el sitio de reconocimiento de escisión se localiza cerca del extremo 5' del ARNm del gen diana o del gen de ruta; es decir, para incrementar eficiencia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales.

Las ribozimas de la presente invención también incluyen endorribonucleasas de ARN (en adelante "ribozimas de tipo Cech"), tales como la que se da en la naturaleza en *Tetrahymena thermophila* (conocida como la IVS, o como la L-19 IVS RNA) y que se ha descrito extensamente por Thomas Cech y colaboradores (Zaug, y cols., 1984, *Science*, 224: 574-578; Zaug y Cech, 1986, *Science*, 231: 470-475; Zaug, y col., 1986, *Nature*, 324: 429-433; solicitud de patente internacional publicada N.º WO 88/04300 por University Patents Inc.; Been y Cech, 1986, *Cell*, 47: 207-216). Las ribozimas de tipo Cech tienen un sitio activo de ocho pares de bases que hibrida con una secuencia de ARN diana con lo que tiene lugar la escisión del ARN diana. La invención comprende aquellas ribozimas de tipo Cech que se dirigen a secuencias de sitio activo de ocho pares de bases que están presentes en un gen diana o un gen de ruta.

Como en el enfoque antisentido, las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para estabilidad, marcado como diana, etc.) y se administraría a las células que expresen el gen diana o el gen de ruta in vivo. Un procedimiento preferido de administración implica usar una construcción de ADN "que codifica" la ribozima sometido al control de un promotor de pol III o de pol II constitutivo fuerte, de tal forma que las células transfectadas producirán suficientes cantidades de la ribozima para destruir los mensajes de gen diana endógeno o de gen de ruta y para inhibir traducción. Debido a que las ribozimas al contrario que las moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere para su eficiencia una concentración intracelular más baja.

En casos en las que las moléculas antisentido, de ribozima, y/o de triple hélice descritas en el presente documento se utilizan para inhibir expresión de genes mutantes, es posible que la técnica pueda también reducir eficientemente o inhibir la transcripción (hélice triple) y/o la traducción (antisentido, ribozima) de ARN producido por alelos génicos diana normales puede surgir esa posibilidad en la que la concentración de productos de gen diana normal presente puede ser menor de lo que es necesario, para un fenotipo normal. En tales casos, para asegurar que los niveles sustancialmente normales de actividad genética se mantienen, por lo tanto, se pueden introducir moléculas de ácidos nucleicos que codifican y expresan polipéptidos del gen diana que presentan actividad de gen diana normal dentro de las células por medio de procedimientos de terapia tales como aquellos descritos, más adelante, en la Sección 5.9.2 que no contengan secuencias susceptibles a ninguno en absoluto de los tratamientos antisentido, de ribozima, o de triple hélice que se estén usando. Alternativamente, en casos en los que el gen diana codifica una proteína extracelular, puede ser preferible coadministrar proteína del gen diana normal con el fin de mantener el nivel requerido de actividad génica diana.

Las moléculas de ADN y ARN antisentido, ribozimas y de triple hélice de la invención se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Éstos incluyen técnicas para sintetizar oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidos en la técnica tales como por ejemplo síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN pueden generarse por secuencias de transcripción de ADN in vitro e in vivo que codifican la molécula de ARN antisentido. Tales secuencias de ADN pueden incorporarse dentro de una amplia diversidad de vectores que incorporan promotores de polimerasa de ARN adecuados tales como los promotores de T7 o de polimerasa SP6. Alternativamente, se pueden introducir de forma estable en líneas celulares construcciones de ADNc que sintetizan ARN constitutivamente o induciblemente, dependiendo del promotor usado.

Diversas modificaciones bien conocidas para las moléculas de ADN se pueden introducir como un medio de incrementar estabilidad intracelular y semivida. Las modificaciones posibles incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxinucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de enlaces fosforotioato o 2'-o-metilo más que enlaces fosfodiesterasa dentro del armazón de oligodesoxirribonucleótidos.

La expresión del gen diana endógeno y/o del gen de ruta puede reducirse también inactivando o "noqueando" el gen diana y/o el gen de ruta o su promotor usando recombinación homóloga dirigida. (Por ejemplo, véanse Smithies y cols., 1985, Nature 317: 230-234; Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51: 503-512; Thompson y cols., 1989 Cell 5: 313-321). Por ejemplo, un gen diana y/o un gen de ruta no funcional, mutante (o una secuencia completamente no relacionada) flanqueada por ADN homólogo al gen diana endógeno y/o al gen de ruta (bien las regiones codificantes o bien las regiones reguladoras del gen diana y/o del gen de ruta) puede utilizarse, con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células que expresen gen diana y/o gen de ruta in vivo. Inserción de la construcción de ADN, por medio de recombinación homóloga, da como resultado inactivación del gen diana y/o del gen de ruta. Tales enfoques son particularmente adecuados en el campo de la agricultura donde las modificaciones a las células ES (madre embrionarias) se pueden usar para generar descendencia animal con un gen diana inactivo y/o con un gen de ruta inactivo (por ejemplo, véanse Thomas y Capecchi 1987 y Thompson 1989, supra). Tales técnicas se pueden utilizar también para generar modelos animales de trastornos relacionados con las subpoblaciones de linfocitos T. Se debería destacar que este enfoque puede adaptarse para usar en seres humanos siempre que las construcciones de ADN recombinante se administren directamente o se dirijan al sitio requerido in vivo usando vectores víricos apropiados, por ejemplo, vectores de herpes virus.

Alternativamente, la expresión de gen diana endógeno y/o gen de ruta puede estar reducida dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen diana y/o el gen de ruta (es decir, los promotores y/o potenciadores del gen diana y/o del gen de ruta) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen diana o de ruta en las células diana en el cuerpo. (Véanse en general, Helene, C. 1991, Anticancer Drug Des., 6 (6): 569-84; Helene, C., y cols., 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660: 27-36; y Maher, L.J., 1992, Bioassays 14(12): 807-15). En aún otra realización de la invención, la actividad de gen diana y/o gen de ruta puede reducirse usando un enfoque "negativo dominante". Para este fin, las construcciones que codifican productos de gen diana y/o de gen de ruta defectivos se pueden usar en enfoques de terapia génica para disminuir la actividad del producto de gen diana y/o de gen de ruta en células diana apropiadas.

5.9.2. Técnicas moduladoras positivas

Como se explicó anteriormente, el tratamiento exitoso de determinados trastornos inmunitarios puede conseguirse mediante técnicas que sirven para incrementar el nivel de expresión del gen diana o para incrementar la actividad del producto del gen diana, o que, alternativamente, sirven para incrementar realmente el número total de células que pertenecen a una subpoblación específica de linfocitos TH.

Por ejemplo, compuestos tales como aquellos identificados a través de ensayos descritos anteriormente, en la Sección 5.8, que muestran actividad moduladora positiva pueden usarse de acuerdo con la invención para mejorar determinados síntomas de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Como se discutió en la Sección 5.8, anteriormente, tales moléculas pueden incluir, pero no se limitan a, péptidos que representan porciones extracelulares solubles de proteínas transmembranarias producto del gen diana, fosfopéptidos, moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas o anticuerpos (incluidos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, antiidiotipo, quiméricos o de cadena sencilla, y fragmentos FAb, F(ab') y FAb de colecciones de expresión y sus fragmentos de unión a epítopo).

Por ejemplo, un compuesto, tal como una proteína de un gen diana, puede administrarse, a un nivel suficiente para mejorar los síntomas de un sistema inmunitario, a un paciente que muestre tales síntomas. Cualquiera de las técnicas discutidas más adelante, en la Sección 5.10 puede utilizarse para tal administración. Un experto en la técnica sabrá fácilmente cómo determinar la concentración de dosis del compuesto no tóxicas, eficaces, utilizando técnicas tales como las descritas más adelante, en la Sección 5.10.1.

En casos en los que el compuesto que se va a administrar sea un compuesto peptídico, pueden administrarse directamente las secuencias de ADN que codifican el compuesto peptídico a un paciente que muestre los síntomas del trastorno inmunitario, a una concentración suficiente para producir un nivel de compuesto peptídico suficiente para mejorar los síntomas del trastorno. Cualquiera de las técnicas discutidas más adelante, en la sección 5.10, que logran la administración intracelular de compuestos, tal como, por ejemplo, la administración por liposomas, puede utilizarse para la administración de dichas moléculas de ADN. Las moléculas de ADN pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes bien conocidas.

En el caso de compuestos peptídicos que actúan extracelularmente, las moléculas de ADN que codifican tales péptidos pueden ser incorporadas y expresadas por cualquier tipo celular, siempre que exista una concentración de

péptido en circulación suficiente que dé como resultado del desencadenamiento de una reducción en los síntomas del trastorno inmunitario. En el caso de compuestos que actúan intracelularmente, las moléculas de ADN que codifican tales péptidos deben ser incorporadas y expresadas por la subpoblación de linfocitos TH de interés a un nivel suficiente para conseguir la reducción de trastornos inmunitarios.

5 Por lo tanto, se prefiere cualquier técnica que sirva para administrar moléculas de ADN selectivamente a la subpoblación de linfocitos TH de interés, por las moléculas de ADN que codifican péptidos que actúan intracelularmente. En el caso del asma, por ejemplo, se prefieren las técnicas para la administración selectiva de las moléculas a las subpoblaciones de linfocitos TH que residen dentro del tejido pulmonar.

10 Además, en casos en los que el trastorno relacionado con la subpoblación de linfocitos TH implica un gen anómalo, los pacientes pueden ser tratados con un tratamiento de reemplazo génico. Pueden insertarse en células una o más copias de un gen diana normal o una porción del gen que dirige la producción de una proteína del gen diana normal con función de gen diana, usando vectores que incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovíricos, víricos adenoasociados y retrovíricos, además de otras partículas que introducen ADN en células, tales como liposomas.

15 Tales técnicas de reemplazo génico pueden llevarse a cabo in vivo o in vitro. Como anteriormente, para los genes que codifican moléculas extracelulares, el tipo celular que expresa el gen diana es menos importante que lograr una concentración en circulación suficiente de la molécula extracelular para la mejora de los trastornos inmunitarios. Además, como anteriormente, cuando el gen codifica una célula que actúa intracelularmente o como una molécula transmembranaria, el gen debe expresarse con la subpoblación de linfocitos TH del tipo celular de interés. Por tanto, las técnicas que seleccionan para la expresión dentro del tipo celular de interés, se prefieren para esta última clase de genes diana. In vivo, tales técnicas pueden, por ejemplo, incluir la administración local adecuada de secuencias génicas diana.

20 Los procedimientos adicionales que pueden utilizarse para incrementar el nivel general de expresión de genes diana y/o de ruta y/o de la actividad de los genes diana y/o de ruta incluyen la introducción de células que expresan genes diana y/o de ruta adecuadas, preferentemente células autólogas, en un paciente en posiciones y cantidades suficientes para mejorar los síntomas de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos T. Tales células, pueden ser recombinantes o no recombinantes. Entre las células que puede administrarse para incrementar el nivel general de expresión de genes diana y/o de ruta en un paciente están las células normales, que expresan el gen diana y/o de ruta. Las células pueden administrarse en el sitio anatómico de expresión o como parte de un injerto tisular situado en un sitio diferente del organismo. Tales técnicas de tratamiento génico a base de células son bien conocidas por los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, Anderson, y col., patente de EE. UU. N.º 5.399.349; Mulligan y Wilson, patente de EE. UU. N.º 5.460.959.

In vitro, las secuencias de genes diana pueden introducirse en células autólogas. Estas células que expresan la secuencia del gen diana de interés pueden volver a introducirse en el paciente, preferentemente por administración intravenosa, de forma que dé como resultado una mejora de los síntomas del trastorno.

