

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 095**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12N 5/12** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 1/19** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.1998 E 05020384 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 1632500**

54 Título: **Un receptor de superficie de linfocitos que se une a CAML, ácidos nucleicos que lo codifican y métodos de uso del mismo**

30 Prioridad:

**03.03.1997 US 810572**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.11.2015**

73 Titular/es:

**ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL  
(100.0%)  
327 NORTH LAUDERDALE  
MEMPHIS, TN 38105-2794, US**

72 Inventor/es:

**BRAM, RICHARD J. y  
VON BULOW, GOTZ**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 552 095 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Un receptor de superficie de linfocitos que se une a CAML, ácidos nucleicos que lo codifican y métodos de uso del mismo

5 La descripción se refiere de forma general a la regulación de la transcripción en linfocitos, las proteínas implicadas en ello, sus anticuerpos, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas y los usos de los ácidos nucleicos, anticuerpos y proteínas.

10 Los investigadores sólo están comenzando a discernir los mecanismos que controlan la respuesta celular en respuesta a factores extrínsecos. Una propiedad básica de muchos de tales mecanismos es la unión inicial de un factor extrínseco, por ejemplo, un ligando, a una proteína de membrana de la superficie celular, es decir, un receptor. La unión de un ligando a su receptor por lo general produce un cambio celular a través de una cascada de acontecimientos. Estos acontecimientos comúnmente implican a otras proteínas, tales como proteína quinasas, proteína fosfatasa, proteínas JAK, proteínas Stat y/o proteínas G. Además, generalmente se requiere que un factor de transcripción se una a una secuencia reguladora de ADN específica en el núcleo de la célula, y que así se inicie la transcripción de uno o varios genes particulares.

15 Otros factores a menudo están implicados. En la activación de linfocitos estimulada por antígenos, por ejemplo, la entrada de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es también necesaria para la iniciación última de la transcripción de ADN. El aumento de la concentración de calcio citoplásmico puede provenir de una entrada externa o de una liberación de los almacenamientos internos. El aumento de la concentración de calcio que activa la proteína fosfatasa dependiente de calcio calcineurina actúa junto con otros agentes para señalar la iniciación de la transcripción. Está claro que la ruta que implica la entrada de calcio es esencial para un número de procesos implicados en la activación y la proliferación de células.

20 Los niveles de calcio intracelular juegan una función principal en un número de tipos de células diferentes implicando a un número de actividades diferentes. Además de la inducción de la transcripción génica por la entrada de calcio, muchos otros acontecimientos dependientes de calcio, tales como los que ocurren durante la contracción del músculo (tanto cardíaco como esquelético), la degranulación de vesículas (tal como en la respuesta de neutrófilos y macrófagos frente a la infección, o la respuesta de basófilos frente al estímulo de antígenos, o la liberación de acetilcolina por las neuronas), y el cierre de las uniones comunicantes intracelulares ofrecen vías para la regulación celular. El ciclo celular también puede implicar a los flujos de calcio. Los quelantes intracelulares que bloquean los cambios de la concentración de calcio intracelular pueden bloquear que el ciclo celular progrese, deteniendo así la división celular. [Rabinovich *et al.*, *J. of Immunol.*, **137**:952-961 (1986)]. Por lo tanto, la regulación del calcio puede ser eficaz en la modulación de la división celular en células normales y enfermas.

25 Los linfocitos son un componente principal del elemento celular del sistema inmunológico. La activación de un tipo particular de linfocitos, las células T, puede dar como resultado la estimulación de un receptor de células T mediante, por ejemplo, la unión de un receptor de células T (TCR) a un antígeno aparecido por una célula que presente el antígeno. Esta estimulación causa la activación de una fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , calcineurina. La calcineurina activada, a su vez, activa el NF-AT, un factor de transcripción específico de linfocitos que junto con un factor de transcripción complementario, AP-1, efectúa la expresión del factor de crecimiento de células T inducible, la interleucina 2 (IL-2). La activación de AP-1 es un proceso independiente del calcio que implica a la proteína quinasa C, y experimentalmente puede ser logrado con la adición de forbol de miristato acetato (PMA). El fármaco inmunodepresivo ciclosporina A (CsA) se une e inhibe la actividad de proil-isomerasa de la ciclofilina y el complejo farmacéutico de isomerasa resultante inactiva a la calcineurina, por una interacción directa cerca del sitio activo de la enzima. [Liu *et al.*, *Cell*, **66**:807-15 (1991)]; [Clipstone y Crabtree, *Nature*, **357**:695-7 (1992)]; [O'Keefe *et al.*, *Nature*, **357**:692-4 (1992)]. El NF-KB es un tercer factor de transcripción clave que es importante en la activación de linfocitos y que es activado después de la estimulación de células T o del receptor de antígeno de las células B.

30 Otra proteína asociada con la ruta de señalización del calcio en linfocitos es el recientemente identificado ligando de ciclofilina que modula la señal de calcio (CAML) [Bram, R. J. y Crabtree, G. R., "DNA Encoding Calcium-Signal Modulating Cyclophilin Ligand", Patente de EE.UU. N° 5.523.227, expedida el 4 de Junio de 1996. El CAML se une a la ciclofilina B con una especificidad razonable, es decir, el CAML no se une a la ciclofilina A o C. A diferencia del complejo ciclosporina-ciclofilina A, sin embargo, el complejo CAML-ciclofilina B no se une directamente a la calcineurina. Así el CAML parece afectar a la calcineurina por su regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se espera, CsA puede bloquear indirectamente el efecto de activación de CAML en la transcripción, inhibiendo a la calcineurina. Además, el CAML parece no tener ningún efecto sobre la activación de AP-1, y por eso la activación dependiente de CAML de NF-AT requiere experimentalmente la adición de PMA.

35 El CAML actúa corriente abajo de una señal extrínseca, pero corriente arriba de la calcineurina. La localización de CAML en las vesículas citoplásmicas sugiere que éste puede regular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  modulando la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Sin embargo, queda una necesidad de determinar el factor natural (o factores) que comunican la señal externa al CAML celular. Además, hay una necesidad de entender cómo el CAML interactúa con este factor para aprender a controlar mejor los procesos celulares importantes que el CAML ayuda a regular. Una clase diferente de molécula de señalización es la familia TNFR de receptores de la superficie celular [Smith *et al.*,

*Cell*, 76:959-62 (1994)]. Estos receptores inician las señales intracelulares que conducen al inicio del crecimiento celular, la muerte, o la ganancia de la función efectora.

El acceso nº P20333 a la base de datos EBI, 1 de noviembre de 1995, proporciona un precursor del receptor 2 de factor de necrosis tumoral.

- 5 Santee SM et al., *J. Biol. Chem.* vol. 271, no. 35, 30 de agosto de 1996, páginas 21151-21159, describe la estructura del gen (CD120b) del receptor p75/80 del factor de necrosis tumoral humano y la caracterización de su promotor.

El acceso nº 014836 a la base de datos EBI, 20 de marzo de 2007, proporciona el miembro 13B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (activador transmembrana y elemento interactuante con CAML) (antígeno CD267).

- 10 Xia X-Z et al., *J. Exp. Med.*, vol. 192, nº 1, 3 de julio de 2000, páginas 137-143, describe TACI, un receptor interactuante con TRAF para TALL-1, un miembro de la familia de factores de necrosis tumorales implicado en la regulación de las células B.

Marsters SA et al., *Current Biology*, vol. 10, nº 13, 29 de junio de 2000, páginas 785-788 describe la interacción de los homólogos BLYS y APRIL de TNF con los homólogos BCMA y TACI del receptor de TNF.

- 15 Wu Y. et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 275, No. 45, 10 Noviembre de 2000, págs 35478-35485, describe que el miembro TACI de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) es un receptor de alta afinidad para los miembros APRIL y BlyS de la familia TNF.

Yu G et al., *Nature Immunology*, vol. 1, nº 3, septiembre 2000, págs 252-256, describe APRIL y TALL-1 y receptores BCMA y TACI: un sistema para regular la inmunidad humoral.

- 20 Un nuevo receptor de linfocitos, su secuencia de ADN, y su papel en la ruta de activación del calcio son descritos. La proteína, o las construcciones que, genéticamente manipuladas, la codifican, puede ser usada para realizar la respuesta de linfocitos, o para identificar a los ligandos del receptor proteicos. El dominio extracelular, soluble, puede ser usado para inhibir la activación celular. Pueden ser generados anticuerpos contra la proteína para usos diagnósticos o terapéuticos. La proteína y el ADN también pueden ser usados con objetivos diagnósticos y para identificar a agentes que modulen la ruta de activación inducida por el calcio. El conocimiento de la secuencia codificante permite la manipulación de células para elucidar el mecanismo del que CAML es una parte.
- 25

Una ventaja particular de la presente invención consiste en que proporciona la activación de linfocitos de un receptor encontrado en todas las células B, pero sólo en un subconjunto de células T. El receptor puede ser así modificado para regular específicamente las respuestas de las células B sin afectar a la actividad de las células T maduras. Tal especificidad en el reconocimiento es siempre ventajosa, particularmente cuando es deseado un aumento o una disminución de la producción de anticuerpos independientemente de las respuestas inmunes celulares, por ejemplo, durante una infección (aumento) o para evitar las complicaciones de la deposición de complejos inmunes (artritis reumatoide, glomerulonefritis y otras condiciones autoinmunes).

- 30 La reticulación del nuevo receptor de superficie celular de la presente invención activa a las células B y a algunas poblaciones de células T. La activación de estas células aumenta la actividad del sistema inmunológico. Por otra parte, el bloqueo o la inhibición del nuevo receptor de superficie celular de la presente invención puede causar inmunodepresión. Dependiendo del nivel endógeno de la activación del receptor, que puede ser evaluado usando los anticuerpos o los ácidos nucleicos aquí descritos, la actividad del receptor puede ser realizada o suprimida para alcanzar un resultado deseado. La activación o la inhibición de la función del nuevo receptor de superficie celular de la presente invención puede ser usada para tratar los cánceres de células B y T.
- 35
- 40

La presente descripción incluye una proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML (TACI) aislada que funciona como una proteína de señalización de la superficie celular y comprende un dominio extracelular, un segmento que atraviesa la membrana y un dominio citoplásmico. En una realización, la proteína TACI es un receptor de la membrana celular en el cual el dominio extracelular reside en la parte del extremo N-terminal de la proteína y el dominio citoplásmico reside en la parte del extremo C-terminal de la proteína. La parte del extremo N-terminal de la proteína TACI funciona como un sitio de unión para un ligando que estimula la activación de la célula induciendo la unión de la parte del extremo C-terminal de la proteína TACI al dominio del extremo N-terminal de CAML. Dado que CAML es una proteína integral de membrana que se localiza en las vesículas citoplásmicas, la proteína TACI es un receptor de membrana celular que interactúa directamente con un orgánulo intracelular en los linfocitos.

- 45
- 50 En una realización, la forma monomérica de la proteína TACI aislada consiste en aproximadamente 295 aminoácidos. En una realización preferida, la forma monomérica de una proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML (TACI) contiene de 280 a 310 aminoácidos. En realizaciones más preferidas, la forma monomérica de una proteína TACI contiene de 290 a 296 aminoácidos. En una realización específica ejemplificada *infra*, la forma monomérica de una proteína TACI contiene 293 aminoácidos.

- 55 Una realización de la proteína TACI aislada contiene dos repeticiones ricas en cisteína de la superfamilia TNFR

[Bairoch, *Nucl. Acids. Res.*, **21**:3097-3103 (1993)]. En una realización preferida, una proteína TACI que, de manera apropiada, es estimulada, *in situ*, tal como por un ligando o un anticuerpo anti-TACI, inicia la activación de un factor de transcripción por la combinación de una ruta dependiente de  $Ca^{2+}$  y una ruta independiente de  $Ca^{2+}$ .

5 La presente descripción incluye un ácido nucleico aislado que consiste en al menos 18 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos que tiene una similitud de al menos el 60% con SEQ ID NO: 1, o de forma alternativa una similitud de al menos 60% con la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos codifica una proteína TACI que tiene una afinidad de unión con CAML. En una tal realización, el ácido nucleico aislado codifica una proteína TACI.