35 Alternativamente, pueden administrarse los linfocitos TH pertenecientes a una subpoblación de linfocitos TH específica a una paciente, de forma que el número total de células pertenecientes a esa subpoblación de linfocitos TH se incremente en relación con otra subpoblación de células TH, lo que da como resultado la mejora de un trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH. Las técnicas para tal aumento de subpoblaciones de linfocitos TH se describen más adelante, en la Sección 5.9.3.2.

40 **5.9.3 Técnicas moduladoras negativas o positivas**

En el presente documento se describen técnicas moduladoras que, dependiendo de la aplicación específica para la que se utilicen, pueden proporcionar respuestas positivas o negativas que conducen a la mejora de trastornos inmunitarios, incluidos trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Por tanto, en casos adecuados, los procedimientos de esta Sección pueden usarse junto con las técnicas moduladoras negativas descritas anteriormente, en la Sección 5.9.1 o, alternativamente, junto con las técnicas moduladoras positivas descritas anteriormente, en la Sección 5.9.2.

5.9.3.1 Técnicas con anticuerpos

45 Pueden utilizarse anticuerpos que muestren capacidad moduladora para mejorar trastornos inmunitarios tales como trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Dependiendo del anticuerpo específico, el efecto modulador puede ser negativo y puede, por tanto, utilizarse como parte de las técnicas descritas anteriormente, en la Sección 5.9.1, o puede ser positivo y puede, por tanto, usarse junto con las técnicas descritas anteriormente, en la Sección 5.9.2.

55 Un anticuerpo que tiene capacidad moduladora negativa se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a, e interfiere con, la acción de una proteína. En el caso de un receptor extracelular, por ejemplo, un anticuerpo tal se uniría específicamente al dominio extracelular del receptor de una manera que no activa al receptor pero que altera

la capacidad del receptor de unirse a su ligando natural. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra los dominios extracelulares del gen 103 pueden funcionar como moduladores negativos de este tipo. Tales anticuerpos pueden generarse usando técnicas estándar descritas en la Sección 5.6 anteriormente, contra proteínas de longitud completa naturales o mutantes o contra péptidos que corresponden a porciones de las proteínas. Los anticuerpos incluyen pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, fragmentos FAb, de cadena sencilla, quiméricos y similares.

Un anticuerpo que tiene capacidad moduladora positiva se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a una proteína y, mediante la unión, sirve para, directamente o indirectamente, activar la función de la proteína que reconoce. Por ejemplo, un anticuerpo puede unirse a la porción extracelular de una proteína transmembranaria de una manera que haga que la proteína transmembranaria funcione como si su ligando endógeno estuviera unido, y por tanto activara, por ejemplo, una ruta de transducción de señales. Los anticuerpos pueden generarse usando técnicas estándar descritas en la Sección 5.6, anteriormente, contra proteínas de longitud completa naturales o mutantes o contra péptidos que corresponden a porciones de las proteínas. Los anticuerpos incluyen pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, fragmentos FAb, de cadena sencilla, quiméricos y similares.

En casos en los que la proteína, tal como una proteína del gen diana, a la que está dirigido el anticuerpo sea intracelular y se usen anticuerpos completos, pueden preferirse anticuerpos que se internalicen. No obstante, pueden usarse lipofectina o liposomas para suministrar a las células el anticuerpo o un fragmento de la región Fab que se une al epítipo del producto génico. Cuando se usan fragmentos del anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor que se une al dominio de unión de la proteína más pequeño. Por ejemplo, pueden usarse péptidos que tengan una secuencia de aminoácidos que corresponda al dominio de la región variable del anticuerpo que se une a la proteína. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente o producirse mediante tecnología de ADN recombinante, usando procedimientos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Creighton, 1983, supra; y Sambrook y col. 1989, anteriormente). Alternativamente, también pueden administrarse anticuerpos de cadena sencilla, tales como anticuerpos neutralizadores, que se unen a epítopos intracelulares. Tales anticuerpos de cadena sencilla pueden administrarse, por ejemplo, expresando secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos de cadena sencilla dentro de la población celular diana utilizando, por ejemplo, técnicas tales como las descritas en Marasco y col. (Marasco, W. y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893).

En casos en los que la proteína a la que está dirigido el anticuerpo sea extracelular o sea una proteína transmembranaria, cualquiera de las técnicas de administración descritas más adelante, en la Sección 5.10, que son apropiadas para la administración de péptidos puede utilizarse para administrar eficazmente los anticuerpos en su sitio de acción.

5.9.3.2 Procedimientos para incrementar o disminuir las concentraciones de subpoblaciones de linfocitos TH específicas

Las técnicas descritas en el presente documento pueden utilizarse para reducir o aumentar el número total de células pertenecientes a una subpoblación de linfocitos TH dada, incrementando así realmente la relación de la subpoblación de linfocitos TH de interés y otras subpoblaciones de células TH. Específicamente, se describen técnicas de separación que pueden usarse para reducir o aumentar el número total de células presentes dentro de una subpoblación de linfocitos TH y, además, se describen técnicas de marcaje como diana que pueden utilizarse para reducir subpoblaciones de linfocitos TH específicas.

Dependiendo de la aplicación en particular, cambiar el número de células pertenecientes a una subpoblación de linfocitos TH puede proporcionar respuestas estimuladoras o inhibitoras que conduzcan a la mejor de trastornos de subpoblaciones de linfocitos TH. Por tanto, en casos adecuados, los procedimientos de esta Sección pueden usarse junto con las técnicas inhibitoras descritas anteriormente, en la Sección 5.9.1 o, alternativamente, junto con las técnicas estimuladoras descritas anteriormente, en la Sección 5.9.2.

Las técnicas de separación descritas en el presente documento están basadas en la presencia o ausencia de marcadores celulares de superficie, preferiblemente marcadores transmembranarios. Tales marcadores pueden incluir, pero no se limitan a, los marcadores del dominio extracelular del producto del gen 103 específicos para TH2.

En casos en los que el objetivo de la separación sea incrementar o aumentar el número de células pertenecientes a una subpoblación de linfocitos TH específica, los anticuerpos usados también pueden ser específicos para marcadores de superficie presentes sobre linfocitos TH no diferenciados o parcialmente no diferenciados. Después de la separación y purificación de tales linfocitos TH no diferenciados o parcialmente no diferenciados, las células pueden cultivarse en tampón o medio de cultivo fisiológico e inducir su diferenciación cultivándolas en presencia de factores apropiados. Por ejemplo, puede añadirse IL-4 para inducir la diferenciación de los linfocitos TH a linfocitos TH2, mientras que pueden añadirse la citocina IL-12 para inducir la diferenciación de los linfocitos TH a linfocitos TH1. Después de la diferenciación, las células pueden lavarse, resuspenderse, por ejemplo en solución salina tamponada, y volver a introducirse en un paciente, preferentemente mediante administración intravenosa.

Pueden utilizarse técnicas de separación que separan y purifican células in vitro a partir de una población celular, tal como células hematopoyéticas autólogas del paciente que se está tratando. Una población celular inicial que contiene una subpoblación de linfocitos TH, tal como células hematopoyéticas, puede obtenerse usando procedimientos estándar bien conocidos para los expertos en la técnica. Puede utilizarse sangre periférica como una fuente de partida potencial para tales técnicas y puede, por ejemplo, obtenerse mediante venopunción y recolección en tubos heparinizados.

Una vez obtenida la fuente de células autólogas de partida, los linfocitos T, tales como los linfocitos TH1 o TH2, pueden retirarse y separarse y purificarse así selectivamente, mediante diversos procedimientos que utilizan anticuerpos que se unen a marcadores específicos presentes en la población de linfocitos T de interés, mientras que están ausentes en otras células dentro de la fuente de partida. Estas técnicas puede incluir, por ejemplo, citometría de flujo usando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) y fluorocromos específicos, separaciones con biotina-avidina o biotina-estreptavidina usando biotina conjugada con los anticuerpos específicos para los marcadores celulares de superficie y avidina o estreptavidina unida a un soporte sólido tal como una matriz de columna de afinidad o superficies plásticas o separaciones magnéticas usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo.

La separación mediante anticuerpos para marcadores específicos puede ser por procedimientos de selección negativa o positiva. En la separación negativa, se usan anticuerpos que son específicos para marcadores presentes en células no deseadas. Por ejemplo, en el caso de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH2 en los que sería deseable reducir el número de linfocitos TH1, tales anticuerpos podrían estar dirigidos al dominio extracelular del producto del gen 103. Las células unidas a través de un anticuerpo a un marcador celular de superficie tal, pueden retirarse o lisarse y puede retenerse la mezcla deseada restante.

En la separación positiva, anticuerpos específicos para marcadores presentes en las células de interés deseadas. Por ejemplo, en el caso de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH2 en los que sería deseable incrementar el número de linfocitos TH1, tales anticuerpos podrían estar dirigidos al dominio extracelular del producto del gen 103. Las células unidas mediante el anticuerpo se separan y se retienen. Se entenderá que las separaciones positivas y negativas pueden usarse sustancialmente de forma simultánea o de una manera secuencial.

Una técnica habitual para la separación a base de anticuerpos es el uso de la citometría de flujo, tal como mediante un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). Normalmente, la separación por citometría de flujo se realiza como sigue. La mezcla de células suspendida se centrifuga y se resuspende en medio. Se añaden anticuerpos que están conjugados con fluorocromo para permitir la unión de los anticuerpos a marcadores celulares de superficie específicos. La mezcla de células se lava entonces mediante una o más etapas de centrifugación y resuspensión. La mezcla se pasa a través de un FACS que separa las células basándose en diferentes características de fluorescencia. Los sistemas FACS están disponibles en niveles variables de funcionamiento y capacidad, incluido el análisis multicolor. La célula facilitadora puede identificarse mediante un perfil característico de dispersión hacia delante y lateral que está influido por el tamaño y la granularidad, así como mediante la expresión positiva y/o negativa de determinados marcadores celulares de superficie.

Otras técnicas de separación además de la citometría de flujo también pueden proporcionar separaciones rápidas. Uno de tales procedimientos es la separación a base de biotina-avidina mediante cromatografía de afinidad. Normalmente, dicha técnica se realiza incubando células con anticuerpos acoplados a biotina para marcadores específicos, tal como, por ejemplo, la proteína transmembranaria codificada por el gen 103 descrita en el presente documento, seguida del paso a través de una columna de avidina. Los complejos biotina-anticuerpo-célula se unen a la columna a través de la interacción biotina-avidina, mientras que otras células pasan a través de la columna. La especificidad del sistema biotina-avidina es muy adecuada para una separación positiva rápida. Múltiples pasajes pueden asegurar la separación de un nivel suficiente de la subpoblación de linfocitos THE de interés.

En casos en los que el objetivo de la técnica de separación sea reducir el número total de células pertenecientes a una subpoblación de linfocitos TH, pueden volver a introducirse en el paciente las células derivadas de la fuente de células de partida en la que se han reducido ahora realmente los linfocitos TH. Una reducción tal de la subpoblación de linfocitos TH da como resultado la mejora de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH asociados con la actividad o sobreactividad de la subpoblación de linfocitos TH. La reintroducción de las células con subpoblaciones de linfocitos TH reducidas puede llevarse a cabo lavando las células, resuspendiéndolas, por ejemplo, en solución salina tamponada y administrándoselas a un paciente.