10 En una realización preferida de la presente descripción, la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de al menos el 75% con SEQ ID NO: 1, o tiene una similitud de al menos 75% con la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, la secuencia de nucleótidos tiene una similitud de al menos 90% con SEQ ID NO: 1, o tiene una similitud de al menos el 90% con la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1. En una realización incluso más preferida, la secuencia de nucleótidos tiene entre una similitud del 95-98% con SEQ ID NO: 1, o tiene una similitud entre el 95-98% con la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1. En una realización particular, la  
15 secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 1. En una realización relacionada, la secuencia de nucleótidos consiste en la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1. En una realización específica, ejemplificada *infra*, el ácido nucleico aislado tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En una realización relacionada, el ácido nucleico aislado consiste en la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1.

20 En otra realización relacionada, la presente descripción incluye un ácido nucleico aislado que contiene al menos 18 nucleótidos y se hibrida a SEQ ID NO: 1 o, más particularmente, se hibrida a la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1. En una tal realización, la hibridación es realizada bajo una severidad moderada. En otra realización, la hibridación es realizada en condiciones de hibridación estándar. En aún una tercera realización, la hibridación es realizada en condiciones de hibridación rigurosas.

25 En todavía otra realización relacionada, la presente descripción incluye un ácido nucleico aislado que contiene al menos 18 nucleótidos de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TACI que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o de SEQ ID NO: 2 con una o varias sustituciones conservadoras. En tales realizaciones de este tipo, el ácido nucleico aislado codifica un fragmento N-terminal de la proteína TACI correspondiente al dominio extracelular. En otra realización, el ácido nucleico aislado codifica un fragmento C-terminal de la proteína TACI que es suficiente para unirse al extremo N-terminal de 146 aminoácidos de CAML. En aún otra realización, el  
30 ácido nucleico aislado codifica la parte de transmembrana de la proteína TACI. En todavía otra realización, el ácido nucleico aislado codifica la proteína TACI de cadena entera.

35 En una realización preferida de la presente descripción, el ácido nucleico aislado consiste en al menos 24 nucleótidos. En una realización más preferida, el ácido nucleico aislado consiste en al menos 30 nucleótidos. En una realización incluso más preferida, el ácido nucleico aislado consiste en al menos 36 nucleótidos. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser usados como sondas de ácidos nucleicos, cebadores de la PCR, ácidos nucleicos antisentido, y similares, con objetivos diagnósticos y terapéuticos.

40 En una realización de la presente descripción, un ácido nucleico aislado codifica un fragmento C-terminal de la proteína TACI que es suficiente para unirse al extremo N-terminal de 146 aminoácidos de CAML. En una realización particular de este tipo, el fragmento C-terminal contiene aproximadamente 126 aminoácidos. En otra realización de este tipo, el fragmento C-terminal tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o de SEQ ID NO: 4, con una o varias sustituciones conservadoras.

En otra realización, el ácido nucleico aislado codifica un fragmento N-terminal de la proteína de unión de CAML correspondiente al dominio extracelular. En una realización particular de este tipo, el fragmento N-terminal tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o de SEQ ID NO: 6, con una o varias sustituciones conservadoras.

45 En una realización preferida, el ácido nucleico aislado codifica una proteína TACI que tiene una afinidad de unión con CAML. Cuando una proteína tal como TACI es estimulada de manera apropiada, *in situ*, se inicia la activación de un factor de transcripción por la combinación de una ruta dependiente de  $Ca^{2+}$  y una ruta independiente de  $Ca^{2+}$ . En una realización más preferida, el ácido nucleico aislado codifica una proteína TACI que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

50 La presente descripción también incluye un construcción de ADN que comprende un ácido nucleico aislado de la presente invención que es un ADN recombinante operativamente unido a una secuencia control de la expresión. La secuencia control de la expresión puede ser seleccionada a partir del grupo que consiste en los promotores tempranos o tardíos de SV40 o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el operador principal y las regiones del promotor del fago  $\phi$ , las regiones control de la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida y los promotores de los factores de acoplamiento  $\alpha$  de levadura.  
55

En una realización preferida, la secuencia control de la expresión es un promotor inducible de tet estándar, un promotor de metalotioneína, o un promotor de ecdisona. En una realización más preferida, la secuencia control de la

expresión es el promotor SR $\alpha$ .

La presente invención también incluye a un huésped unicelular transformado con una construcción de ADN recombinante de la presente invención. En una realización, el huésped unicelular es un procarionota. En otra realización, el huésped unicelular es un eucariota. Preferiblemente, el huésped eucariota es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula COS, CHO o T Jurkat, que podría ser útil para evaluar la actividad de la proteína TACI o identificar a los agentes moduladores.

La presente invención incluye polipéptidos aislados (como se definen en las reivindicaciones) codificados por los ácidos nucleicos de la presente invención, y sus proteínas de fusión. En una realización, el polipéptido comprende un fragmento soluble del fragmento N-terminal de la proteína TACI correspondiente al dominio extracelular regulador. En una realización particular, el fragmento N-terminal tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 6 con una o varias sustituciones conservadoras.

En una realización de la descripción, el fragmento de polipéptido consiste en un fragmento C-terminal de la proteína TACI que es suficiente para unirse al extremo N-terminal de 146 aminoácidos de CAML. En una tal realización, el fragmento C-terminal contiene de 95 a 130 aminoácidos. En una realización específica, el fragmento C-terminal contiene 126 aminoácidos del extremo C-terminal de SEQ ID NO: 2. En una realización alternativa, el fragmento C-terminal de la proteína TACI contiene aproximadamente 110 aminoácidos. En una realización preferida de este tipo, el fragmento C-terminal contiene 107 aminoácidos y tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

La presente invención también incluye la preparación de una forma recombinante del polipéptido de la invención, como se define en las reivindicaciones, creando así un reactivo negativo dominante o bloqueante. Este componente intercepta a los ligandos endógenos normales que sirven para reticular y activar a la proteína TACI. La administración de tal polipéptido actúa para deprimir el sistema inmunológico. Tal administración es útil en el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune o en el rechazo de injerto o la enfermedad de injerto-contra-huésped después del trasplante.

Una proteína TACI quimérica puede ser una proteína que sea generada uniendo el dominio extracelular de otra molécula receptor con un dominio transmembrana y el dominio intracelular de una proteína TACI. En otra realización, el dominio extracelular de una proteína TACI puede ser unido con un dominio transmembrana y un dominio intracelular de otra molécula receptor. El dominio transmembrana puede ser el dominio transmembrana de una proteína TACI, el dominio transmembrana del otro receptor, o un dominio transmembrana diferente. Preferiblemente, el dominio transmembrana es del mismo componente proteico de la quimera que el dominio extracelular.

En una realización preferida, el polipéptido es una proteína TACI codificada por un ácido nucleico de la presente descripción que tiene una afinidad de unión con CAML y, que cuando se estimula de manera apropiada, *in situ*, inicia la activación de un factor de transcripción por la combinación de una ruta dependiente de Ca<sup>2+</sup> y una ruta independiente de Ca<sup>2+</sup>.

La presente descripción también incluye ácidos nucleicos antisentido que se hibridan en condiciones fisiológicas a los mRNA que codifican las proteínas TACI de la presente invención. Tales ácidos nucleicos antisentido pueden ser transcritos por el ARN a partir de un gen antisentido, o ARN o ADN producido exógenamente (tanto por expresión como síntesis química). Preferiblemente, un ácido nucleico antisentido sintético se prepara con enlaces artificiales para prevenir su hidrólisis rápida y así aumentar su semivida eficaz.

También se describe aquí un animal genodeficiente. El animal genodeficiente comprende un primer y un segundo alelo que codifica naturalmente cada uno y expresa la proteína TACI funcional, pero en el que al menos uno de los dos alelos es defectuoso y se impide así al animal expresar una cantidad adecuada de la proteína TACI. En una realización de este tipo, el primer alelo contiene un defecto que impide al animal expresar cualquier proteína TACI funcional. En una realización preferida, un animal genodeficiente contiene tanto un primer alelo defectuoso como un segundo alelo defectuoso. Estos alelos defectuosos impiden al animal expresar la proteína TACI funcional. En una realización preferida, el animal genodeficiente es un ratón genodeficiente.

La presente descripción también incluye anticuerpos contra todos los ácidos nucleicos y los polipéptidos de la presente descripción. En una realización específica, el anticuerpo se prepara contra la proteína TACI que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o su fragmento antigénico. Los anticuerpos descritos aquí pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que es un anticuerpo quimérico.

Una línea celular inmortal que produce un anticuerpo monoclonal de la presente descripción es también parte de la presente descripción. En una realización específica de esta línea celular inmortal, el anticuerpo monoclonal se prepara contra la proteína TACI que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o su fragmento antigénico.

La presente descripción también incluye un fragmento N-terminal de CAML que es suficiente para unirse al fragmento de 126 aminoácidos del extremo C-terminal de TACI-1. En una tal realización, el fragmento N-terminal de CAML contiene 146 aminoácidos. Este fragmento N-terminal de CAML puede servir como un inhibidor de la unión de TACI-CAML.

La presente invención incluye métodos para preparar las proteínas TACI y proteínas quiméricas, como se definen en las reivindicaciones. El método comprende introducir un vector de expresión de la invención, que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, en una célula huésped y expresar el polipéptido codificado. En realizaciones alternativas de la descripción, el polipéptido expresado tiene una afinidad de unión con CAML; o el polipéptido, cuando se estimula de manera apropiada, *in situ*, inicia la activación de un factor de transcripción por la combinación de una ruta dependiente de  $Ca^{2+}$  y una ruta independiente de  $Ca^{2+}$ ; o el polipéptido expresado es una proteína TACI que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Los métodos para purificar los polipéptidos expresados que codifican las proteínas TACI, sus fragmentos y sus proteínas de fusión, también se describen aquí, al igual que los polipéptidos purificados expresados por sí mismos.

La presente descripción también incluye métodos para identificar un ligando para una proteína TACI. Una realización de tal método comprende poner en contacto el polipéptido extracelular del extremo N-terminal de una proteína TACI con una molécula candidato y detectar la unión del polipéptido extracelular del extremo N-terminal con la molécula candidato. La unión del polipéptido extracelular del extremo N-terminal con la molécula candidato indica que la molécula candidato es el ligando.

En un método alternativo para identificar un ligando para una proteína TACI, se usa una proteína TACI funcional. En las realizaciones preferidas de este tipo, la proteína TACI funcional es TACI-1. La unión de la proteína TACI funcional con la molécula candidato indica que la molécula candidato es un ligando. En una tal realización, la unión de la molécula candidato a la proteína TACI funcional es determinada detectando la activación celular como una función del nivel de activación de la ruta AP-1. En otra realización, la unión de la molécula candidato a la proteína TACI funcional es determinada detectando la activación celular como una función del nivel de activación de la ruta CAML.

En otra realización, la unión de la molécula candidato a la proteína TACI funcional es determinada detectando la activación celular como una función del nivel de la concentración del factor de transcripción de NF-AT. En todavía otra realización, la unión de la molécula candidato a la proteína TACI funcional es determinada detectando la activación celular como una función del nivel de activación de la ruta de NF-KB. En aún otra realización, la unión de la molécula candidato a la proteína TACI funcional es determinada detectando la activación celular como una función del nivel de la activación de NF-AT. En este caso, el nivel de activación de NF-AT puede ser determinado por métodos que incluyan demostrar el desplazamiento del citoplasma al núcleo de NF-AT; la desfosforilación relativa de NF-AT; y/o por transcripción dependiente de NF-AT.

En realizaciones preferidas, se hace más de una de las determinaciones anteriores de la activación celular, y la molécula candidato es identificada como un ligando cuando todas las determinaciones hechas indican la unión de la molécula candidato a la proteína TACI. En la realización más preferida, se hacen todas las determinaciones anteriores de activación celular y la molécula candidato es identificada como un ligando cuando todas estas determinaciones indican que la molécula candidato se une a la proteína TACI.

Los métodos para identificar un ligando para una proteína TACI pueden ser realizados en un gran número de sistemas de expresión en los que la proteína TACI puede ser expresada. Una realización emplea el uso de un sistema de expresión de dos híbridos de levadura que usa la proteína TACI como "cebo". En otra realización, puede ser empleada la interacción clonando genotecas de expresión de *E. coli*. En aún otra realización, puede ser utilizada la expresión funcional clonando en células de mamífero de la proteína TACI. En una realización preferida, las células de mamífero son líneas derivadas de células B, tales como el Linfoma de Burkitt, líneas celulares inmortalizadas de EBV o líneas celulares de mieloma múltiple. En una realización más preferida de este tipo, la proteína TACI se expresa en células T Jurkat que contienen un gen indicador en el control de un promotor de NF-AT. En una tal realización, el gen indicador codifica la fosfatasa alcalina (SEAP) secretada como marcador.