Si la viabilidad y la recuperación celular son suficientes, las células con subpoblaciones de linfocitos TH reducidas puede volver a introducirse en pacientes inmediatamente después de la separación. Alternativamente, las células con subpoblaciones de linfocitos TH reducidas pueden cultivarse y expandirse ex vivo antes de administrárselas a un paciente. La expansión puede llevarse a cabo mediante técnicas bien conocidas utilizando tampones o medios de cultivo fisiológicos en presencia de factores de expansión apropiados tales como interleucinas y otros factores de crecimiento bien conocidos.

En casos en los que el objetivo de la técnica de separación sea aumentar o incrementar el número total de células pertenecientes a una subpoblación de linfocitos TH, pueden volver a introducirse en el paciente las células derivadas de las células de la subpoblación de linfocitos TH purificada, dando así como resultado la mejora de los trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH asociados con una baja actividad de la subpoblación de linfocitos TH.

5

Las células que se van a introducir se cultivarán y expandirán ex vivo antes de volver a introducir las células de las subpoblaciones de linfocitos TH pueden lavarse, resuspenderse, por ejemplo, en solución salina tamponada y volver a introducirse en un paciente, preferentemente mediante administración intravenosa.

10

Las células que se van a expandir pueden cultivarse, usando procedimientos estándar, en presencia de un agente de expansión apropiado que induzca la proliferación de la subpoblación de linfocitos TH purificada. Un agente de expansión de este tipo puede ser, por ejemplo, cualquier citocina, antígeno o anticuerpo adecuados. En el caso de los linfocitos TH2, por ejemplo, el agente de expansión puede ser IL-4, mientras que para los linfocitos TH1, el agente de expansión puede ser, por ejemplo, IL-12.

15

Antes de volver a introducir las células purificadas en un paciente, las células purificadas pueden modificarse, por ejemplo, mediante transformación con secuencias de genes que codifican productos génicos de interés. Tales productos génicos deberían representar productos que potencien la actividad de la subpoblación de linfocitos TH purificada o, alternativamente, representar productos que repriman la actividad de una o más de las demás subpoblaciones de linfocitos TH. Los procedimientos de transformación de células y expresión génica son bien conocidos por los expertos en la técnica, y pueden ser como los descritos anteriormente, en la Sección 5.5.

20

Pueden utilizarse adicionalmente procedimientos de marcaje como diana bien conocidos en casos en los que el objetivo sea reducir el número de células pertenecientes a una subpoblación de linfocitos TH específica. Tales procedimientos de marcaje como diana pueden ser in vivo o in vitro y pueden implicar la introducción de agentes de marcaje como diana en una población de células, de forma que los agentes de marcaje como diana destruyan selectivamente un subconjunto de las células dentro de la población. Las técnicas de administración in vivo que pueden seguirse mediante dichos agentes de marcaje como diana se describen más adelante, en la Sección 5.10.

25

Los agentes de marcaje como diana generalmente comprenden, en primer lugar, un resto de marcaje como diana que, en el presente caso, hace que el agente se asocie selectivamente con una subpoblación de linfocitos TH específica. Los agentes de marcaje como diana generalmente comprenden, en segundo lugar, un resto capaz de destruir una célula con la que se ha asociado el agente de marcaje como diana.

30

Los restos de marcaje como diana pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos dirigidos a marcadores celulares de superficie encontrados específicamente en la subpoblación de linfocitos TH que se está marcando o, alternativamente, a ligandos, tales como factores de crecimiento, que se unen a moléculas de tipo receptor que se encuentran exclusivamente en la subpoblación de linfocitos TH marcada.

35

En el caso de células TH2, por ejemplo, tales restos de marcaje como diana pueden representar un anticuerpo dirigido contra la porción extracelular del producto del gen 103 descrito en el presente documento o pueden, alternativamente, representar un ligando específico para esta molécula específica de TH2 de tipo receptor.

40

Los restos destructivos incluyen cualquier resto capaz de inactivar o destruir una célula a la que se ha unido el agente de marcaje como diana. Por ejemplo, un resto destructivo puede incluir, pero no se limita a, citotoxinas o agentes radioactivos. Las citotoxinas incluyen, por ejemplo, toxinas derivadas de plantas, hongos o bacterias, siendo preferidas las toxinas con cadenas A de ricina desglucosiladas debido a su potencia y vidas medias prolongadas.

5.10. Preparaciones farmacéuticas y procedimientos de administración

45

Los compuestos, secuencias de ácidos nucleicos y subpoblaciones de linfocitos TH descritos en el presente documento pueden administrarse a un paciente a dosis terapéuticamente eficaces para tratar o mejorar trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de un compuesto o subpoblación de linfocitos TH suficiente para dar como resultado una mejora de los síntomas del trastorno inmunitario de los síntomas del trastorno inmunitario o alternativamente, a la cantidad de una secuencia de ácido nucleico suficiente para expresar una concentración de producto génico que da como resultado la mejor de los trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH u otros trastornos inmunitarios.

50

5.10.1. Dosis eficaz

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico está en el índice terapéutico y puede expresarse como la relación

DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren compuestos que muestran índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debería prestarse atención al diseño de un sistema de suministro que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado, con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

- 5 Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para usar en seres humanos. La dosificación de tales compuestos está preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz
- 10 puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración de circulación en plasma que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración de compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

15 **5.10.2 Formulaciones y uso**

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

- 20 Por lo tanto, los compuestos y sus sales y disolventes fisiológicamente aceptables pueden formularse para la administración por inhalación o insuflación (a través de la boca o la nariz) o la administración oral, bucal, parenteral o rectal.

- Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglomerantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógenofosfato de calcio);
- 25 lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón) o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones
- 30 líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Los preparados también pueden contener sales tamponadoras y agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según convenga.
- 35

Las preparaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para administración bucal las composiciones puede adoptar la forma de comprimidos o de pastillas para chupar formuladas de modo convencional.

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

- Los compuestos puede formularse para administración parenteral (es decir, intravenosa o intramuscular) por inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multidosis, con un conservante
- 50 añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de usarse. Se prefiere
- 55 que las células de la subpoblación de linfocitos TH se introduzcan en los pacientes mediante administración intravenosa.

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

5 Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos pueden formularse también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantes (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con material polimérico o hidrófobo adecuado (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, como una sal muy poco soluble.

10 La composición, si se desea, puede presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosis unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase tipo blister. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración.

5.11. Técnicas de diagnóstico y monitorización

15 Pueden emplearse diversidad de procedimientos para diagnosticar trastornos inmunitarios, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, la predisposición a tales trastornos inmunitarios, para monitorizar la eficacia de los compuestos contra trastornos inmunitarios, por ejemplo, durante ensayos clínicos y para monitorizar pacientes sometidos a evaluación clínica para el tratamiento de tales trastornos. Además, pueden utilizarse varios procedimientos para detectar células inmunitarias activadas, por ejemplo miembros activados de subpoblaciones de linfocitos TH.

20 Tales procedimientos, por ejemplo, pueden utilizar reactivos tales como las secuencias de nucleótidos del gen identificador descritas en la Sección 5.1 y anticuerpos dirigidos contra péptidos de genes expresados diferencialmente y de ruta, como se describe anteriormente, en las Secciones 5.5 (péptidos) y 5.6 (anticuerpos). Específicamente, tales reactivos puede usarse, por ejemplo, para: 1) detectar la presencia de la expresión del gen diana, mutaciones del gen diana, detectar la sobre- o subexpresión del ARNm del gen diana en relación con el estado sin trastorno inmunitario o en relación con una subpoblación de linfocitos TH no activada; 2) detectar una sobre- o subabundancia del producto del gen diana en relación con el estado sin trastorno inmunitario o en relación con el estado con la subpoblación de linfocitos TH no activada; y 3) identificar células de subpoblaciones de linfocitos TH específicas (por ejemplo, linfocitos TH implicados en un trastorno inmunitario o linfocitos TH activados) dentro de una población de células mezclada.

25 Los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico previamente empaquetados que comprenden al menos un reactivo específico de ácido nucleico del gen identificador o de anticuerpo anti-gen identificador descrito en el presente documento, que pueden usarse convenientemente, por ejemplo, en ámbitos clínicos, para diagnosticar a pacientes que muestren anomalías relacionadas con los TH1 o TH2.

30 Puede utilizarse cualquier tipo celular o tejido, preferentemente linfocitos THE, en los que se exprese el gen identificador para los diagnósticos descritos más adelante.

35 Entre los procedimientos que pueden utilizarse en el presente documento están los procedimientos para monitorizar la eficacia de compuestos en ensayos clínicos para el tratamiento de trastornos inmunitarios. Tales compuestos pueden ser, por ejemplo, compuestos como los descritos anteriormente, en la Sección 5.9. Un procedimiento de este tipo comprende detectar, en un muestra de un paciente, un transcrito génico o un producto génico que se expresa diferencialmente en una subpoblación de linfocitos TH en un estado de trastorno inmunitario en relación con su expresión en la subpoblación de linfocitos TH cuando la subpoblación celular está en un estado normal, o sin trastorno inmunitario.

40 - Puede usarse cualquiera de las técnicas de detección de ácidos nucleicos descritas más adelante, en la Sección 5.11.1, o cualquiera de las técnicas de detección de péptidos descritas más adelante, en la Sección 5.11.2, para detectar el transcrito génico o el producto génico que se expresa diferencialmente en la subpoblación de linfocitos TH del trastorno inmunitario en relación con su expresión en el estado normal, o sin trastorno inmunitario.

45 Durante los ensayos clínicos, por ejemplo, la expresión de un único gen identificador o, alternativamente, el patrón identificador de una subpoblación de linfocitos TH, puede determinarse para la subpoblación de linfocitos TH en presencia o ausencia del compuesto que se está ensayando. La eficacia del compuesto puede seguirse comparando los datos de expresión obtenidos con los correspondientes patrones de expresión conocidos para la subpoblación de linfocitos TH en un estado normal, sin trastorno inmunitario. Los compuestos que muestran eficacia son aquellos que alteran la expresión del único gen identificador y/o del patrón identificador de la subpoblación de linfocitos TH del trastorno inmunitario para que se parezca más a la de la subpoblación de linfocitos TH normal, sin trastorno inmunitario.

La detección del producto o productos de genes expresados diferencialmente en una subpoblación de linfocitos TH en un estado de trastorno inmunitario en relación con la subpoblación de linfocitos TH cuando la subpoblación celular está en un estado normal, o sin trastorno inmunitario, también puede usarse para monitorizar la eficacia de compuestos que potencialmente actúan contra trastornos inmunitarios durante los ensayos clínicos. Durante los ensayos clínicos, por ejemplo, el nivel y/o actividad de los productos de uno o más de dichos genes diferencialmente expresados puede determinarse para la subpoblación de linfocitos TH en presencia o ausencia del compuesto que se está ensayando. La eficacia del compuesto puede seguirse comparando los datos de niveles y/o actividad de la proteína obtenidos con los correspondientes niveles/actividad conocidos para la subpoblación de linfocitos TH en un estado normal, sin trastorno inmunitario. Los compuestos que muestran eficacia son aquellos que alteran el patrón de la subpoblación de linfocitos TH del trastorno inmunitario para que se parezca más a la de la subpoblación de linfocitos TH normal, sin trastorno inmunitario.

Dada la naturaleza específica para TH2 del gen 103, la detección de transcritos y/o productos del gen 103 puede ser particularmente adecuada para monitorizar la eficacia de compuestos de ensayos clínicos para el tratamiento de trastornos inmunitarios relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH2, tales como, por ejemplo, el asma o la alergia.