La presente descripción también incluye métodos de selección de un fármaco inmunodepresivo que inhiba la activación de células B en un mayor grado del que inhibe la activación de células T maduras. En las realizaciones preferidas de este tipo, el fármaco inmunodepresivo inhibe la activación de células B, pero no inhibe la activación de células T maduras. Tales métodos pueden ser realizados en células T transformadas, tal como en células T Jurkat, que pueden ser genéticamente manipuladas para expresar la proteína TACI; o en células B que expresen de forma natural la proteína TACI. La presente descripción también incluye los fármacos inmunosupresores identificados, que inhiben la activación de células B, pero no la activación de células T maduras.

La presente descripción incluye métodos para identificar a un fármaco inmunodepresivo que bloquee selectivamente la acción de los linfocitos B sin afectar a los linfocitos T maduros. Una tal realización comprende poner en contacto un primer linfocito con un fármaco potencial, en el que el primer linfocito contiene una proteína TACI y una primera proteína marcadora. La primera proteína marcadora es transcrita cuando la proteína TACI es estimulada en ausencia de un fármaco candidato. La proteína TACI es estimulada, y la primera proteína marcadora es detectada en condiciones en las cuales, si es transcrita, es detectable. Un fármaco potencial es seleccionado como un fármaco candidato cuando la primera proteína marcadora no puede ser detectada. Después, se pone en contacto un segundo linfocito con el fármaco candidato, en el que el segundo linfocito contiene un receptor de células T, y una segunda proteína marcadora que es transcrita cuando el receptor de células T es estimulado en ausencia o presencia del fármaco inmunodepresivo. El receptor de células T es estimulado y la segunda proteína marcadora es detectada en

condiciones en las cuales, si es transcrita, es detectable. Un fármaco candidato es identificado como un fármaco inmunodepresivo cuando la segunda proteína marcadora es detectada, ya que el fármaco inmunodepresivo interfiere con la ruta (o su aspecto) que implica a la proteína TACI, pero no la ruta (o su aspecto) que implica al receptor de células T.

5 En una realización, los primeros y segundos linfocitos son células T Jurkat que han sido modificadas para expresar una proteína TACI. En una tal realización particular, el método comprende poner en contacto una primera célula T Jurkat con un fármaco potencial, en el que la primera célula T Jurkat ha sido manipulada genéticamente para expresar una proteína TACI y un primer gen indicador. El primer gen indicador es controlado por un promotor de NF-AT, y codifica una primera proteína marcadora. La proteína TACI es activada, y la cantidad de expresión de la primera  
10 proteína marcadora es cuantificada. Un fármaco potencial es seleccionado como un fármaco candidato cuando la cantidad de la primera proteína marcadora expresada en presencia del fármaco candidato es disminuida en relación con la cantidad expresada en ausencia del fármaco candidato. Entonces, se pone en contacto el fármaco candidato con una segunda célula T Jurkat que contiene un receptor de células T y un segundo gen indicador. El segundo gen indicador es controlado por un promotor de NF-AT, y codifica una segunda proteína marcadora. El receptor de células T es activado y la cantidad de expresión de la segunda proteína marcadora es cuantificada y luego comparada con la cantidad de la segunda proteína marcadora expresada en ausencia del fármaco candidato. Un fármaco candidato es identificado como un fármaco inmunodepresivo si no hay ninguna disminución en la cantidad de expresión de la segunda proteína marcadora en presencia del fármaco candidato, o la disminución en la expresión de la segunda proteína marcadora es sustancialmente menor que la disminución correspondiente a la expresión de la primera proteína marcadora en presencia del fármaco candidato.

Cualquiera de las proteínas marcadoras descritas en este documento pueden ser usadas para este aspecto de la descripción incluyendo SEAP, LacZ o luciferasa. La primera y segunda proteína marcadora pueden ser la misma proteína o dos proteínas diferentes. La proteína TACI puede ser activada con un anticuerpo generado contra una proteína TACI, o sus fragmentos activos, o su proteína de fusión. En una realización preferida, la proteína TACI es TACI-1. Varios promotores pueden usarse para controlar el gen indicador incluyendo al promotor de NF-AT mencionado anteriormente y el promotor de AP-1. Pueden ser obtenidos fármacos potenciales a partir de cualquiera de las genotecas de fármaco actualmente disponibles, y a partir de sustancias químicas y genotecas de fagos descritas en este documento.

Los aspectos de la presente invención (que se definen en las reivindicaciones) serán mejor apreciados con relación a los dibujos siguientes y a la descripción detallada.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La distribución en tejidos, la secuencia de la proteína y otras propiedades características de TACI-1. La Figura 1 representa una transferencia Northern de los tejidos indicados sondados con el cADN de TACI-1. Otros tejidos sondados incluyen el corazón, el cerebro, la placenta, el pulmón, el hígado, el músculo esquelético, el riñón y el páncreas, ninguno de los cuales mostró ninguna expresión del mRNA de TACI-1.

La Figura 2a representa la secuencia de aminoácidos de TACI-1. Se muestra el dominio transmembrana propuesto en el cuadrado y los motivos Prosite TNFR\_NGFR están subrayados. La Figura 2b representa una gráfica de la hidrofobia de Kyte-Doolittle y el diagrama esquemático de TACI-1 mostrando las posiciones del supuesto dominio transmembrana (en negro) y los motivos TNFR\_NGFR (en puntos). La Figura 2c representa los restos de cisteína de la proteína TACI y otros miembros de la familia TNFR.

Figura 3. TACI-1 es una proteína de la superficie celular. La Figura 3a representa la citometría de flujo de células T Jurkat Tag transitoriamente transfectadas con un plásmido de expresión de TACI-1 y un marcador de transfección, pHook (Invitrogen), o el marcador de transfección pHook solo. La expresión de la superficie celular de TACI-1 y la proteína marcadora de la transfección, Ha-Hook, fueron detectadas por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo policlonal anti-TACI-1 purificado por inmovinoafinidad y el anticuerpo monoclonal 12CA5. Los datos representados representan la tinción de TACI-1 de células activadas para el marcador de transfección. La Figura 3b representa una fotomicrografía que muestra la tinción de la superficie de células Cos-7 que expresan transitoriamente TACI-1 marcado con FLAG del extremo N-terminal, teñido con anticuerpos M2 (anti-FLAG) y anticuerpos de IgG antiratón fluorescentes [Bram y Crabtree, *Nature*, **371**:355-358 (1994)]. La tinción de la superficie estaba presente tanto si las células estaban o no permeabilizadas con detergente.

Figura 4. TACI-1 es una proteína de señalización que funciona en la activación de la transcripción específica de NF-AT. La Figura 4a representa la activación de un indicador de fosfatasa alcalina secretado dirigido por NF-AT. Las células T Jurkat TAG, co-transfectadas con el indicador de SXNFAT [Bram *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **13**:4760-4769 (1993)] y el plásmido de expresión pBJ5 [Takebe, Y., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **8**:466-472 (1988)] que contiene o bien el cADN que codifica TACI-1 (triángulos negros) o nada (círculos), fueron tratadas con 50 ng/ml de PMA y las cantidades indicadas de ionomicina en presencia (símbolos cerrados) y ausencia (símbolos abiertos) de perlas magnéticas revestidas de anticuerpos policlonales anti-TACI-1 purificados por inmovinoafinidad. La Figura 4b representa la activación de NF-AT por TACI-1 reticulado con anticuerpo que es bloqueada con ciclosporina A (CsA) o FK506. La activación de NF-AT fue determinada en células T Jurkat TAG co-transfectadas con SXNFAT y pBJ5 (-TACI-1, izquierda) o

pBJ5-TACI-1 (+TACI-1, derecha), y fue tratada con las combinaciones indicadas de PMA (50 ng/ml), ionomicina (2  $\mu$ M), CsA (100 ng/ml) y FK506 (500 pg/ml) en presencia de perlas revestidas con el anticuerpo anti-TACI-1 ('NS', no estimulado). La Figura 4c muestra que la activación de NF-AT por TACI-1 reticulado con anticuerpo requiere de calcio extracelular. La activación de NF-AT fue medida en presencia de EGTA en células T Jurkat bajo la expresión de TACI-1. Los tratamientos incluyeron anti-TACI-1 reticulado (círculos), transfección con una subunidad de calcineurina A independiente de calcio, con un extremo C-terminal truncado (triángulos), o la activación con el anticuerpo estimulante de TCR OKT3 (cuadrados). Todas las células fueron co-estimuladas por la adición de PMA a 50 ng/ml. La Figura 4d representa la activación de un indicador de fosfatasa alcalina secretado dirigido por AP-1. La activación de AP-1 fue medida en células T Jurkat TAg, co-transfectadas con un indicador de AP-1-SEAP de metalotioneína de ratón [Bram *et al.*, 1991, *supra*] y pBJ5 que no contiene ningún inserto (-TACI-1, izquierda) o cDNA de TACI-1 (+TACI-1, derecha). Las células fueron incubadas en ausencia, y con cantidades crecientes en serie, de anticuerpos anti-TACI-1 reticulados. Para controlar la eficacia de la transfección, fue incluido un plásmido que contenía a un promotor constitutivo que dirigía la expresión de luciferasa (EF-Luc).

Figura 5. La interacción de TACI-1 con CAML es crítica para la señalización de  $Ca^{2+}$ . La Figura 5a muestra la interacción de 2 híbridos de levadura. Los cADNs de cadena entera y los mutantes de delección indicados de TACI-1 y CAML fueron clonados en los plásmidos de expresión de levadura pACT y/o pAS1, y las combinaciones indicadas fueron analizadas respecto a la interacción con el sistema de 2 híbridos de levadura ('+', interacción positiva; '-', ninguna interacción; 'ND', no hecho). La Figura 5b representa la co-inmunoprecipitación de CAML con TACI-1. Fueron transfectadas células 293T con las combinaciones indicadas del plásmido de expresión pBJ5 que contenía los cADN para CAML, TACI-1 con un marcador FLAG del extremo N-terminal, los 146 aminoácidos del extremo N-terminal de CAML (CLX91), o ningún inserto. Después de la incubación durante 48 horas, las células fueron lisadas (1% de dodecilmaltósido, HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol del 10%,  $MgSO_4$  2 mM,  $CaCl_2$  1 mM, PMSF 1 mM) y el lisado fue clarificado por centrifugación. TACI-1 marcado con FLAG y las proteínas asociadas fueron inmunoprecipitadas con perlas de agarosa conjugadas con anticuerpos monoclonales anti-FLAG y fueron sometidas a la transferencia Western usando protocolos estándar. La inmunotransferencia Western fue sondada con anticuerpos policlonales anti-CAML purificados por inmunofinidad seguido de la detección quimioluminiscente (Amersham). Inmunotransferencias paralelas, realizadas para cada muestra, confirmaron la expresión esperada de TACI-1, CAML o el mutante truncado de CAML en todas las transfecciones. La Figura 5c muestra que la sobre-expresión de la mitad del extremo N-terminal de CAML tiene un efecto negativo dominante sobre la activación de NF-AT inducida por TACI-1. La activación de NF-AT fue determinada en células Jurkat TAg transfectadas con pBJ5 solo, pBJ5-TACI-1 más el plásmido de control, o pBJ5-TACI-1 con una cantidad equivalente de CLX91, después del tratamiento con anticuerpos específicos a TACI-1 (arriba). La expresión de TACI-1 en estas transfecciones fue determinada por inmunotransferencia Western usando anticuerpos policlonales anti-TACI-1 (abajo). La Figura 5d representa un diagrama esquemático que muestra el modelo de transducción de señal TACI-1/CAML ('SOC', canal de calcio operado con depósitos).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. En su aspecto más amplio, la descripción se refiere a un nuevo receptor de la superficie celular que está normalmente presente en los linfocitos B, y en un grado mucho menor, en los linfocitos T inmaduros. El papel del receptor de la superficie celular, la proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML (TACI), es participar en rutas alternas o co-estimuladoras que activan o controlan la función de los linfocitos. Estas funciones pueden incluir la respuesta de los linfocitos frente a antígenos ajenos en la infección, o en el cáncer, en el rechazo de injertos, y en la reacción de injerto-contra-huésped. Además, la activación de la señalización de los linfocitos juega un papel clave durante el desarrollo de los linfocitos, permitiéndose así la selección positiva de los linfocitos funcionales y la selección negativa contra clones autoreactivos. Cuando se activa, la proteína TACI estimula la entrada de calcio en los linfocitos. Tal entrada de calcio, en circunstancias específicas, puede conducir al inicio de la muerte celular programada (apoptosis).