Entre los procedimientos adicionales que pueden utilizarse en el presente documento están procedimientos para detectar la capacidad de respuesta de los linfocitos TH, por ejemplo, la capacidad de respuesta a antígenos, y para detectar células inmunitarias activadas, por ejemplo, miembros activados de subpoblaciones de linfocitos TH. Los procedimientos de detección tales como éstos son importantes porque muchos trastornos inmunitarios implican respuestas inmunitarias insuficientes, más que inapropiadas. Tales procedimientos de detección pueden usarse, por ejemplo, para detectar una predisposición a un trastorno inmunitario.

Los procedimientos para detectar la capacidad de respuesta y/o activación de linfocitos TH pueden comprender, por ejemplo, detectar en una muestra de linfocitos TH un transcrito o producto génico que se expresa diferencialmente en una subpoblación de linfocitos TH que está en un estado activado o de respuesta (por ejemplo, un estado en el que la subpoblación de linfocitos TH se ha expuesto a un antígeno), en relación con una subpoblación de linfocitos TH que está en un estado no activado o no de respuesta.

Puede usarse cualquiera de las técnicas de detección de ácidos nucleicos descritas más adelante, en la Sección 5.11.1, o cualquiera de las técnicas de detección de péptidos descritas más adelante, en la Sección 5.11.2, para detectar dicho transcrito génico o producto génico expresado diferencialmente.

La naturaleza específica para TH2 del gen 103 puede hacer la detección de sus transcritos y/o productos génicos especialmente adecuada para detectar la activación y/o capacidad de respuesta de los linfocitos TH2.

5.11.1 Detección de ácidos nucleicos del gen identificador

El ADN o ARN del tipo celular o tejido que se va a analizar puede aislarse fácilmente usando procedimientos que son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los procedimientos de diagnósticos también pueden realizarse in situ, por ejemplo, directamente sobre secciones de tejido (fijadas y/o congeladas) de tejido del paciente obtenidas a partir de biopsias o resecciones, de forma que no es necesaria la purificación del ácido nucleico. Los reactivos de ácido nucleico tales como los descritos en la Sección 5.4 pueden usarse como sondas y/o cebadores para tales procedimientos in situ (véase, por ejemplo, Nuovo, G. J., 1992, "PCR In Situ Hybridation: Protocols and Application", Raven Press, NY). La expresión de células específicas dentro de una población de células también puede determinarse, por ejemplo, mediante técnicas in situ tales como las descritas anteriormente o mediante técnicas de citometría de flujo estándar.

Las secuencias de nucleótidos del gen identificador, ARN o ADN, pueden usarse, por ejemplo, en ensayos de hibridación o amplificación de muestras biológicas para detectar estructuras y expresión génicas de trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH. Tales ensayos pueden incluir, pero no se limitan a, análisis de Southern o Northern, análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla, ensayos de hibridación in situ y análisis de reacción en cadena de la polimerasa. Tales análisis pueden revelar tanto aspectos cuantitativos del patrón de expresión del gen identificador como aspectos cualitativos de la expresión del gen identificador y/o la composición génica. Esto es, tales técnicas pueden detectar no sólo la presencia de expresión génica, sino que también pueden detectar la cantidad de expresión, particularmente qué células específicas están expresando el gen de interés y además puede, por ejemplo, detectar mutaciones puntuales, deleciones, reordenación de cromosomas y/o activación o inactivación de la expresión génica.

Los procedimientos de diagnóstico para la detección de moléculas de ácido nucleico específicas del gen identificador pueden implicar, por ejemplo, poner en contacto e incubar ácidos nucleicos derivados del tipo celular o tejido que se está analizando, con uno o más reactivos de ácido nucleico marcados como se describen en la Sección 5.4, bajo condiciones favorables para el apareamiento específico de estos reactivos con sus secuencias complementarias dentro de la molécula de ácido nucleico de interés. Preferentemente, las longitudes de estos reactivos de ácido nucleico son de al menos 15 a 30 nucleótidos. Después de la incubación, todos los ácidos

nucleicos no apareados se retiran del híbrido de ácido nucleico:molécula identificadora. Se detecta entonces la presencia de ácidos nucleicos del tipo celular o tejido que han hibridado, si existe alguna molécula de este tipo. Utilizando un esquema de detección tal, el ácido nucleico del tejido o tipo celular de interés puede inmovilizarse, por ejemplo, sobre un soporte sólido tal como una membrana, o una superficie plástica, tal como la de una placa de microvaloración o perlas de poliestireno. En este caso, después de la incubación, los reactivos de ácido nucleico marcados, no apareados, del tipo descrito en la Sección 5.4 se retiran fácilmente. La detección de los reactivos de ácido nucleico identificadores marcados, no apareados, restantes, se lleva a cabo usando técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los procedimientos de diagnóstico alternativos para la detección de moléculas de ácido nucleico específicas del gen identificador pueden implicar su amplificación, por ejemplo, por PCR (la realización experimental descrita en Mullis, K.B., 1987, patente de EE. UU. N.º 4.683.202), por reacción en cadena de la ligasa (Barany, F., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), la replicación de secuencias automantenidas (Guatelli, J.C. y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh, D.Y y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), replicasa Q-Beta (Lizardi, P.M. y col., 1988, Bio/Technology 6: 1197), o cualquier otro procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en cantidades muy pequeñas.

En una realización de un esquema de detección de este tipo, se obtiene una molécula de ADNc a partir de una molécula de ARN de interés (por ejemplo, por transcripción inversa de la molécula de ARN a ADNc). Los tipos celulares o tisulares a partir de los cuales se puede aislar dicho ARN incluyen cualquier tejido en el que se sabe que se expresa el gen identificador natural, incluidos, pero sin limitarse a, los tejidos que contienen células de tipo Th0, TH1 y/o TH2. Una secuencia dentro del ADN se usa después como molde para una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, tal como una reacción de amplificación por PCR o similar. Los reactivos de ácido nucleico usados como reactivos de iniciación de síntesis (por ejemplo, cebadores) en las etapas de transcripción inversa y amplificación de ácidos nucleicos de este procedimiento se eligen de entre los reactivos de ácido nucleico del gen identificador descritos en la Sección 5.4. Las longitudes de tales reactivos de ácido nucleico preferidas son de al menos 9-30 nucleótidos. Para la detección del producto amplificado, la amplificación del ácido nucleico puede realizarse usando nucleótidos marcados radioactivamente o no radioactivamente. Alternativamente, puede fabricarse suficiente producto amplificado, de forma que el producto pueda visualizarse mediante tinción estándar con bromuro de etidio o utilizando cualquier otro procedimiento de tinción de ácidos nucleicos adecuado.

Además de los procedimientos que se centran principalmente en la detección de una secuencia de ácidos nucleicos identificadora, los patrones identificadores también pueden evaluarse en tales esquemas de detección. Los patrones identificadores, en este contexto, contienen el patrón de expresión de ARNm de una serie (es decir, al menos dos y hasta la cantidad total de los presentes) de genes identificadores obtenidos para un tejido o tipo celular dado bajo un conjunto de condiciones dado. Tales condiciones pueden incluir, por ejemplo, trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y condiciones relevantes para procesos implicados en la diferenciación, mantenimiento y función efectora de subpoblaciones de linfocitos TH.

Los ejemplos de trastornos relacionados con TH1 pueden incluir, por ejemplo, enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como la enfermedad de Crohn, artritis reactiva, incluida la enfermedad de Lyme, diabetes dependiente de insulina, autoinmunidad específica de órgano, incluida la esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Grave, dermatitis de contacto, soriasis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped y sarcoidosis. Los trastornos relacionados con TH2 pueden incluir, por ejemplo, afecciones atópicas, tales como asma y alergia, incluida la rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, incluidas las alergias alimentarias, eosinofilia, conjuntivitis, nefritis glomerular, ciertas sensibilidades a patógenos tales como infecciones helmínticas (por ejemplo, leishmaniasis) y ciertas infecciones víricas, incluido el VIH, y bacterianas, incluidas la tuberculosis y lepra lepromatosa.

Los patrones identificadores pueden generarse, por ejemplo, utilizando un procedimiento de presentación diferencial, como se discutió anteriormente, en la Sección 5.1.1.2, análisis Northern y/o RT-PCR. Cualquiera de las secuencias génicas descritas anteriormente, en la Sección 3.2.1 pueden usarse como sondas y/o cebadores para RT-PCR para la generación y corroboración de dichos patrones identificadores.

5.11.2 Detección de péptidos del gen diana

Los anticuerpos dirigidos contra péptidos del gen identificador naturales o mutantes que se explican anteriormente, en la Sección 5.6, también pueden usarse para diagnosticar y pronosticar trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Tales procedimientos de diagnóstico pueden usarse para detectar el producto del gen identificador, anomalías en el nivel de expresión de la proteína del gen identificador o anomalías en la estructura y/o localización temporal, tisular, celular o subcelular de la proteína del gen identificador. Las diferencias estructurales pueden incluir, por ejemplo, diferencias

en el tamaño, electronegatividad o antigenicidad de la proteína del gen identificador mutante en relación con la proteína del gen identificador normal.

5 La proteína del tejido o tipo celular que se va a analizar puede aislarse fácilmente usando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los procedimientos de aislamiento de proteínas empleados en el presente documento pueden ser, por ejemplo, como los descritos en Harlow y Lane (Halow, E. y Lane, D. 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

10 Los procedimientos de diagnóstico preferidos para la detección de moléculas de péptido del gen identificador naturales o mutantes pueden implicar, por ejemplo, inmunoensayos en los que los péptidos del gen identificador se detectan por su interacción con un anticuerpo específico anti-producto del gen identificador.

15 Por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como los descritos anteriormente, en la Sección 5.6, útiles en la presente invención pueden usarse para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de péptidos del gen identificador naturales o mutantes. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante técnicas de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo marcado fluorescente (véase, más adelante, en este Sección) acoplado con detección al microscopio óptico, por citometría de flujo o fluorimétrica. Tales técnicas se prefieren especialmente si los péptidos del gen identificador se expresan en la superficie celular, como es el caso, por ejemplo, de la forma transmembranaria del producto del gen 103. Por tanto, las técnicas descritas en el presente documento pueden usarse para detectar células específicas, dentro de una población de células, que expresan el producto del gen identificador de interés.

20 Los anticuerpos (o sus fragmentos) útiles en la presente invención pueden emplearse además histológicamente, como en microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica, para la detección in situ de péptidos del gen identificador. La detección in situ puede llevarse a cabo retirando un espécimen histológico de un paciente y aplicando sobre él un anticuerpo marcado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento) se aplica preferentemente disponiendo una capa del anticuerpo (o fragmento) marcado sobre una muestra biológica. A través del uso de un procedimiento de este tipo, es posible determinar no sólo la presencia de los péptidos del gen identificador, sino también su distribución en el tejido examinado. Utilizando la presente invención, los expertos en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de procedimientos histológicos (tales como procedimientos de tinción) puede modificarse para lograr tal detección in situ.

30 Los inmunoensayos para péptidos del gen identificador naturales o mutantes comprenden normalmente incubar una muestra biológica, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células recién recogidas o células que se han incubado en cultivo tisular, en presencia de un anticuerpo marcado de forma detectable capaz de identificar péptidos del gen identificador y detectar el anticuerpo unido mediante una cualquiera de diversidad de técnicas bien conocidas en la técnica.

35 La muestra biológica se puede poner en contacto con, e inmovilizarse sobre, un soporte o vehículo de fase sólida, tal como nitrocelulosa, u otro soporte o matriz sólido, que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. Después, el soporte se puede lavar con tampones adecuados, seguido de tratamiento con el anticuerpo específico para el gen identificador marcado de forma detectable. Después, el soporte de fase sólida se puede lavar con el tampón una segunda vez para retirar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido sobre el soporte sólido puede detectarse entonces por medios convencionales.