Las expresiones "proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML" o "TACI" o "proteína TACI" son usadas en este documento de manera intercambiable con "proteína transmembrana de unión a CAML" o "TCB" o "proteína TCB" y se refieren al material proteico, incluyendo proteínas simples o múltiples, que actúan como un nuevo receptor de la superficie celular que está normalmente presente en los linfocitos B. Este receptor de la superficie celular tiene el perfil de actividades expuestas en adelante en este documento. En consecuencia, las proteínas que muestran una actividad sustancialmente equivalente o alterada son contempladas de la misma manera. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas por mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas por mutaciones en huéspedes que son los productores de la proteína. Incluidas en la amplitud de estas expresiones están las proteínas específicamente citadas en este documento, así como todos los análogos sustancialmente homólogos y las variaciones alélicas.

En una realización, la proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML es TACI-1, el homólogo humano. Como se muestra en el Ejemplo, *infra*, TACI-1 inicia un mecanismo de transducción de la señal no detectado previamente que une directamente los estímulos de la superficie celular a la molécula de señalización intracelular, CAML. El TACI-1, por lo tanto, es un miembro de una nueva clase de receptores de la superficie celular específicos de linfocitos que modulan la respuesta inmune y así pueden ser usados como una herramienta para regular el sistema inmunológico en una dirección positiva o negativa. En una realización específica, el TACI-1 tiene la secuencia



de aminoácidos expuesta en adelante en SEQ ID NO: 2.

Como se usa en este documento, cuando un ácido nucleico particular se dice que codifica una proteína o un polipéptido de la presente invención, se entiende que está siendo identificada la parte del ácido nucleico particular que consiste en la secuencia de codificación para aquella proteína o polipéptido. Por ejemplo, la región de codificación de SEQ ID NO: 1 es del nucleótido 14 al nucleótido 895, incluyendo el codon de terminación de translación de nucleótido 3 en el extremo 3.

Para muchos objetivos, hay un interés sustancial en ser capaces de prevenir selectivamente la activación de linfocitos o como alternativa realzar selectivamente su activación. Por ejemplo, para las enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos, síndromes de rechazo de trasplantes y enfermedades de injerto contra huésped, la inhibición de la activación de los linfocitos implicados es un tratamiento viable o necesario para la enfermedad. Además, en el caso de mielomas, linfomas y leucemias, especialmente de células B o células T inmaduras, hay cierto interés en reducir la proliferación de las células cancerígenas, lo que puede dar lugar a terapias que no son tan destructivas para el huésped como las presentes terapias actuales. Por otra parte, para infecciones o respuestas inmunes anti-tumor, habría interés en ser capaces de activar los linfocitos para responder más rápidamente a los patógenos. Así, la presente descripción permite la selección de agentes útiles, por ejemplo, compuestos orgánicos sintéticos que pueden activar y/o desactivar los linfocitos proporcionando un componente clave antes desconocido en la ruta de activación de los linfocitos.

Además, según se entiende la ruta de activación más completamente, se es capaz de modular la ruta más eficazmente, tal como proporcionando agentes que son selectivos para un conjunto particular o subconjunto de una población celular. Dado que, en muchos casos, la activación requiere la co-estimulación, ser capaces de manipular a los agentes disponibles para la célula puede proporcionar tal actividad celular. En este contexto, la identificación de una proteína diana que pueda ser usada para desarrollar fármacos que modulen una ruta particular, tal como una ruta de activación mediada por CAML, permitiría a los médicos tratar particularmente distintas condiciones inmunes sin sobreestimar o sobredeprimir otros aspectos delicados del sistema inmunológico que, por otra parte, funcionen bien. Tal estimulación manipulada puede ser usada para amplificar específicamente los efectos de estimuladores inmunes, tal como IL-2, permitiendo así el uso de dosis inferiores del estimulador inmune y reduciendo así los efectos secundarios.

Además, la presente descripción es un avance importante en el entendimiento de la ruta de activación mediada por CAML, permitiendo la evaluación selectiva y el control en la presencia o ausencia de un intermedio particular en aquella ruta. Esto puede ser logrado con un animal transgénico usando una recombinación homóloga, la integración de genes que proporcionen secuencias antisentido, la introducción de construcciones de expresión que impliquen a promotores inducibles, y otros similares. Hay también un interés en ser capaces de determinar cuando un gen particular está siendo expresado o está silenciado, la naturaleza de las células en las cuales la proteína es expresada, y otros similares. Por lo tanto, hay un interés sustancial en identificar los componentes específicos de las rutas celulares para lograr el conocimiento de la ruta de activación, modula selectivamente aquella ruta, y desarrollar fármacos que puedan ser activos en la unión a la proteína diana. De este modo, pueden ser seleccionados fármacos para inhibir tales rutas específicas.

Un aspecto particular de la presente descripción incluye un rastreo de fármacos que usan TACI como una herramienta para desarrollar fármacos inmunodepresivos específicos para linfocitos B. Tales fármacos inmunodepresivos bloquearían selectivamente la acción de los linfocitos B, dejando a las células T intactas para proteger a los pacientes de patógenos virales. Estos fármacos serían útiles en el tratamiento de enfermedades tales como el lupus eritematoso sistémico, una enfermedad debida a una sobreactivación de la respuesta de linfocitos B, o el mieloma múltiple (por ejemplo, el mieloma de Bence-Jones).

La reticulación de la proteína TACI activa la entrada de calcio y potencialmente otros mensajeros secundarios. Su modo de acción puede ser mediado por CAML. A diferencia de las moléculas de señalización de la superficie celular conocidas, que son específicas para las células B o células T, tales como CD4, CD8, TCR y CD3, el nuevo receptor de la superficie celular de la presente invención interactúa físicamente con CAML. Además, no hay ninguna homología de secuencia entre el nuevo receptor de la superficie celular de la presente invención y cualquiera de estas moléculas de señalización de la superficie celular de linfocitos conocidas o cualesquiera otras moléculas de señalización de la superficie celular.

#### Proteínas TACI y polipéptidos

En una amplia realización, la presente invención proporciona las proteínas TACI que se describen en las reivindicaciones. Las proteínas TACI incluyen un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico. El dominio extracelular se une al ligando. Bajo la unión del ligando, el dominio citoplásmico se une a CAML, iniciándose así una ruta de activación dependiente de  $Ca^{2+}$ . La oligomerización del receptor, por ejemplo, uniéndose el ligando o con un anticuerpo anti-receptor, también inicia una ruta de activación no dependiente de  $Ca^{2+}$ .

La forma monomérica de una proteína TACI contiene aproximadamente 295 aminoácidos. Como se usa en este documento "aproximadamente 295 aminoácidos" significa entre 265 y 325 aminoácidos, es decir, aproximadamente

más o menos el 10%.

La invención además se refiere a los componentes polipeptídicos funcionalmente activos de TACI definidos en las reivindicaciones. Un componente funcionalmente activo de TACI puede ser un fragmento antigénico, por ejemplo, un péptido reactivo con anticuerpos anti-TACI, o que, cuando se conjuga a un vehículo, puede ser usado para generar anticuerpos anti-TACI. El otro fragmento funcionalmente activo incluye el dominio extracelular, que se une al ligando. El dominio extracelular corresponde al fragmento N-terminal de TACI, por ejemplo, a partir del primer resto de aminoácido de TACI maduro hasta el dominio transmembrana. En una realización específica, el dominio extracelular tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a aproximadamente del resto 1 a aproximadamente el resto 166 de SEQ ID NO:6. La región que se une al ligando de TACI es un subfragmento del fragmento N-terminal correspondiente al dominio extracelular.

Todavía otro fragmento funcionalmente activo es el dominio citoplásmico, por ejemplo, a partir del extremo C-terminal del dominio transmembrana al extremo C-terminal de TACI. El dominio citoplásmico de TACI media la transducción de la señal vía mecanismos dependientes de  $Ca^{2+}$  e independientes de  $Ca^{2+}$ .

El dominio citoplásmico incluye la región de unión de CAML de TACI. En particular, este dominio une un polipéptido correspondiente al extremo N-terminal de 146 restos de aminoácidos de CAML. En una realización específica, el dominio citoplásmico corresponde a aproximadamente el resto de aminoácido 187 a aproximadamente el resto de aminoácido 293 de SEQ ID NO: 2.

En aún otra realización, la presente descripción proporciona fragmentos proteolíticos de una proteína TACI. Tales fragmentos pueden prepararse por digestión enzimática, por ejemplo, con polipéptidos V8 de *S. aureus* en papaína, tripsina, quimotripsina, cathepsina, colagenasa, enteropeptidasa, trombina o enzimas fibrinolíticas o coagulantes; por división química, por ejemplo, con bromuro de cianógeno o borohidruro de sodio, etc.

En una realización específica de la descripción, la proteína TACI es una proteína receptor que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2, del resto 1 al resto 293. La presente descripción contempla las variantes alélicas de TACI, proteínas TACI homólogas de otras especies, y análogos de TACI, por ejemplo, preparados haciendo sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ingeniería genética o por síntesis química. Un análogo de TACI descrito aquí también incluye los fragmentos antigénicos de TACI que contienen, por ejemplo, un resto de cisteína terminal para facilitar la reticulación a una proteína vehículo.

No hay ninguna secuencia de ADN publicada que esté tan estrechamente relacionada con la de TACI-1. Una búsqueda de motivos Prosite en TACI-1 revela un modelo TNFR\_NGFR, que consiste en C-x(4,6)-[FYH]-x(5,10)-C-x(0,2)-C-x(2,3)-C-x(7,11)-C-x(4,6)-[DNEQSKP]-x(2)-C en la mitad del extremo N-terminal de la proteína (donde, por ejemplo, C-x(4,6)-[FYH] es indicativo de una secuencia de aminoácidos que comienza con cisteína seguido de 4, 5 ó 6 aminoácidos inespecíficos, seguido además de una fenilalanina, tirosina, o de una histidina). Este motivo es encontrado en un número de proteínas, la mayor parte de las cuales son receptores para factores de crecimiento. Algunas de estas proteínas tienen una copia de este motivo. Una comparación de la secuencia de la proteína TACI-1 con sí misma revela una repetición significativa entre el motivo TNFR\_NGFR en los restos 33-66 y los restos 70-104. Este análisis llamó la atención por la presencia de dos dominios ricos de cisteína tipo TNFR que abarcaban estas regiones indicando que TACI-1 es un miembro de la superfamilia de receptores TNFR.

*Polipéptidos de TACI sintéticos.* El término "polipéptido" se usa en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos subunidad, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos.

Las subunidades pueden ser unidas mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede ser unida mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Como se usa en este documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o a sintéticos, incluyendo glicina y tanto isómeros ópticos D como L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos comúnmente se denomina un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, se llama comúnmente al péptido polipéptido o proteína. De acuerdo con la invención, los fragmentos de TACI, tales como los fragmentos antigénicos, o potencialmente hasta el TACI de cadena entera, pueden prepararse sintéticamente.

Los polipéptidos sintéticos, preparados usando técnicas conocidas en fase sólida, fase líquida, o técnicas de condensación de péptidos, o cualquiera de sus combinaciones, pueden incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos usados para la síntesis de péptidos pueden ser la resina de aminoácido Boc estándar ( $N^t$ -butiloxycarbonilo  $N^t$ -amino protegido) con los protocolos de desprotección estándar, neutralización, acoplamiento y lavado del procedimiento en fase sólida original de Merrifield [*J. Am. Chem. Soc.*, **85**:2149-2154 (1963)], o los aminoácidos de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc)  $N^t$ -amino protegido de base-lábil primeramente descritos por Carpino y Han [*J. Org. Chem.*, **37**:3403-3409 (1972)]. Tanto los aminoácidos Fmoc como Boc  $N^t$ -amino protegidos pueden ser obtenidos a partir de Fluka, Bachem, Advanced Chemtech, Sigma, Cambridge Research Biochemical, Bachem o Peninsula Labs u otras empresas químicas familiares para los que practican esta técnica. Además, el método de la invención puede ser usado con otros grupos  $N^t$ -protectores que son familiares para los expertos en esta técnica. La síntesis de péptidos en fase sólida puede ser lograda por técnicas familiares para los expertos en la técnica y son proporcionados, por ejemplo, en Stewart y Young, 1984, "Solid Phase Synthesis", Segunda Edición, Pierce Chemical

Co., Rockford, Ill.; Fields y Noble, 1990, *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**:161-214, o utilizando sintetizadores automatizados, tales como los que se venden en ABS. Así, los polipéptidos de la invención pueden comprender D-aminoácidos, una combinación de D- y L-aminoácidos, y diversos aminoácidos de "diseño" (por ejemplo, aminoácidos de β-metilo, aminoácidos de Cα-metilo, y aminoácidos de Nα-metilo, etc.) para reportarles propiedades especiales. Los aminoácidos sintéticos incluyen la ornitina para lisina, fluorofenilalanina para la fenilalanina, y norleucina para la leucina o la isoleucina. Además, asignando los aminoácidos específicos en las etapas de acoplamiento específicas, pueden ser generados hélices α, giros β, láminas β, giros γ y péptidos cíclicos.

En una realización más, serán escogidas las subunidades de los péptidos que confieren propiedades químicas útiles y estructurales. Por ejemplo, los péptidos que comprenden D-aminoácidos serán resistentes a las proteasas específicas de los L-aminoácidos *in vivo*. Además, la presente descripción proporciona la preparación de los péptidos que tiene sus propiedades estructurales mejor definidas, y el uso de peptidomiméticos, y enlaces peptidomiméticos, tales como enlaces éster, para preparar péptidos con nuevas propiedades. En otra realización, un péptido puede ser generado incorporando un enlace peptídico reducido, es decir, R<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-R<sub>2</sub>, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son restos de aminoácidos o secuencias. Un enlace peptídico reducido puede ser introducido como una subunidad dipeptídica. Tal molécula sería resistente a la hidrólisis del enlace peptídico, por ejemplo, la actividad de proteasa. Tales péptidos proporcionarían ligandos con única función y actividad, tales como mayores semividas *in vivo* debido a la resistencia a la ruptura metabólica, o la actividad de proteasa. Además, es conocido que en ciertos sistemas, los péptidos constreñidos muestran una mayor actividad funcional [Hruby, *Life Sciences*, **31**:189-199 (1982)]; [Hruby *et al.*, *Biochem J.*, **268**:249-262 (1990)]; la presente descripción proporciona un método para producir un péptido constreñido que incorpore secuencias arbitrarias en todas las otras posiciones.

*Aminoácidos no clásicos que inducen a constricciones conformacionales.* Los siguientes aminoácidos no clásicos pueden ser incorporados en el péptido para introducir motivos conformacionales particulares: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato [Kazmierski *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**:2275-2283 (1991)]; (2S,3S)-metil-fenilalanina, (2S,3R)-metil-fenilalanina, (2R,3S)-metil-fenilalanina y (2R,3R)-metil-fenilalanina [Kazmierski y Hruby, *Tetrahedron Lett.*, (1991)]; ácido 2-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico [Landis, tesis doctoral, Universidad de Arizona, (1989)]; hidroxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato [Miyake *et al.*, *J. Takeda Res. Lab.*, **43**:53-76 (1989)]; β-carbolina (D y L) [Kazmierski, tesis doctoral, Universidad de Arizona, (1988)]; HIC (ácido isoquinolincarboxílico de histidina) [Zechel *et al.*, *Int. J. Pep. Protein Res.*, **43** (1991)]; y HIC (urea cíclica de histidina) (Dharanipragada).

Los siguientes análogos de aminoácidos y peptidomiméticos pueden ser incorporados en un péptido para inducir o favorecer estructuras secundarias específicas: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidon-6-carboxílico), un análogo dipeptídico que induce β-giro [Kemp *et al.*, *J. Org. Chem.*, **50**:5834-5838 (1985)]; análogos que inducen β-lámina [Kemp *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **29**:5081-5082 (1988)]; análogos que inducen β-giro [Kemp *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **29**:5057-5060 (1988)]; análogos que inducen α-hélice [Kemp *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **29**:4935-4938 (1988)]; análogos que inducen γ-giro [Kemp *et al.*, *J. Org. Chem.*, **54**:109:115 (1989)]; y los análogos proporcionados por las referencias siguientes: Nagai y Sato, *Tetrahedron Lett.*, **26**:647-650 (1985); DiMaio *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, pág. 1687 (1989); también un análogo del giro Gly-Ala [Kahn *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **30**:2317 (1989)]; isostero de enlace amida [Jones *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **29**:3853-3856 (1988)]; tretrazol [Zabrocki *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**:5875-5880 (1988)]; DTC [Samanen *et al.*, *Int. J. Pep. Protein Res.*, **35**:501:509 (1990)]; y los análogos mostrados en Olson *et al.*, *J. Am. Chem. Sci.*, **112**:323-333 (1990) y Garvey *et al.*, *J. Org. Chem.*, **56**:436 (1990). Los miméticos conformacionales restringidos de los giros beta y bucles beta, y los péptidos que los contienen, son descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.440.013, expedida el 8 de Agosto de 1995 a Kahn.

*Derivados de proteína.* Hay dos clases principales de enlaces péptido-carbohidrato a proteínas. Primero, los enlaces éter unen el hidroxilo de serina o treonina al hidroxilo del azúcar. Segundo, los enlaces amida unen los grupos carboxilo de aspartato o glutamato a un grupo amino en el azúcar. Los enlaces acetal y cetel también puede unir el carbohidrato al péptido.

Generalmente, la proteína TACI, o sus fragmentos, tal como el fragmento N-terminal del dominio extracelular o el fragmento C-terminal del dominio de unión a CAML citoplásmico, puede ser derivatizada por la unión de uno o varios restos químicos al resto de la proteína. La modificación química del componente biológicamente activo o de los componentes puede proporcionar ventajas adicionales en ciertas circunstancias, tales como el aumento de la estabilidad y del tiempo de circulación del componente o componentes y la disminución de la inmunogenicidad. Véase la Patente de EE.UU. N° 4.179.337, Davis *et al.*, expedida el 18 de Diciembre de 1979. Para una revisión, véase Abuchowski *et al.*, en "Enzymes as Drugs" [J. S. Holcberg y J. Roberts, ed. págs. 367-383 (1981)]. Un artículo de revisión que describe la modificación de proteínas y las proteínas de fusión es el de Francis, "Focus on Growth Factors", **3**:4-10 (1992), Mediscript: Mountview Court, Friern Barnet Lane, Londres N20, OLD, Reino Unido.

Los restos químicos adecuados para la derivatización pueden ser seleccionados entre polímeros insolubles en agua y solubles en agua, siendo los polímeros solubles en agua lo preferidos. El polímero seleccionado preferiblemente debe ser soluble en agua de modo que el componente al que se una no precipite en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. Preferiblemente, para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado basado en tales consideraciones como si el conjugado polímero/componente fuera usado terapéuticamente, y si es así, la

dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones.

Para el componente presente o los componentes, estos pueden ser diluidados usando los ensayos proporcionados en este documento.

5 *Proteínas TACI marcadas.* La proteína TACI de la presente invención, y sus fragmentos, pueden marcarse. Los marcadores adecuados incluyen enzimas, fluoróforos (por ejemplo, el isotiocianato de fluorescencia (FITC), ficoeritrina (PE), rojo de Texas (TR), rodamina, sales de la serie de lantánido libres o queladas, especialmente  $\text{Eu}^{3+}$ , por nombrar algunos fluoróforos), cromóforos, radioisótopos, agentes quelantes, tintes, oro coloidal, partículas de látex, ligandos (por ejemplo, la biotina), y agentes quimioluminiscentes. Cuando se emplea un marcador de control, pueden ser usados marcadores iguales o diferentes para la muestra de ensayo y el marcador de control.

10 En el caso en el que se use un marcador radiactivo, tales como los isótopos  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y  $^{186}\text{Re}$ , pueden ser utilizados conocidos procedimientos de recuento actualmente disponibles. En el caso en el que el marcador sea una enzima, la detección puede ser realizada por cualquiera de las técnicas calorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas en este momento utilizadas conocidas en la técnica.

15 Los marcadores directos son un ejemplo de marcadores que pueden ser usados de acuerdo con la presente descripción. Un marcador directo se define como una entidad, que en su estado natural, es fácilmente visible, a primera vista, o con la ayuda de una estimulación óptica con filtro y/o aplicada, por ejemplo, luz U.V. para generar fluorescencia. Entre los ejemplos de marcadores coloreados, que pueden ser usados de acuerdo con la presente invención, se incluyen partículas sol metálicas, por ejemplo, partículas sol de oro como las descritas por Leuering (Patente de EE.UU. N° 4.313.734); partículas de tintes exclusivos como los descritos por Gribnau *et al.* (Patente de EE.UU. N° 4.373.932) y May *et al.* (documento WO 88/08534); látex teñido como el descrito por May, *supra*, Snyder (documentos EP-A 0 280 559 y 0 281 327); o tintes encapsulados en liposomas como los descritos por Campbell *et al.* (Patente de EE.UU. N° 4.703.017). Otros marcadores directos incluyen un radio-nucleótido, un resto fluorescente o un resto luminiscente. Además de estos dispositivos marcadores directos, también pueden ser usados marcadores indirectos que comprenden enzimas de acuerdo con la presente invención. Varios tipos de inmunoensayos unidos a enzimas son conocidos en la técnica, por ejemplo, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante, lisozima, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, ureasa, éstos y otros han sido documentados detalladamente por Eva Engvall en "Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT" en *Methods in Enzymology*, **70**:419-439 (1980) y en la Patente de EE.UU. N° 4.857.453.

30 Las enzimas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante.

Otros marcadores para uso en la invención incluyen perlas magnéticas o marcadores de imagen de resonancia magnética.

35 En otra realización, puede ser creado un sitio de fosforilación en un anticuerpo de la invención para marcar con  $^{32}\text{P}$ , por ejemplo, como se describe en la Patente Europea N° 0372707 (N° de solicitud 89311108.8) de Pestka, o la Patente de EE.UU. N° 5.459.240, expedida el 17 de Octubre de 1995 a Foxwell *et al.*

40 Como se ejemplifica en este documento, se pueden marcar proteínas, incluyendo anticuerpos, mediante marcaje metabólico. El marcaje metabólico ocurre durante la incubación *in vitro* de las células que expresan la proteína en presencia de un medio de cultivo suplementado con un marcador metabólico, tal como [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina o [ $^{32}\text{P}$ ]-ortofosfato. Además del marcaje metabólico (o biosintético) con [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina, la invención además contempla el marcaje con [ $^{14}\text{C}$ ]-aminoácidos y [ $^3\text{H}$ ]- aminoácidos (con tritio sustituido en posiciones no lábiles).

#### Proteínas TACI quiméricas

45 Una proteína TACI quimérica de la invención es como se define en las reivindicaciones. Una proteína TACI quimérica puede ser una proteína que sea generada uniendo un dominio funcional de una proteína TACI, tal como el dominio de unión de ligando o el dominio de unión de CAML, con el dominio complementario de otra proteína, por ejemplo, un receptor alternativo. Las construcciones quiméricas también pueden prepararse con un fragmento funcionalmente activo de una proteína TACI y otra molécula funcionalmente activa. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína TACI puede ser unido al dominio Fc de una inmunoglobulina. De forma alternativa, el dominio citoplásmico de una proteína TACI podría ser unido a un ligando de receptor, tal como la transferrina o una hormona, para el reconocimiento intracelular. En aún otra realización, un dominio TACI podría ser unido a otra molécula de reconocimiento, tal como una cadena pesada de anti-inmunoglobulina o molécula de cadena ligera (por ejemplo, una parte del Fv de un anticuerpo) a células B de reconocimiento específicamente. En todavía otra realización, el fragmento funcionalmente activo de una proteína TACI, preferiblemente el dominio extracelular del extremo N-terminal, puede ser unido con un glicosilfosfolípido, tal como glicosilfosfoinositol, secuencia de señal ancla, preferiblemente localizada en el extremo C-terminal del fragmento de TACI, de modo que sea generada una proteína anclada glucolípida [Cross, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**:1-39 (1990); Low, *Biochem. J.*, **244**:1-13 (1987)].