40 Por "soporte o vehículo de fase sólida" se quiere decir cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener prácticamente cualquier configuración estructural, siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por tanto, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo o la superficie externa de un rodillo. Alternativamente, la superficie puede ser plana, como una lámina, una tira de ensayo etc. Los soportes preferidos incluyen perlas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán otros muchos vehículos adecuados para unir anticuerpos o antígenos, o podrán determinarlos usando experimentación de rutina.

50 La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo anti-producto del gen identificador natural o mutante puede determinarse de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Los expertos en la técnica podrán determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación de rutina.

55 Una de las formas en que puede marcarse de forma detectable el anticuerpo específico para el péptido del gen identificador es engarzándolo a una enzima y usándolo en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A. "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD); Voller, A. y col., 1978, J. Clin. Pathol. 31:507-520; Butler, J.E., 1981, Meth. Enzymol. 73:482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, ENZYME IMMUNOASSAY, CRC Press. Boca Raton, FL; Ishikawa, E.

y col., (eds.), 1981, ENZYME IMMUNOASSAY, Kigaku Shoin. Tokio). La enzima que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferentemente un sustrato cromogénico, de forma que produzca un resto químico que pueda detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar el anticuerpo de forma detectable incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparagina, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección puede llevarse a cabo por procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede llevarse a cabo mediante comparación visual del alcance de la reacción enzimática para un sustrato en comparación con estándares preparados de forma similar.

La detección también puede llevarse a cabo usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radioactivamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo es posible detectar los péptidos del gen identificador naturales o mutantes mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo 1986, que se incorpora por referencia en el presente documento). El isótopo radioactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

También es posible marcar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado de manera fluorescente se expone a luz de la longitud de onda adecuada, puede detectarse su presencia debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje por fluorescencia usados más comúnmente están el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la aloficocianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina.

El anticuerpo también puede marcarse de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia, tal como el ¹⁵²Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes de dichos metales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

El anticuerpo también puede marcarse de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado quimioluminiscente se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Asimismo, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos, en los que una proteína catalítica incrementa la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. La luciferina, la luciferasa y la aecurina son compuestos bioluminiscentes importantes para fines de marcaje.

7. Ejemplo: identificación y caracterización de un gen específico de TH2

En el ejemplo presentado en esta Sección, se utilizó el paradigma de linfocito T transgénico descrito anteriormente, en la Sección 5.1.1.1, para identificar un gen que se expresa diferencialmente en linfocitos TH2. Específicamente, este gen está presente en linfocitos TH2, mientras que está completamente ausente en linfocitos TH1. El gen, que corresponde a un gen conocido alternativamente como ST-2, T1 y Fit-1, no parece expresarse ningún otro tipo celular o tejido ensayados y se demuestra aquí por primera vez que codifica un marcador que es completamente específico para TH2 in vivo. El gen 103 codifica una proteína de superficie celular, cuya importancia potencial se discute en el presente documento.

7.1 Materiales y procedimientos

Análisis por RT-PCR: La RT-PCR cuantitativa se realizó como sigue. Se sometieron a transcripción inversa 1-2 µg de ARN total preparado como se describe anteriormente, en la Sección 6.1, con oligos dT₍₁₂₋₁₈₎ como cebadores y transcriptasa inversa ARNasa H- Superscript (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). Brevemente, se combinó el ARN con 1 µl de oligo dT (500 µg/ml) en un volumen total de 11 µl. La mezcla se calentó hasta 70 °C durante 10 minutos y se enfrió en hielo. Después de un breve centrifugación, el ARN se sometió a transcripción inversa durante 1 hora. Se almacenaron alícuotas de la primera cadena de ADNc a -20 °C hasta justo antes de su uso.

Se determinaron los niveles de expresión por amplificación con PCR de diluciones seriadas del ADNc de la primera cadena. En este procedimiento, se diluyó el ADNc de forma seriada en agua. Las diluciones se amplifican después en lotes por PCR usando cebadores específicos de secuencia. Todas las reacciones de PCR se amplifican bajo condiciones idénticas. Por lo tanto, la cantidad de producto generado debería reflejar la cantidad de molde de secuencia que estaba presente inicialmente. Se usaron diluciones de ADNc de 5-10 veces y se usaron suficientes diluciones para que la cantidad de producto producida posteriormente variara de claramente visible, mediante

iluminación UV de geles teñidos con bromuro de etidio, a por debajo de los niveles de detección. El procedimiento descrito en el presente documento puede distinguir diferencias de 10 veces en los niveles de expresión.

Se diseñaron cebadores para la amplificación de las bandas amplificadas secuenciadas, que se eligieron usando el programa OLIGO (National Biosciences, Plymouth, MN). Las secuencias de los cebadores usados en este ensayo fueron las siguientes: cebador sentido banda 103, 5'-TTGCCATAGAGAGACCTC-3' (SEC ID N.º: 18); cebador antisentido banda 103, 5'-TGCTGTCCAATTATACAGG-3' (SEC ID N.º:19); cebador sentido gamma actina murina, 5'-GAACACGGCATTGTCACTAACT-3' (SEC ID N.º: 20); cebador antisentido gamma actina murina, 5'-CCTCATAGATGGGCACTGTGT-3' (SEC ID N.º: 21).

Todas las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en una máquina de PCR 96000 Perkin-Elmer (Perkin-Elmer). Generalmente, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30-40 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, apareamiento a 50-60 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Tras los ciclos, se extendieron las reacciones durante 10 minutos a 72 °C.

Ensayos de protección de RNasa: Se realizaron ensayos de protección de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando un kit comprado en Albion, Inc. en los ensayos de protección de RNasa se utilizaron sondas de ARN derivadas del N.º de acceso Y07519 de GenBank. Estas sondas también se generaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando un kit comprado en Albion, Inc. La secuencia de estas sondas de ARN corresponde al extremo 5' del gen e incluye tanto las secuencias codificantes como las no traducidas de 5'.

Estimulación anti CD-3: Las condiciones fueron las descritas más adelante, en la Sección 8.1.

Otros procedimientos: Todos los demás procedimientos de recolección de muestras celulares, aislamiento de ARN, presentación diferencial, análisis de secuencias y procedimientos Northern realizados en los experimentos descritos en este Ejemplo fueron como se ha descrito.

7.2 Resultados

Se describe un análisis de presentación diferencial de ARN aislado a partir de muestras de linfocitos TH1 y TH2 obtenidas de un estudio del paradigma de linfocito T transgénico. Específicamente, los linfocitos TH se obtuvieron de ratones transgénicos que albergaban un receptor de linfocitos T que reconoce ovoalbúmina (Murphy y col., 1990, Science 250:1720). Fueron estimulados tres veces y se obtuvo ARN de linfocitos TH1 y TH2. El análisis de presentación diferencial de las muestras de ARN dio como resultado la identificación de una banda de TH2 expresada diferencialmente, denominada y a la que se hace referencia en el presente documento como banda 103. El gen correspondiente a la banda 103 se denomina en el presente documento gen 103.

Se aisló, amplificó y subclonó el ADNc del gen 103 y se obtuvo la secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º: 2), como se muestra en la FIG. 4A. Una búsqueda en bases de datos reveló que la secuencia de la banda 103 daba como resultado un alineamiento con un 98 % de identidad con la forma murina de un gen conocido alternativamente como el gen ST-2, T1 o Fit-1 (Klemenz, R. y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5708-5712; Tominaga, S., 1989, FEBS Lett. 258:301-301; Werenskiold, A.K. y col., 1989, Mol. Cell. Biol. 9:5207-5214; Werenskiold, A.K., 1992, Eur. J. Biochem. 204:1041-1047; Yanagisawa, K. y col., 1993, FEBS Lett. 318:83-87; Bergers, G. y col., 1994, EMBO J. 13 :1176-1188).

El gen 103 codifica, posiblemente a través de transcritos ajustados de forma alternativa, formas transmembranarias y solubles de proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La forma soluble de la proteína muestra un alto nivel de similitud con la porción extracelular del receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1) y el receptor de interleucina-1 de tipo 2 (IL-1R2, que carece de dominio citoplásmico) de ratón , mientras que la porción transmembranaria (denominada ST2L) tiene un gran parecido con la secuencia completa del IL-1R1 y con las secuencias extracelulares del IL-1R2. Además, el gen 103 parece estar íntimamente engarzado con el locus del receptor de interleucina-1 de tipo 1 (McMahen, C.J. y col., 1991, EMBO J. 10:2821-2832; Tominaga, S. y col., 1991, Biochem. Biophys. Acta. 1090:1-8). Además, también se ha informado del homólogo del gen 103 humano (Tominaga, S. y col., 1992, Biochem. Biophys. Acta. 1171:215-218). La FIG. 4R ilustra las formas transmembranaria y soluble de la proteína del gen 103 y muestra su relación con la secuencia proteica del IL-1R1.

Un análisis por RT-PCR cuantitativa (FIG. 5) de ARN obtenido a partir de células de linfocitos TH1 y TH2 generados como se describe anteriormente, 24 horas después de la estimulación antigénica terciaria, no sólo confirmó la expresión diferencial teórica del gen, sino que reveló que la expresión del gen 103 parece ser específica para TH2, es decir, el estudio de RT-PCR sensible no detectó mensaje del gen 103 en la muestra de ARN de TH1.

La especificidad para TH2 del gen 103 se confirmó adicionalmente mediante un análisis Northern de varias líneas de linfocitos TH representativas. Específicamente, se utilizaron tres clones de TH2 (CDC25, D10.G4, DAX) y tres clones de TH1 (AE7.A, Morris, D1.1) y se aislaron muestras de ARN tanto de células no estimuladas como de células que habían sido estimuladas durante 6 horas con anticuerpo anti-CD3 unido a placas. Las muestras se sondaron con secuencias de la banda 103, como se muestra en la FIG. 6. aunque el ARN del gen 103 está presente en el ARN

obtenido tanto de las células no estimuladas como de las estimuladas de cada una de la líneas de linfocitos TH2, el ARN del gen 103 está totalmente ausente de todas las muestras obtenidas tanto de los linfocitos TH1 estimulados como de los no estimulados. Como demostraba en primer lugar el análisis por RT-PCR descrito anteriormente, el gen 103 parece ser específico para TH2, sin señal derivada de TH1 detectable presente.

5 Los datos presentados en la FIG. 7 representan un análisis Northern adicional en el que se ensayó la expresión del gen 103 en clones de linfocitos TH (carriles 1-5) y en tejidos murinos (carriles 6-10). Además de corroborar la expresión del ARN del gen 103 tanto en linfocitos TH2 estimulados como no estimulados, los datos aquí presentados demuestran que la expresión del gen 103 parece ser negativa en cada uno de los tejidos ensayados (es decir, cerebro, corazón, pulmón, bazo e hígado).

10 La FIG. 8 ilustra un ensayo de protección de RNasa que demuestra dos puntos en cuanto a la regulación del gen 103. En primer lugar, este análisis de clones de linfocitos TH confirma los resultados específicos para TH2 anteriores. Específicamente, los resultados de este estudio demuestran mediante protección de RNasa que el ARNm del gen 103 está ausente del clon AE7 de TH1, pero que está presente en el clon D10 de TH2. G4.