55 Un receptor de TACI quimérico puede prepararse uniendo el dominio extracelular de otra molécula receptor con un dominio transmembrana y el dominio intracelular de una proteína TACI. En otra realización, el dominio extracelular

de TACI puede ser unido con un dominio transmembrana y un dominio intracelular de otra molécula receptor. El dominio transmembrana puede ser el dominio transmembrana de una proteína TACI, el dominio transmembrana de otro receptor, o un dominio transmembrana diferente. Preferiblemente, el dominio transmembrana es del mismo componente proteico de la quimera que el dominio extracelular. Se han descrito receptores quiméricos [publicaciones de Patente Internacional WO96/23814; WO96/23881 y WO96/24671]. Se han descrito receptores de antígeno quiméricos [Capon *et al.*, Patente de EE.UU. N° 5.359.046, expedida el 25 de Octubre de 1994], incluyendo los receptores específicos de antígeno funcionales generados en células B [Sanchez *et al.*, *J. Exp. Med.*, **178**:1049-1055 (1993)] y células T [Burkhardt *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **14**:1095-1103 (1994)] fusionando las cadenas de transducción de señal de Ig $\alpha$  y Ig $\beta$  a IgM. Varios receptores de citoquina tipo I y tipo II, incluyendo interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina-6, interleuquina-8, interleuquina-10, interleuquina-12, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (CSF), granulocito-CSF, macrófago-CSF, receptores de  $\alpha$ -quimiocina y receptores de  $\beta$ -quimiocina, pueden proporcionar componentes complementarios en un receptor quimérico que comprenda un fragmento funcionalmente activo de una proteína TACI.

Como los expertos ordinarios en la técnica pueden apreciar, los dominios transmembrana son generalmente funcionalmente equivalentes para anclar una proteína en una membrana. Sin embargo, la presencia de restos aminoácidos específicos en un dominio transmembrana puede afectar a la interacción del receptor con, por ejemplo, la dimerización o la asociación con otras proteínas integrales de la membrana, tal como en un complejo receptor multiproteína. Así, la selección de un dominio transmembrana depende de si las funciones reguladoras realizadas por el dominio transmembrana son deseadas o necesarias.

#### Ácidos nucleicos que codifican proteínas TACI

La presente descripción abarca el aislamiento de un gen que codifica una proteína TACI incluyendo una forma de longitud completa o natural de proteína TACI, y cualesquiera de sus fragmentos antigénicos a partir de cualquier fuente animal, particularmente mamíferos y, más particularmente, seres humanos. Como se usa en este documento, el término "gen" se refiere a un ensamblaje de nucleótidos que codifican un polipéptido, e incluye ácidos nucleicos de cADN y ADN genómico.

Conforme a la presente descripción pueden emplearse técnicas de biología molecular convencional, microbiología y ADN recombinante según la experiencia en la técnica. Tales técnicas son explicadas totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en este documento "Sambrook *et al.*, 1989"); "DNA Cloning: A Practical Approach", Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B. D. Hames y S. J. Higgins, ed. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984); F. M. Ausubel *et al.* (editores.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Por lo tanto, si aparecen en este documento, los siguientes términos o expresiones tendrán las definiciones dispuestas más abajo.

Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede ser unido otro segmento de ADN para causar la replicación del segmento unido. Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, un plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, capaz de la replicación bajo su propio control.

Un "casete" se refiere a un segmento de ADN que puede ser insertado en un vector en sitios de restricción específicos. El segmento de ADN codifica un polipéptido de interés, y el casete y los sitios de restricción son diseñados para asegurar la inserción del casete en el marco de lectura apropiado para la transcripción y la translación.

Una célula ha sido "transfectada" por ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN ha sido introducido dentro de la célula. Una célula ha sido "transformada" por ADN exógeno o heterólogo cuando el ADN transfectado efectúa un cambio fenotípico. Preferiblemente, el ADN transformante debe ser integrado (covalentemente unido) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula.

El ADN "heterólogo" se refiere al ADN no naturalmente localizado en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. Preferiblemente, el ADN heterólogo incluye un gen ajeno a la célula.

Una "molécula de ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxi-ribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquiera de sus análogos de fosfoéster, tales como fosforioatos y tioésteres, en forma monocatenaria, o en una hélice bicatenaria. Son posibles hélices de ADN-ADN bicatenario, ADN-ARN y ARN-ARN. La expresión "molécula de ácido nucleico" y, en particular, molécula de ADN o ARN, se refiere sólo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no limita de ninguna forma particular la terciaria. Así, este término incluye el ADN bicatenario encontrado, entre otras cosas, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. En la discusión de la estructura de

moléculas de ADN bicatenarias particulares, pueden ser descritas secuencias en este documento de acuerdo con la convención normal de dar sólo la secuencia en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN no transcrita (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al mRNA). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular.

5 Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" a otra molécula de ácido nucleico, tal como un cADN, ADN genómico o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede templar a la otra molécula de ácido nucleico en condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en solución (véase Sambrook *et al.*, *supra*). Las condiciones de temperaturas y fuerza iónica determinan la "severidad" de la hibridación. Para el rastreo preliminar de ácidos nucleicos homólogos, pueden ser usadas condiciones de hibridación de severidad baja, correspondientes a una  $T_m$  de 55°C, por ejemplo, 5 x SSC, 0,1% de SDS, 0,25% de leche, y ninguna formamida; o 30% de formamida, 5 x SSC, 0,5% SDS. Las condiciones de hibridación de severidad moderada corresponden a una  $T_m$  más alta, por ejemplo, formamida del 40%, con 5 x o 6 x SCC. Las condiciones de hibridación de severidad alta corresponden a una  $T_m$  más alta, por ejemplo, formamida del 50%, 5 x o 6 x SCC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan las secuencias complementarias aunque, dependiendo de la severidad de la hibridación, sean posibles desajustes entre bases. La severidad apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementariedad, variables conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de semejanza u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de la  $T_m$  para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen aquellas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a la  $T_m$  más alta) de hibridaciones de ácidos nucleicas disminuye en el orden siguiente: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, han sido derivadas ecuaciones para calcular la  $T_m$  (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50-0.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleotidos, la posición de desajustes se vuelve más importante y la longitud del oligonucleotido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 11.7-11.8). Una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es de al menos 10 nucleótidos; preferiblemente al menos 18 nucleótidos; más preferiblemente la longitud es de al menos 24 nucleótidos y lo más preferiblemente al menos 30 nucleótidos de longitud. En una realización específica, un ácido nucleico hibridable tiene una secuencia correspondiente a al menos 12 nucleótidos, preferiblemente al menos 18 nucleótidos, más preferiblemente al menos 24 nucleótidos, y lo más preferiblemente al menos 30 nucleótidos de longitud de SEQ ID NO: 1, o más específicamente la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 1.

En una realización específica, la expresión "condiciones de hibridación estándar" se refiere a una  $T_m$  de 55°C, y se utilizan las condiciones que se exponen anteriormente. En una realización preferida, la  $T_m$  es 60°C; en una realización más preferida, la  $T_m$  es 65°C.

Como se usa en este documento, el término "oligonucleotido" se refiere a un ácido nucleico, generalmente de al menos 18 nucleótidos, que es hibridable a una molécula de ADN genómica, una molécula cADN, o una molécula de mRNA que codifica una proteína TACI. Se pueden marcar los oligonucleotidos, por ejemplo, con  $^{32}\text{P}$ -nucleótidos o nucleótidos a los que un marcador, tal como la biotina, ha sido covalentemente conjugado (véase la discusión, *supra*, en lo que concierne al marcaje de polipéptidos TACI). En una realización, puede ser usado un oligonucleotido marcado como una sonda para detectar la presencia de un ácido nucleico que codifica una proteína TACI. En otra realización, pueden ser usados oligonucleotidos (uno o ambos de los cuales pueden ser marcados) como cebadores de la PCR, para clonar la longitud completa o un fragmento de una proteína TACI, o detectar la presencia de ácidos nucleicos que codifican una proteína TACI. En una realización más, un oligonucleotido puede formar una triple hélice con una molécula de ADN de TACI. Generalmente, los oligonucleotidos se preparan sintéticamente, preferiblemente con un sintetizador de ácidos nucleicos. En consecuencia, pueden prepararse oligonucleotidos con enlaces de análogos de fosfoester artificiales, tales como enlaces tioester, etc.

La "recombinación homóloga" se refiere a la inserción de una secuencia de ADN ajena de un vector en un cromosoma. Preferiblemente, el vector reconoce un sitio cromosómico específico para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga específica, el vector contendrá regiones suficientemente largas de homología respecto a las secuencias del cromosoma para permitir la unión complementaria y la incorporación del vector en el cromosoma. Las regiones de homología más largas, y los mayores grados de semejanza de la secuencia, pueden aumentar la eficacia de la recombinación homóloga.

Una "secuencia que codifica" el ADN es una secuencia de ADN bicatenaria que es transcrita y traducida en un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación son determinados por un codon de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codon de terminación de translación en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia de codificación puede incluir, pero no está limitada con, secuencias procariotas, cADN de mRNA eucariota, secuencias de ADN genómicas de ADN eucariota (por ejemplo, mamífero), y hasta secuencias de ADN sintéticas. Si la secuencia de codificación es requerida para la expresión en una célula eucariota, una secuencia señal de poliadenilación y de terminación de la transcripción por lo general será localizada en 3' respecto a la secuencia de codificación. En una realización específica, una secuencia que codifica para TACI de la invención tiene la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO: 1.

Las secuencias control transcripcional y translacional son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia de codificación en una

célula huésped. En las células eucariotas, las señales de poliadenilación son secuencias control.

Una "secuencia del promotor" es una región reguladora del ADN capaz de unir la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de un secuencia codificante corriente abajo (dirección 3'). Con el objetivo de definir la presente descripción, la secuencia del promotor es unida en su extremo 3' por el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende corriente arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en niveles detectable por encima de la línea de fondo. Dentro de la secuencia del promotor será encontrado un sitio de iniciación de la transcripción (convenientemente definido por ejemplo, mapeando con la nucleasa S1), así como dominios de unión de la proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

Una secuencia de codificación está "bajo el control" de las secuencias control transcripcionales y translacionales en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia de codificación en mRNA, que es entonces empalmado con trans-ARN y traducido en la proteína codificada por la secuencia de codificación.

Una "secuencia señal" puede ser incluida al principio de la secuencia de codificación de una proteína que se exprese en la superficie de una célula. Esta secuencia codifica un péptido de señal, del extremo N-terminal al polipéptido maduro, que dirige la célula huésped para trasladar el polipéptido. La expresión "secuencia señal de translocación" se usa en este documento para referirse a este tipo de secuencia señal.

Las secuencias señal de translocación pueden ser encontradas asociadas a una variedad de proteínas natural a eucariotas y procariotas, y son a menudo funcionales en ambos tipos de organismos. De modo interesante, la TACI de la invención es transportada de modo que el extremo N-terminal sea extracelular en ausencia de una secuencia señal dividida. Así, esta proteína transmembrana es una proteína transmembrana tipo III [véase Wilson-Rawls *et al.*, *Virology*, **201**:66-76 (1994)]. Por lo tanto, en una construcción descrita aquí (incluyendo una construcción química como se ha discutido anteriormente), si la parte del extremo N-terminal de la construcción codifica el extremo N-terminal de TACI, puede no requerirse un péptido señal para obtener la expresión de la proteína transmembrana TACI.

Como se usa en este documento, la expresión "homología de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere a la relación entre las proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo las proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia inmunoglobulina) y proteínas homólogas de especies diferentes (por ejemplo, miostatina de cadena ligera, etc.) [Reeck *et al.*, *Cell*, **50**:667 (1987)]. La presente descripción contempla naturalmente los homólogos de la proteína TACI humana que entran en la amplitud de la descripción.

En consecuencia, la expresión "semejanza de la secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos tanto si comparten, como si no, un origen evolutivo común (véase Reeck *et al.*, *supra*). En el uso común, el término "homólogo", cuando está modificado con un adverbio como "altamente", puede referirse a la semejanza de secuencia y no a un origen evolutivo común.

En una realización específica, dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente 50% (preferiblemente al menos aproximadamente 75%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90 ó 95%) de los nucleótidos se complementan en la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden ser identificadas comparando las secuencias usando el software estándar disponible en los bancos de datos de la secuencia, o en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas como se define para aquel sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento de la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, *supra*; "DNA Cloning", Vols. I y II, *supra*; "Nucleic Acid Hybridization", *supra*. La presente descripción contempla nucleótidos que son 50% similares a SEQ ID NO:1 (o su secuencia complementaria), preferiblemente 60% similares, y más preferiblemente 75% similares. Preferiblemente tales ácidos nucleicos sustancialmente similares son homólogos.

Asimismo, en una realización particular, dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 30% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 60% son similares (funcionalmente idénticos). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas son identificadas por alineación usando, por ejemplo, el programa de choques en cadena GCG (Genetics Computer Group, manual del programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wis.).

La expresión "correspondiente a" se usa en este documento para referirse a secuencias similares o homólogas, si la posición exacta es idéntica o diferente de la molécula en la cual la semejanza o la homología son medidas. Así, la expresión "correspondiente a" se refiere a la semejanza de la secuencia, y no a la enumeración de los restos aminoácidos o bases de nucleótidos.

Un gen que codifica una proteína TACI, tanto ADN genómico como cADN, puede ser aislado a partir de cualquier fuente, particularmente a partir de una genoteca de cADN humano o genómica. Los métodos para obtener un gen de la proteína TACI son conocidos en la técnica, como se describe anteriormente (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

En consecuencia, cualquier célula animal puede servir potencialmente como fuente de ácidos nucleicos para la clonación molecular del gen de la proteína TACI. El ADN puede ser obtenido según procedimientos estándar conocidos en la técnica a partir del ADN clonado (por ejemplo, una "genoteca" de ADN), y preferiblemente es obtenido a partir de una genoteca de cADN preparada a partir de tejidos con un nivel alto de expresión de la proteína (por ejemplo, una genoteca de cADN tímico, dado que las células de la sangre periférica y, en particular, los linfocitos, parecen tener los niveles más altos de expresión de la proteína TACI), por síntesis química, por clonación de cADN, o por la clonación de ADN genómico, o sus fragmentos, purificados a partir de la célula deseada (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Glover, D. M. (ed.), 1985, "DNA Cloning: A Practical Approach", MRL Press, Ltd., Oxford, Reino Unido. Vol. I, II). Los clones derivados a partir del ADN genómico pueden contener regiones reguladoras y de ADN de intrón además de regiones codificantes; los clones derivados de cADN no contendrán las secuencias de intrón. Independientemente de la fuente, un gen debe ser clonado molecularmente en un vector adecuado para la propagación del gen.

En la clonación molecular del gen a partir del ADN genómico, son generados fragmentos de ADN, algunos de los cuales codificarán el gen deseado. El ADN puede ser dividido en sitios específicos usando diversas enzimas de restricción. De forma alternativa, se puede usar ADNsa en presencia de manganeso para fragmentar el ADN, o el ADN puede ser físicamente cortado, como por ejemplo, por sonicación. Los fragmentos de ADN lineal pueden ser separados entonces de acuerdo con su tamaño mediante técnicas estándar, incluyendo, pero no limitadas a, electroforesis con agarosa y gel de poliacrilamida y cromatografía de columna.

Una vez que son generados los fragmentos de ADN, la identificación del fragmento de ADN específico que contiene el gen de la proteína TACI deseado puede ser lograda a partir de un número de formar. Por ejemplo, una parte del gen de la proteína TACI o su ARN específico, o sus fragmentos, puede ser purificado y marcado, los fragmentos de ADN generados pueden ser seleccionados entonces por la hibridación del ácido nucleico a la sonda marcada [Benton y Davis, *Science*, **196**:180 (1977)]; [Grunstein y Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**:3961 (1975)]. Por ejemplo, puede prepararse un grupo de oligonucleótidos correspondiente a la información de la secuencia de aminoácidos parcial obtenida para la proteína TACI y usarse como sondas para el ADN que codifica a una proteína TACI, o como cebadores para cADN o mRNA (por ejemplo, en combinación con un cebador poly-T para la RT-PCR). Preferiblemente, se selecciona un fragmento que sea altamente único respecto a la proteína TACI de la invención. Aquellos fragmentos de ADN con una homología sustancial con la sonda hibridarán. Como se dice anteriormente, a mayor grado de homología, pueden usarse condiciones de hibridación más rigurosas. En una realización específica, son usadas condiciones de hibridación de severidad para identificar un gen homólogo de la proteína TACI.

Una posterior selección puede ser llevada a cabo sobre la base de las propiedades del gen, por ejemplo, si el gen codifica un producto proteico que tiene la composición de aminoácidos isoelectrónica y electroforética, o la secuencia de aminoácidos parcial de la proteína TACI como se describe en este documento. Así, la presencia del gen puede ser detectada mediante ensayos basados en las propiedades físicas, químicas o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, pueden ser seleccionados clones de cADN o clones de ADN que hibriden los mRNA apropiados escogidos, que produzcan una proteína que, por ejemplo, tenga una migración electroforética similar o idéntica, por enfoque isoelectrónico o un comportamiento en la electroforesis de gel con no equilibrio del pH, mapas de digestión proteolítica o propiedades antigénicas como se conocen para la proteína TACI.

Un gen de la proteína TACI también puede ser identificado por la selección del mRNA, es decir, por la hibridación del ácido nucleico seguido de la translación *in vitro*. En este procedimiento, son usados fragmentos de nucleótidos para aislar los mRNA complementarios por hibridación. Tales fragmentos de ADN pueden representar el ADN de la proteína TACI disponible y purificado, o pueden ser oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de la información de la secuencia de aminoácidos parcial. El análisis por inmunoprecipitación o los ensayos funcionales (por ejemplo, la actividad de unión de CAML) de los productos de translación *in vitro* de los productos de los mRNA aislados identifican al mRNA y, por lo tanto, a los fragmentos de los ADN complementarios, que contienen las secuencias deseadas. Además, pueden ser seleccionados mRNA específicos por adsorción de polisomas aislados a partir de células frente a anticuerpos inmovilizados específicamente dirigidos contra la proteína TACI, tal como el anticuerpo policlonal de la proteína TACI antihumano de conejo descrito en este documento.

Un cADN de la proteína TACI radiomarcado puede ser sintetizado usando el mRNA seleccionado (a partir de polisomas adsorbidos) como plantilla. El mRNA radiomarcado o el cADN puede ser usado entonces como una sonda para identificar los fragmentos de ADN de la proteína TACI homólogos entre otros fragmentos de ADN genómicos.

La presente descripción también se refiere a vectores de clonación que contienen los genes que codifican los análogos y derivados de la proteína TACI de la invención, que tienen la misma u homóloga actividad funcional que la proteína TACI, y sus homólogos de otra especie. La producción y el uso de derivados y análogos relacionados con la proteína TACI están en la amplitud de la presente descripción. En una realización específica, el derivado o el análogo son funcionalmente activos, es decir, son capaces de exhibir una o varias actividades funcionales asociadas con una proteína TACI de cadena entera, tipo silvestre, de la descripción. En otra realización, la proteína TACI contiene un dominio citoplásmico diferente, por ejemplo, uno incapaz de unirse a CAML pero todavía capaz de modular la activación de AP-1. En otro aspecto, una proteína TACI de la invención puede prepararse con un dominio de lectina o dominios de otra proteína, tal como el receptor de manosa de macrófagos o el receptor de fosfolipasa en el músculo.



Los derivados de la proteína TACI pueden prepararse cambiando la secuencias de ácidos nucleicos codificantes por sustituciones, adiciones o deleciones que porporcionen moléculas funcionalmente equivalentes. Preferiblemente, los derivados son hechos para que tengan una actividad funcional realzada o aumentada en relación con la proteína TACI natural. De forma alternativa, tales derivados pueden codificar fragmentos solubles del dominio extracelular de la proteína TACI que tienen la misma o mayor afinidad para el ligando natural de la proteína TACI de la descripción. Tales derivados solubles pueden ser potentes inhibidores de la unión del ligando a la proteína TACI.

Debido a la degeneración de las secuencias que codifican nucleótidos, pueden ser usadas otras secuencias de ADN que codifiquen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que el gen de la proteína TACI en la práctica de la presente descripción. Éstas incluyen, pero no están limitadas a, alelos, genes homólogos de otra especie, y secuencia de nucleótidos que comprendan todo o partes de genes de la proteína TACI que son cambiados por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo resto de aminoácido dentro de la secuencia, produciéndose así un cambio silente. De la misma manera, los derivados de la proteína TACI de la descripción incluyen, pero no están limitados a, aquellos que contienen, como una secuencia de aminoácidos primaria, todo o parte de la secuencia de aminoácidos de una proteína TACI incluyendo las secuencias cambiadas en las cuales restos de aminoácidos funcionalmente equivalentes son sustituidos por restos dentro de la secuencia causando una sustitución de aminoácidos conservadora. Y así, tal sustitución es definida como una sustitución conservadora.

Por ejemplo, uno o varios restos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden ser sustituidos por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, causando una alteración silente. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia pueden ser seleccionados a partir de otros miembros de la clase a la cual el aminoácido pertenece. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras aromáticas de anillo son fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se espera que tales alteraciones afecten al peso molecular aparente como se determina por la electroforesis en gel de poliacrilamida o por su punto isoelectrico.

Las sustituciones particularmente preferidas son:

- Lys por Arg y viceversa tal que pueda ser mantenida una carga positiva;
- Glu por Asp y viceversa tal que pueda ser mantenida una carga negativa;
- Ser por Thr tal que pueda ser mantenido un OH- libre; y
- Gln por Asn tal que pueda ser mantenido un NH<sub>2</sub> libre.

Las sustituciones de aminoácidos también pueden ser introducidas para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, puede ser introducida una Cys en un sitio potencial para puentes disulfuro con otra Cys. Una His puede ser introducida como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, His puede actuar como un ácido o una base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Pro puede ser introducido debido a su estructura particularmente plana, que induce a β-giros en la estructura de la proteína.

Los genes que codifican los derivados de la proteína TACI y los análogos de la descripción pueden ser producidos por varios métodos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que causan su producción pueden ocurrir a nivel de la proteína o del gen. Por ejemplo, la secuencia del gen de la proteína TACI clonada puede ser modificada según cualquiera de las numerosas estrategias conocidas en la técnica (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*). La secuencia puede ser dividida en sitios apropiados con endonucleasa(s) de restricción, seguido por una modificación enzimática posterior de ser deseada, aislada, y ligada *in vitro*. En la producción del gen que codifica a un derivado o análogo de la proteína TACI, debe ser puesto cuidado para asegurarse de que el gen modificado permanece dentro del mismo marco de lectura translacional que el gen de la proteína TACI, ininterrumpido por las señales de terminación translacionales, en la región génica donde la actividad deseada es codificada.

Además, la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína TACI puede ser mutada *in vitro* o *in vivo*, para crear y/o destruir secuencias de translacion, iniciación y/o terminación, o crear variaciones en las regiones de codificación y/o formar nuevos sitios de la endonucleasa de restricción o destruir los preexistentes, para facilitar además la modificación *in vitro*. Preferiblemente, tales mutaciones realzan la actividad funcional del producto génico de la proteína TACI mutado. Cualquier técnica para la mutagénesis conocida en la técnica puede ser usada, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis dirigida *in vitro* [Hutchinson, C., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **253**:6551 (1978)]; [Zoller y Smith, *DNA*, **3**:479-488 (1984)]; [Oliphant *et al.*, *Gene*, **44**:177 (1986)]; [Hutchinson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:710 (1986)], el uso de enlazadores TAB® (Farmacia), etc. y las técnicas de PCR son preferidas para la mutagénesis dirigida (véase Higuchi, "Using PCR to Engineer DNA", en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Capítulo 6, págs. 61-70 (1989)).

El gen identificado y aislado puede ser insertado entonces en un vector de clonación apropiado. Un gran número de sistemas huésped-vectorial conocidos en la técnica puede ser usado. Los posibles vectores incluyen, pero no están

limitados a, plásmidos o virus modificados, pero el sistema del vector debe ser compatible con la célula huésped usada. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no están limitados a, *E. coli*, fagos tales como los derivados lambda, o plásmidos tales como los derivados pBR322 o derivados del plásmido pUC, por ejemplo, los vectores pGEX, pmalc, pFLAG, etc. La inserción en un vector de clonación, por ejemplo, puede ser lograda ligando el fragmento de ADN en un vector de clonación que tenga extremos cohesivos complementarios. Sin embargo, si los sitios de restricción complementarios usados para fragmentar el ADN no están presentes en el vector de clonación, los extremos de las moléculas de ADN pueden ser modificados enzimáticamente. De forma alternativa, puede ser producido cualquier sitio deseado ligando las secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos del ADN; estos enlazadores ligados pueden comprender específicos oligonucleótidos químicamente sintetizados que codifican las secuencias de reconocimiento de la endonucleasa de restricción. Pueden ser introducidas moléculas recombinantes en las células huésped vía transformación, transfección, infección, electroporación, etc., de modo que sean generadas muchas copias de la secuencia génica. Preferiblemente, el gen clonado está contenido en un plásmido del vector vehículo, lo que proporciona la expansión en una célula clonante, por ejemplo, *E. coli*, y la fácil purificación para la inserción subsecuente en una línea celular de expresión apropiada, si tal es deseado. Por ejemplo, un vector vehículo, que es un vector que puede replicarse en más de un tipo de organismos, puede prepararse para la replicación tanto en *E. coli* como en *Saccharomyces cerevisiae* uniendo las secuencias de un plásmido de *E. coli* con las secuencias del plásmido 2  $\mu$  de levadura.