15 En segundo lugar, la protección de RNasa reveló que las formas alternativas de los transcritos del gen 103 se producen tras la estimulación de los clones de TH2. Específicamente, al cabo de 6 horas de estimulación anti-CD3, aparecen dos formas adicionales de transcritos del gen 103 en clones de TH2. Estas formas de transcritos del gen 103 adicionales representa, en primer lugar, un transcrito que codifica una forma soluble, segregada, acortada del producto de la banda del gen 103, y en segundo lugar, un transcrito más pequeño denominado mini que codifica una forma aún más corta del producto génico. Por tanto, parece que, mientras el transcrito del gen 103 que codifica el producto génico transmembranario se expresa tanto en linfocitos TH2 no estimulados como estimulados, las dos formas más cortas del transcrito se expresan de una manera inducible específica para TH2. Además, mientras que el transcrito del gen 103 que codifica el producto transmembranario se expresa tanto en linfocitos TH2 estimulados como no estimulados, el nivel de este transcrito presente en los estimulados es menor, es decir, está regulado por disminución. Por tanto, el menor nivel de producto transmembranario y el mayor nivel de producto segregado del gen 103 pueden actuar en sinergia para reducir algún suceso de transducción de señales inducido por estimulación.

25 Además, debería observarse que los resultados presentados en el presente documento representan la primera vez que se ha observado la forma mini del transcrito del gen 103, que puede codificar una versión más corta de la forma soluble del producto del gen 103.

30 Para resumir, aunque se había informado anteriormente de la expresión del gen 103 en linfocitos T cooperadores (Tominaga, S. y col., 1992, Biochem. Biophys. Acta. 1171:215-218), las técnicas de paradigma de TH/presentación diferencial utilizadas aquí han demostrado por primera vez que el gen 103 codifica un marcador de superficie específico de subpoblaciones de linfocitos TH2. De hecho, los resultados descritos en este Ejemplo demuestran la primera identificación de cualquier marcador celular específico de subpoblaciones de linfocitos TH in vivo.

35 Dado su estatus tanto de marcador específico de subpoblaciones de linfocitos TH2 como de proteína celular de superficie, el producto del gen 103 de longitud completa puede utilizarse en una variedad de procedimientos para modular trastornos relacionados con subpoblaciones de linfocitos TH y/o identificar compuestos que muestren capacidad moduladora. Las formas truncadas de los productos del gen 103 pueden usarse, adicionalmente, como parte de estos procedimientos. Los procedimientos moduladores se describieron anteriormente, en la Sección 5.9, mientras que las estrategias para la identificación de compuestos moduladores se describieron anteriormente, en la Sección 5.8.

40 **10. Ejemplo: Construcción y expresión de proteínas de fusión de IgG1**

En este Ejemplo se describe la construcción y expresión de proteínas de fusión de IgG1. Específicamente, se discute la construcción de proteínas de fusión de IgG1 del gen 103 humano y murino.

10.1 Materiales y procedimientos

45 Plásmidos recombinantes que codifican proteínas de fusión de IgG1:

Generación del vector que codifica la proteína de fusión de gen 103 murino-hIgG1: La construcción de un vector que codifica una proteína de fusión de Ig soluble (tamaño: aproximadamente 60 kD) que contiene un dominio extracelular del producto del gen 103 murino (pero que carece de la secuencia señal del producto del gen 103) se construyó como se describe aquí. La porción CD44 del vector pCD5-CD44-IgG1 (véase Aruffo, A. y col., 1991, Cell 61 : 1303-1313) se reemplazó con una secuencia de nucleótidos que codificaba el dominio extracelular del producto del gen 103. La secuencia del dominio extracelular del producto del gen 103 de la proteína de fusión de Ig consistía en los residuos de aminoácido 27-342 del producto del gen 103 (es decir, la porción del producto del gen 103 que termina con la secuencia de aminoácidos Ile-Val-Ala-Gly-Cys-Ser).

El fragmento que codifica el dominio extracelular del producto del gen 103 se amplificó por PCR usando oligonucleótidos sintéticos complementarios a las secuencias que flanquean la región del gen 103 que produciría el producto génico que contiene los residuos de aminoácido 27-342. Los oligonucleótidos se diseñaron para permitir la creación de un sitio KpnI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3' de cada fragmento del gen 103 amplificado para facilitar la subsiguiente inserción en el pCD5-CD44-IgG1.

El oligonucleótido 5' fue el siguiente: 5'-CCGCGGGTACCAGTAAATCGTCCTGGGGTGG-3' (SEC ID N.º: 29). El oligonucleótido 3' fue el siguiente: 5'-AAATAAAGGATCCCTACATCCAGCAACTATGTAGTA-3' (SEC ID N.º: 30).

Las condiciones de reacción de la PCR consistieron en 15 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, usando polimerasa de ADN Vent (New England Biolabs, Beverly, MA) y el gen 103L como molde.

Los productos de 103 de PCR se digirieron con KpnI y BamHI y se ligaron a los sitios KpnI-BamHI del vector CD5-IgG1, reemplazando así las secuencias CD44 con las secuencias del gen 103.

Seguendo las sugerencias del fabricante, el plásmido resultante, que codificaba una proteína de fusión que contenía la secuencia señal de CD5, el dominio extracelular de 103 murino y la región Fc de la cadena pesada de la IgG1 humana, se transfirió en células COS usando LipofectAMINE™ (GIBCOBRL, MD). Se usaron 0,18 µg de ADN plasmídico y 140 µl de LipofectAMINE™ para la transfección de las células de una placa de 150 mm. Veinticuatro horas después de la transfección, el medio se reemplazó con suero fetal bovino de IgG ultra baja (GIBCOBRL, MD)/DMEM (BioWHITTAKER, Maryland) y las células transfectadas se dejaron crecer durante 4-5 días de forma continua. Entonces, los sobrenadantes se recogieron, se centrifugaron para retirar las células no adherentes y los desechos y se almacenaron a -20 °C.

Para la purificación se precipitó 1ml de sobrenadante durante la noche con 10 µl de rProteína A inmovilizada IPA-300 (Repligen, MA) a 4 °C. Al día siguiente, se recogieron las perlas por centrifugación y se lavaron tres veces con 10 volúmenes de PBS. Para el análisis, se suspendieron las perlas en 20 µl de tampón de muestras Laemmli 2 x (BIO-RAD, CA) y se llevaron a ebullición a 100 °C durante 10 min. La mezcla hervida se centrifugó brevemente y se cargó en un gel de SDS-PAGE al 10 % (JILEinc. CT).

Marcaje metabólico de proteínas de fusión recombinantes: 36 horas después de la transfección transitoria de cultivos COS-7, la células se aclararon con medio de crecimiento de reemplazo [DMEM sin metionina ni cisteína (ICN, Inc., CA)]. Después del aclarado, se añadieron 150 µl/ml de medio de una mezcla de ³⁵S-cisteína y ³⁵S-metionina (Express ³⁵S³⁵S™, Dupont, MA) al medio de reemplazo y las células se cultivaron durante la noche.

Análisis de proteínas recombinantes por SDS-PAGE:

Las proteínas de fusión de hlgG1 se generaron mediante transfección transitoria mediada con LipofectAMINE™ (Gibco, Inc., MD) de células COS-7 de acuerdo con las sugerencias del fabricante para 200 proteínas de fusión de gen-hlgG1, se mezcló 1 ml del sobrenadante del día 5 con 20 µl de perlas Trisacryl de proteína A (Pierce, Inc., IL) en presencia de HEPES 20 mM (pH 7,0) durante la noche a 4 °C con agitación constante. Las perlas se lavaron después con PBS 3 X antes de la adición del tampón de carga. Las perlas se mezclaron con tampones reductores o no reductores (descritos en Molecular Cloning, Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 2ª edición, 1989, con la excepción de que el DTT se reemplazó con β-mercaptoetanol al 2,5%).

10.2. Resultados

En el presente documento se describe la construcción y expresión de proteínas de fusión de IgG recombinantes. Específicamente, se describen las proteínas de fusión de producto del gen 103-IgG1. La proteína de fusión de producto del gen 103-IgG1 contiene una secuencia señal de CD5 y un dominio extracelular del producto del gen 103 fusionado a una región Fc de la cadena pesada de una IgG1 humana.

11. Ejemplo: producción y caracterización de animales transgénicos

En el presente documento se describen la producción y caracterización de ratones transgénicos que sobreexpresan el producto del gen 103 murino.

11.1 Materiales y procedimientos

El plásmido pCIL-10 contenía un fragmento genómico BamHI-XbaI de 5,5 kb, dentro del cual estaba incluido el potenciador de CD2 humano (Greaves y cols., 1989, Cell 56 (6): 979-86). Se engarzó un promotor de cadena pesada de inmunoglobulina humana que contenía un fragmento XXXbaI-SmaI de 0,5 kb, Pµ (Danner y Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82:8658-8662) con el extremo 3' del fragmento CD2. Después del fragmento Pµ había un fragmento XbaI (de extremos romos)-BamHI que contenía la secuencia codificante de IL-10, a la que estaba ligado el fragmento genómico BamHI-EcoRI de 2,1 kb de la hormona del crecimiento humana (bases 5164 a 7317 de HUMGHCSA (GenBank)) en el extremo 3' de la construcción.

Construcción del clon transgénico del gen 103:

Se usó un producto de PCR de la secuencia completa del gen 103 para reemplazar el gen IL-10 en el plásmido pCIL-10. El plásmido pCIL-10 era como se ha descrito anteriormente. Se obtuvo un producto de PCR de la secuencia codificante completa de la forma larga del gen 103 murino (Yanagisawa, K. y col., 1993, FEBS 318:83-87) a través de una reacción de 35 ciclos usando ADNc de primera cadena de una línea de linfocitos TH2 de ratón, D10G4 (ATCC, MD), como molde. Se extrajo ARN total a partir de la línea celular mediante RNazole™ (TEL-TEST, Inc., TX). Se usaron siete microgramos de ARN en una reacción de síntesis de 20 µl de ADNc de primera cadena Superscript Reverse Transcriptase I (GIBCO BRL, MD) siguiendo las sugerencias del fabricante. Se usaron dos microlitros de ADNc en la reacción de PCR. El oligo 5' fue 5'-GAACACACTAGTACTATCCTGTGCCATTGCCATAGAGA-3' (SEC ID N.º: 33), y el oligo 3', 5'-GGAATATTGGGCCCTTGGATCCCAAGTCGCACACCTGCACTCC-3' (SEC ID N.º: 34) con sitios de restricción compatibles SpeI en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3', respectivamente. Después de una desnaturalización con calor a 95 °C, durante 2 minutos, se realizó un ciclo en 3 etapas a 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 65 °C y 60 segundos a 72 °C mediante polimerasa de ADN Vent™ (New England Biolabs, Beverly, MA). Se realizó una etapa final durante cinco minutos a 72 °C para pulir los extremos. El producto de PCR se digirió con SpeI y BamHI (New England Biolabs) y se ligó en los sitios SpeI-BamHI del vector pBSKIIIGH, que contenía el fragmento de la hormona del crecimiento humana de pCIL-10 subclonado en el sitio BamHI-*Xho*I de pBSKII (Stratagene), que se llamó pBS-103L-GH. El potenciador CD2 humano que contenía el fragmento pCIL-10 y el promotor P_μ se ligaron después inmediatamente aguas arriba del gen 103L de pBS-103L-GH. Se usaron células competentes DH5α de *E. coli* de máxima eficacia (GIBCO BRL, MD) para la transformación siguiendo las sugerencias del fabricante. Los transformantes se crecieron en caldo LB que contenía 0,1 µg/ml de ampicilina y se extrajo ADN con el kit Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, CA). Se realizó un análisis de restricción para confirmación y la construcción se secuenció para eliminar cualquier mutación posible introducida por PCR. Se seleccionó un plásmido denominado pCD2-103L-GH para la producción de ratones transgénicos.

Producción de ratones transgénicos

Se obtuvieron ratones C3H/HEJ y FVB/NJ del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se indujo la ovulación de hembras de 3-4 semanas de edad mediante inyección intraperitoneal de suero de yegua preñada (PMS) entre las 10 a.m. y las 2 p.m., seguido 46 horas después por la inyección intraperitoneal de gonadotropina coriónica humana (hCG). Tras la administración de hCG, las hembras se alojaron durante la noche con machos de la misma cepa. A la mañana siguiente se examinó a las hembras para evaluar la presencia de un tapón copulatorio y se aislaron los embriones de aquellas hembras con tapones, esencialmente como se describe en *Manipulating the Mouse Embryo* (Hogan y col., eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994).

Se preparó ADN para microinyección de los embriones mediante la digestión del p200Tr3 y el pCD2-103L-GH1 con *Not*I and *Xho*I, seguida por una electroforesis en gel. Los fragmentos de 9 kb y 10 kb, respectivamente, se sometieron a electroforesis sobre una membrana de NA-45 (Schleicher y Schuell) cortando una hendidura en el gel inmediatamente enfrente de la banda deseada, insertando la membrana de NA-45 y continuando la electroforesis hasta que la banda de ADN se haya transferido a la membrana. El ADN se eluyó de la membrana por incubación con 0,4 ml de NaCl 1M/base libre de arginina 0,05 M a 65-70 °C durante varias horas en un tubo de microcentrífuga. El ADN eluido se extrajo con fenol/cloroformo y cloroformo, se precipitó con etanol y se disolvió en 200 µl de Tris 5 mM, pH 7,5/EDTA 0,1 mM. Después, el ADN se precipitó de nuevo con etanol y se redisolvió en 40 µl de Tris 10 mM, pH 7,5/EDTA 0,1 mM. Antes de la microinyección, el ADN se diluyó a 1-2 µg/ml en Tris 10 mM, pH 7,5/EDTA 0,1 mM.

El ADN se microinyectó en los pronúcleos masculinos de embriones de las cepas C3H/HEJ o FVB/NJ y los embriones inyectados se transfirieron a los oviductos de hembras pseudopreñadas esencialmente como se describe en *Manipulating the Mouse Embryo*. La descendencia resultante se analizó para evaluar la presencia de secuencias transgénicas mediante hibridación de bandas de Southern de ADN preparado a partir de biopsias de colas.

Análisis de bandas de Southern de ratones transgénicos:

Se cortó una pieza de aproximadamente 1/2* de cola y se digirió en 500 µl de solución de proteinasa K [que contenía Tris HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 5 mM, pH 8,0; SDS al 0,2 %; NaCl 200 mM; 100 µg/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania)] a 55 °C durante la noche. Los digeridos se centrifugaron durante 15 minutos para retirar los desechos no digeridos. Los sobrenadantes se precipitaron con un volumen igual de isopropanol a temperatura ambiente. Los precipitados se centrifugaron durante 25 minutos y los sedimentos se lavaron en etanol al 75 %. Los precipitados se secaron y se resuspendieron en 100 µl de TE; pH 8,0. La digestión por restricción del ADN de la cola se realizó como sigue: Se digirieron 20 µl de solución de ADN con 80 unidades de BamHI (New England Biolabs) en presencia de espermidina 1 mM durante la noche a 37 °C. Las muestras digeridas se analizaron mediante electroforesis en gel usando geles de agarosa al 0,8 %. El ADN separado se transfirió a Hybond-N+ (Amersham, Inc.) después de la depurinización en HCl 0,25 M durante 10 minutos seguida de NaOH 0,5 M, NaCl 1 M durante 30 minutos y después Tris-HCl 2,5 M (pH 7,4), NaCl 2,5 M durante 30 minutos. Inmediatamente antes de

la transferencia, los geles se equilibraron brevemente en un tampón de transferencia SSC 10 X. La transferencia se llevó a cabo durante la noche en SSC 10 X por acción capilar. Después de la transferencia, la membrana se secó al aire y se reticuló por UV usando un Stratolinker (Stratagene, Inc.). Después de la reticulación, las membranas se aclararon brevemente en SSC 2 X.

5 Para los animales transgénicos para el gen 103 se utilizó un fragmento de PCR radiomarcado con ³²P de la construcción pCD2-103L-GH descrita anteriormente. El fragmento de PCR se generó usando los siguientes cebadores: oligo 5': 5'-GTA-AAT-CGT-CCT-GGG-GTC-TGG-3' (SEC ID N.º: 35; oligo 3': 5'-CCT-TCT-GAT-AAC-ACA-AGC-ATA-AAT-C-3' (SEC ID N.º: 36). Usando estos cebadores de oligonucleótido y el molde de pCD2-103L-GH, las condiciones de reacción para la PCR fueron las siguientes: 20 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, usando polimerasa de ADN Vent™ (New England Biolabs, Beverly MA). Después de la hibridación con genoma de ratón digerida con EcoRI y SpeI, la sonda resultante hibridó con una banda de 2,4 kb endógena y una banda específica de transgénicos de 0,85 kb.

11.2. Resultados

15 Los ratones transgénicos para el gen 103 (cinco líneas fundadoras FVB) se produjeron de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, en la Sección 11.1. El análisis de hibridación de Southern demostró la producción exitosa de animales transgénicos fundadores para el gen 103. Aproximadamente a los 6 a 7 meses de edad, tres de los animales fundadores, parecían enfermos tras un examen visual. Uno de estos fundadores, denominado 130-1.2 fue sacrificado aproximadamente a los 6 meses de edad. En el momento del sacrificio, se esperaba que ninguna de las hembras fuera a sobrevivir un tiempo significativamente más largo. Tras la disección del 130-1.2 se hizo evidente que el bazo y uno de los riñones eran manifiestamente anormales. El bazo tenía un tamaño aproximadamente diez veces mayor de lo normal y parecía estar lleno de células de aspecto pálido. Las poblaciones de esplenocitos se examinaron por citometría de flujo y se determinó que la población celular predominante era positiva para expresión de MAC-1 (un marcador celular de superficie de macrófagos/granulocitos). Estas células también tenían perfiles de dispersión lateral elevados. Se tiñeron secciones de bazo de este animal con hematoxilina y eosina y se observaron con microscopía óptica. Estos datos sugieren que la población celular anormal estaba compuesta de neutrófilos polimorfonucleares. El riñón anormal también parecía infiltrado por estas mismas células.

30 Una de las crías de 130-1.2 falleció aproximadamente a los 6 meses de edad al dar a luz a su segunda camada. Tras la disección, se observó que parecía haber obstrucción intestinal, lo que podría haber contribuido a la causa de la muerte. Además, otro animal fundador más parecía estar bastante enfermo y fue sacrificado. Sin embargo, en este animal no se observaron anomalías ni por inspección a simple vista de los órganos ni por análisis por citometría de flujo de las poblaciones linfáticas. Finalmente, se observó que el animal fundador restante mostraba síntomas de enfermedad aproximadamente a los 6 meses de edad.

35 Dado que estos animales se mantuvieron bajo condiciones SPF (libres de patógenos específicos), es muy poco probable que estos animales caigan enfermos a través de la exposición a un patógeno infeccioso. Más bien, lo más probable es que el efecto del transgén sea de modulación de algún aspecto del sistema inmunitario. Basándose en la observación del 130-1.2, se sospecha que como consecuencia de la expresión del transgén, la línea puede sufrir una inmunodeficiencia y es susceptible, por tanto, a infecciones por organismos normalmente inocuos presentes en el entorno (bacteria, etc.). Por lo tanto, es posible que este producto génico funcione normalmente en algunos aspectos de la respuesta efectora inmunitaria o en la correcta regulación del sistema inmunitario.

Doscientas líneas fundadoras de ratones transgénicos generadas en la cepa endogámica FvB no mostraron ningún síntoma visible de enfermedad al acercarse a los 6 meses de edad.

12. Depósito de microorganismos

45 Los siguientes microorganismos se depositaron en la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola (NRRL), Peoria, Illinois el 19 de enero de 1995 (10-C, 57-E, 105-A, 106-H, 161-G, 200-O), el 2 de marzo de 1995 (DH10B (Zip)™ de *E. coli* que contiene 200-P) y el 1 de junio de 1995 (200-AF, 10-x, 54-C) y se les asignaron los números de acceso que se indican:

Microorganismo	N.º de Acceso NRRL
10-C	B-21390
57-E	B-21391
105-A	B-21392

ES 2 370 406 T3

106-H	B-21393
161-G	B-21394
200-O	B-21395
E. coli	B-21416
DH10B (Zip)™ que contiene ADNc de 200-P	
200-AF	B-21457
10-X	B-21455
54-C	B-21456

Los siguientes microorganismos se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, Maryland, el 12 de diciembre de 1995 y se les asignaron los números de acceso siguientes:

Microorganismo	N.º de Acceso ATCC
E. coli, feht 200C	69967

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente a un péptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º: 2 o un péptido codificado por el gen T1, ST-2 o Fit-1 o uno de sus fragmentos que se una de ese modo, para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH2 seleccionadas de entre afecciones atópicas, infección helmíntica, infección vírica e infección bacteriana.
2. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH es una afección atópica.
3. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la afección atópica es asma.
4. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la afección atópica es alergia.
- 10 5. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la afección atópica es rinitis alérgica, una alergia gastrointestinal, eosinofilia, conjuntivitis o nefritis glomerular.
6. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH2 es leishmaniasis.
- 15 7. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH2 es infección por VIH.
8. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno relacionado con subpoblaciones de linfocitos TH2 es una infección bacteriana seleccionada de entre tuberculosis y lepra lepromatosa.
- 20 9. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos.
10. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo humanizado o uno de sus fragmentos.
11. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para un uso como se enuncia, en el que el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo quimérico o uno de sus fragmentos.
- 25 12. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 a 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.
13. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 a 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
14. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 a 8, en el que el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.
- 30 15. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento se une específicamente al dominio extracelular del péptido.
16. Un procedimiento in vitro de separación de linfocitos TH2 de una población celular que comprende la unión a un péptido presente en la célula deseada de interés y codificado por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 2 o un péptido presente en la célula deseada de interés y codificado por el gen T1, ST2 o Fit-1 con un anticuerpo o fragmento específicos para el dominio extracelular de dicho péptido, y la retirada de células unidas por dicho anticuerpo o fragmento.
- 35 17. Un procedimiento in vitro para reducir el número de linfocitos TH2 presentes en una población celular que comprende la unión a un péptido presente en las células deseadas de interés y codificado por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 2 o un péptido presente en las células deseadas de interés y codificado por el gen T1, ST2 o Fit-1 con un anticuerpo o fragmento específicos para el dominio extracelular de dicho péptido, y la retirada de células unidas por dicho anticuerpo o fragmento.
- 40

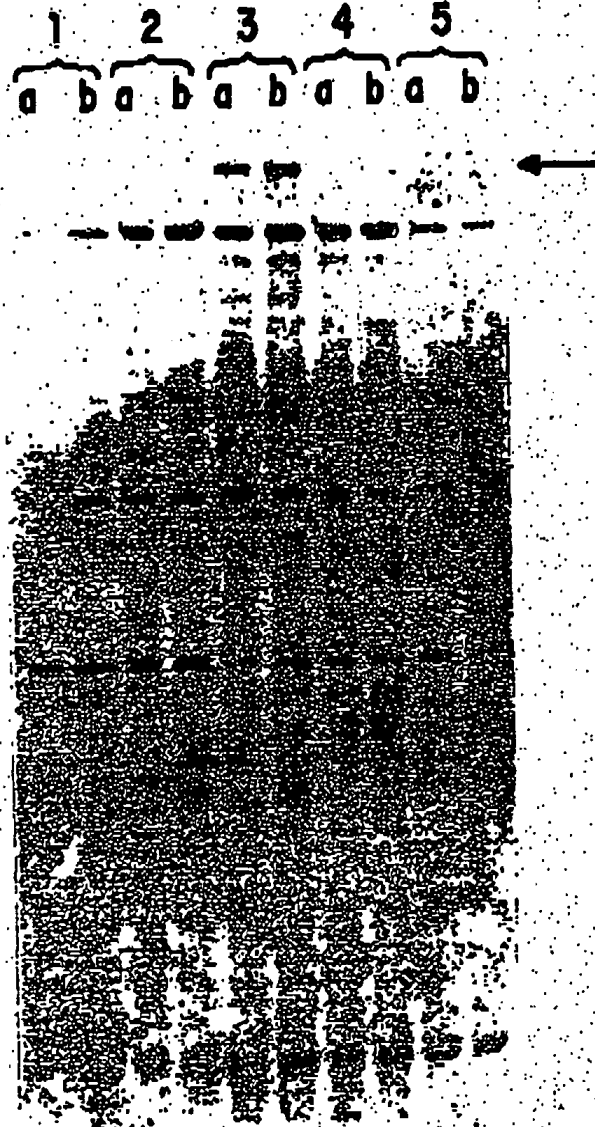


FIG. 1

5

10

```
      10      20      30      40      50      60
TTAGCGCCAT TGCCATAGAG AGACCTCAGC CATCAATCAC TAGCACATGA TTGACAGACA 60
GAGAATGGGA CTTTGGGCTT TGGCAATTCT GACACTTCCC ATGTATTTGA CAGTTACGGA 120
GGGCAGTAAA TCGTCCTGGG GTCTGGAAAA TGAGGCTTTA ATTGTGAGAT GCCCCCAAAG 180
AGGACGCTCG ACTTATCCTG TGGAA TGTA TTA CTGAGAT ACAAATGAAA GTATTCCTAC 240
CCAAAAAAAA AAAAA 255
```

FIG. 4A

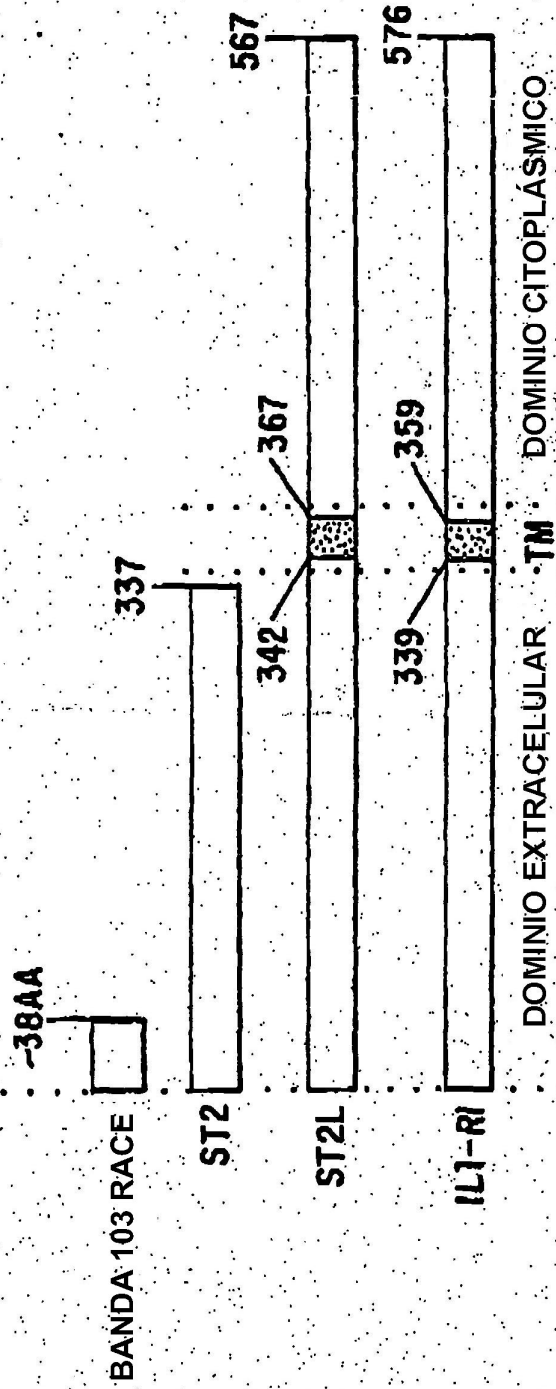


FIG. 4B



FIG. 5

5

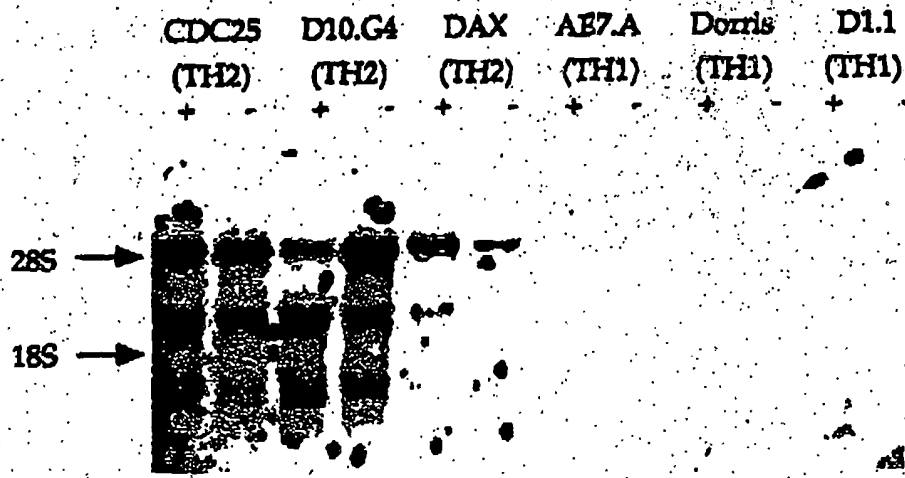


FIG. 6

5

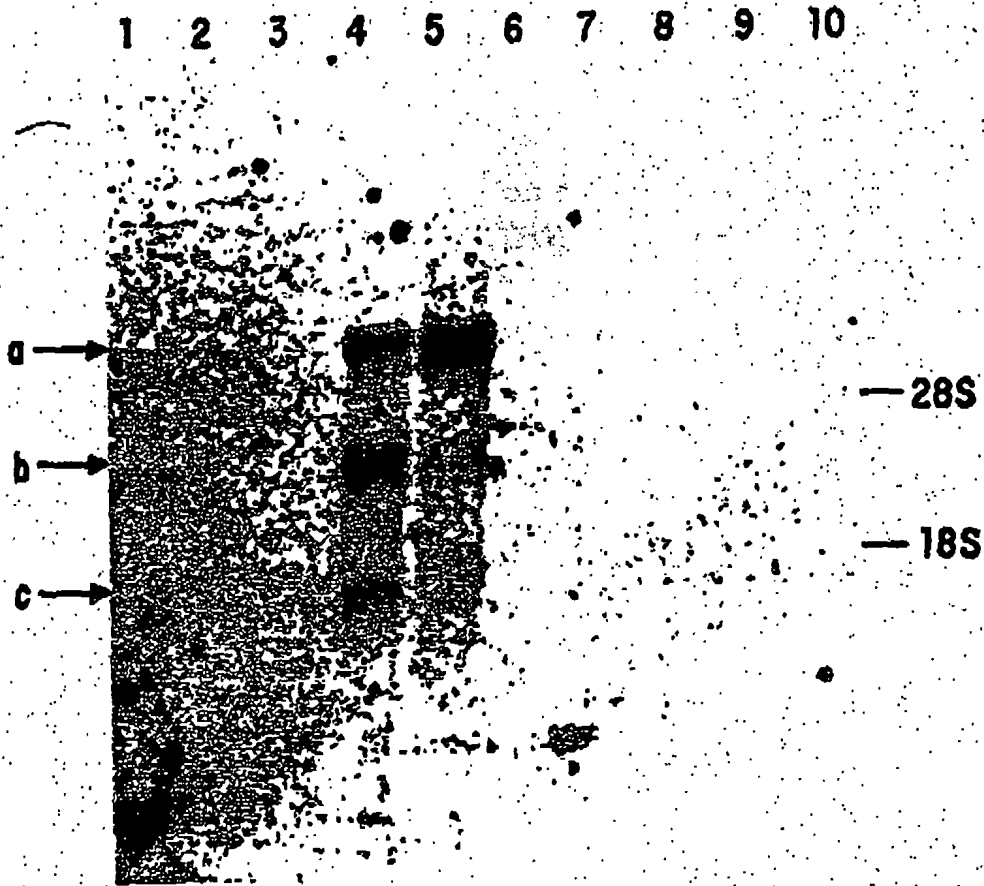


FIG. 7

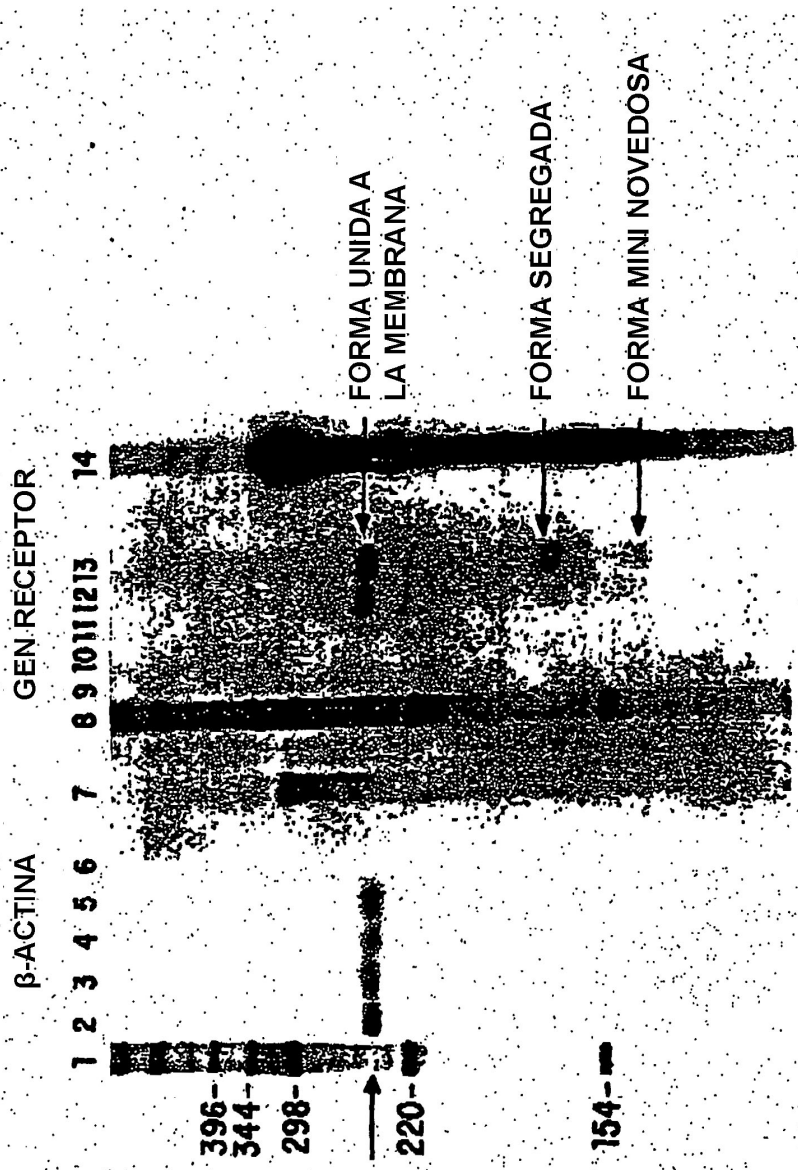


FIG. 8