En un método alternativo, el gen deseado puede ser identificado y aislado después de la inserción en un vector de clonación adecuado con un enfoque "al azar". El enriquecimiento del gen deseado, por ejemplo, mediante fraccionamiento por tamaños, puede hacerse antes de la inserción en el vector de clonación.

Expresión de polipéptidos transmembrana activadores e interactuantes con CAML

La secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína TACI, o su fragmento antigénico, derivado o análogo o derivado funcionalmente activo, incluyendo su proteína quimérica, puede ser insertada en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y la translación de la secuencia que codifica la proteína insertada. Tales elementos son llamados en este documento "promotor". Así, el ácido nucleico que codifica la proteína TACI de la presente invención se asocia operativamente con un promotor en un vector de expresión de la invención, como se define en las reivindicaciones. Tanto las secuencias de cADN como las genómicas pueden ser clonadas y expresadas bajo el control de tales secuencias reguladoras. Un vector de expresión también incluye preferiblemente un origen de replicación.

Las señales transcripcionales y translacionales necesarias pueden ser proporcionadas en un vector de expresión recombinante, o pueden ser suministradas por el gen natural que codifica una proteína TACI y/o sus regiones flanqueantes.

Como se indicada anteriormente, las potenciales parejas quiméricas para la proteína TACI incluyen las que tienen dominios de lectina, receptores de lectina multivalentes naturales, tales como el receptor de manosa de macrófagos, lectinas naturales, u otras fuentes, o un dominio citoplásmico sustituto, capaz de mediar la transducción de la señal o modificar el tratamiento endocítico.

Los sistemas huésped-vector potenciales incluyen, pero no están limitados a, sistemas celulares de mamífero infectados por virus (por ejemplo, el virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas celulares de insecto infectados por virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levadura que contiene vectores de levadura; o bacterias transformada con bacteriófagos, ADN, ADN de plásmido, o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificidades. Dependiendo del sistema de vector-huésped utilizado, puede ser usado cualquiera de un número de elementos de transcripción y translación adecuados.

Una proteína TACI recombinante de la invención como se define en las reivindicaciones, o una construcción quimérica como se define en las reivindicaciones, puede ser expresada cromosómicamente, después de la integración de la secuencia de codificación por recombinación. En cuanto a esto, pueden ser usados cualquiera de un número de sistemas de amplificación para alcanzar altos niveles de expresión génica estable (Véase Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

La célula que contiene el vector recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica una proteína TACI se cultiva en un medio de cultivo celular apropiado en condiciones que proporcionen la expresión de la proteína TACI por la célula.

Cualquiera de los métodos antes descritos para la inserción de fragmentos de ADN en un vector de clonación pueden ser usados para construir vectores de expresión que contengan un gen que consista en señales de control transcripcionales/ translacionales apropiadas y las secuencias que codifican la proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas y recombinación *in vitro* e *in vivo* (recombinación genética).

La expresión de la proteína TACI puede ser controlada por cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica, pero estos elementos reguladores deben ser funcionales en el huésped seleccionado para la expresión. Los promotores que pueden ser usados para controlar la expresión del gen de la proteína TACI incluyen, pero no están limitados a, la región del promotor SV40 temprana [Benoist y Chambon, *Nature*, **290**:304-310 (1981)], el promotor

contenido en la repetición del extremo largo 3' del virus del sarcoma de Rous [Yamamoto, *et al.*, *Cell*, **22**:787-797 (1980)], el promotor de timidina quinasa del herpes [Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:1441-1445 (1981)], las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína [Brinster *et al.*, *Nature*, **296**:39-42 (1982)]; vectores de expresión procariotas tales como los del promotor de  $\beta$ -lactamasa [Villa-Kamaroff, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:3727-3731 (1978)], o el promotor *tac* [DeBoer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:21-25 (1983)]; véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, **242**:74-94 (1980); elementos del promotor de levadura u otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor ADC (alcohol deshidrogenasa), el promotor PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de fosfatasa alcalina; y las regiones de control transcripcionales de animal, que exhiben especificidad en tejidos y han sido utilizadas en animales transgénicos: la región control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas [Swift *et al.*, *Cell*, **38**:639-646 (1984)]; [Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **50**:399-409 (1986)]; [MacDonald, *Hepatology*, **7**:425-515 (1987)]; la región de control del gen de la insulina que es activa en células pancreáticas  $\beta$  [Hanahan, *Nature*, **315**:115-122 (1985)], la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides [Grosschedl *et al.*, *Cell*, **38**:647-658 (1984)]; [Adames *et al.*, *Nature*, **318**:533-538 (1985)]; [Alexander *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **7**:1436-1444 (1987)], la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de pecho, linfoides y mastocitos [Leder *et al.*, *Cell*, **45**:485-495 (1986)], la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado [Pinkert *et al.*, *Genes and Devel.*, **1**:268-276 (1987)], la región de control del gen de la  $\alpha$ -fetoproteína que es activa en el hígado [Krumlauf *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **5**:1639-1648 (1985)]; [Hammer *et al.*, *Science*, **235**:53-58 (1987)], la región de control del gen de la  $\alpha$ -1-antitripsina que es activa en el hígado [Kelsey *et al.*, *Genes and Devel.*, **1**:161-171 (1987)], la región de control del gen  $\beta$ -globina que es activa en células mieloides [Mogram *et al.*, *Nature*, **315**:338-340 (1985)]; [Kollias *et al.*, *Cell*, **46**:89-94 (1986)], la región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en oligodendrocitos en el cerebro [Readhead *et al.*, *Cell*, **48**:703-712 (1987)], la región de control del gen de cadena-2 ligera de miosina que es activa en el músculo esquelético [Sani, *Nature*, **314**:283-286 (1985)], y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo [Mason *et al.*, *Science*, **234**:1372-1378 (1986)].

Los vectores de expresión que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína TACI de la invención pueden ser identificados por cuatro medios generales: (a) amplificación por PCR del ADN del plásmido deseado o mRNA específico, (b) hibridación de ácidos nucleicos, (c) presencia o ausencia de funciones del gen marcador de selección, y (d) expresión de las secuencias insertadas. En un primer enfoque, los ácidos nucleicos pueden ser amplificados por PCR para proporcionar la detección del producto amplificado. En un segundo enfoque, la presencia de un gen ajeno insertado en un vector de expresión puede ser detectada por la hibridación del ácido nucleico usando sondas que comprenden las secuencias que son homólogas al gen marcador insertado. En un tercer enfoque, el sistema recombinante vector/huésped puede ser identificado y seleccionado basado en la presencia o la ausencia de ciertas funciones génicas del "marcador de selección" (por ejemplo, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, la actividad de timidina quinasa, la resistencia a antibióticos, el fenotipo de transformación, la formación del cuerpo de oclusión en baculovirus, etc.) causadas por la inserción de genes ajenos en el vector. En otro ejemplo, si el ácido nucleico que codifica una proteína TACI es insertado dentro de la secuencia génica del "marcador de selección" del vector, pueden ser identificados los recombinantes que contienen el inserto de la proteína TACI por la ausencia de la función del gen de la proteína TACI. En un cuarto enfoque, pueden ser identificados vectores de expresión recombinantes por el ensayo de la actividad, las características bioquímicas o inmunológicas del producto génico expresado por el recombinante, con tal de que la proteína expresada asuma una conformación funcionalmente activa.

Una amplia variedad de combinaciones del huésped/vector de expresión puede ser empleada en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen los derivados de SV40 y los plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, plásmidos de *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX [Smith *et al.*, *Gene*, **67**:31-40 (1988)], pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fagos, por ejemplo, los numerosos derivados del fago  $\lambda$ , por ejemplo, NM989, y otros ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentosos; plásmidos de levadura tales como el plásmido  $2\mu$  o sus derivados; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o mamífero; vectores derivados de las combinaciones de plásmidos y ADN de fago, tales como plásmidos que han sido modificados para emplear el ADN del fago u otras secuencias de control de la expresión; y otros similares.

Por ejemplo, en sistemas de expresión de baculovirus, pueden ser usados tanto vectores de transferencia de no fusión, tales como, pero no limitados a, pVL941 (sitio de clonación *Bam*H1; Summers), pVL1393 (sitio de clonación *Bam*H1, *Sma*I, *Xba*I, *Eco*RI, *Not*I, *Xma*III, *Bgl*II y *Pst*I; Invitrogen), pVL1392 (sitio de clonación *Bgl*II, *Pst*I, *Not*I, *Xma*III, *Eco*RI, *Xba*I, *Sma*I, y *Bam*H1; Summers e Invitrogen), y pBlueBacIII (sitio de clonación *Bam*H1, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I y *Hind*III, con posible rastreo recombinante azul/blanco; Invitrogen) como vectores de transferencia de fusión, tales como, pero no limitados a, pAc700 (sitio de clonación *Bam*H1 y *Kpn*I, en el que el sitio de reconocimiento *Bam*H1 comienza con el codon de iniciación; Summers), pAc701 y pAc702 (igual que pAc700, con marcos de lectura diferentes), pAc360 (sitio de clonación *Bam*H1, 36 pares de bases corriente abajo de un codon de iniciación de polihedrina; Invitrogen (195)), y pBlueBacHisA, B, C (tres marcos de lectura diferentes, con el sitio de clonación *Bam*H1, *Bgl*II, *Pst*I, *Nco*I y *Hind*III, un péptido del extremo N-terminal para la purificación de ProBond, y rastreo recombinante azul/blanco de placas; Invitrogen (220)).

Los vectores de expresión de mamíferos contemplados para uso en la invención incluyen vectores con promotores

inducibles, tales como el promotor de la dihidrofolato reductasa (DHFR), por ejemplo, cualquier vector de expresión con un vector de expresión de DHFR, o un vector de co-amplificación de DHFR/metotrexato, tal como pED (sitio de clonación *PstI*, *Sall*, *Sbal*, *SmaI* y *EcoRI*, expresando el vector tanto el gen clonado como DHFR; véase Kaufman, "Current Protocols in Molecular Biology", 16.12 (1991). De forma alternativa, puede ser usado un vector de co-amplificación de glutamina sintetasa/metionina sulfoximina, tal como pEE14 (sitio de clonación *HindIII*, *XbaI*, *SmaI*, *Sbal*, *EcoRI*, y *BclI*, en el que el vector expresa la glutamina sintasa y el gen clonado; Celltech). En otra realización, un vector que dirige la expresión episomal bajo el control del virus de Epstein Barr (EBV), tal como pREP4 (sitio de clonación *BamHI*, *SfiI*, *XhoI*, *NotI*, *NheI*, *HindIII*, *NheI*, *PvuII* y *KpnI*, el promotor constitutivo de RSV-LTR, marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pCEP4 (sitio de clonación *BamHI*, *SfiI*, *XhoI*, *NotI*, *NheI*, *HindIII*, *NheI*, *PvuII* y *KpnI*, gen temprano constitutivo de hCMV inmediato, marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pMEP4 (sitio de clonación *KpnI*, *PvuII*, *NheI*, *HindIII*, *NotI*, *XhoI*, *SfiI*, *BamHI*, promotor génico inducible de metalotio-neína IIa, marcador seleccionable de higromicina; Invitrogen), pREP8 (sitio de clonación *BamHI*, *XhoI*, *NotI*, *HindIII*, *NheI* y *KpnI*, promotor RSV-LTR, marcador seleccionable de histidinol; Invitrogen), pREP9 (sitio de clonación *KpnI*, *NheI*, *HindIII*, *NotI*, *XhoI*, *SfiI* y *BamHI*, promotor RSV-LTR, marcador seleccionable de G418; Invitrogen), y pEBVHis (promotor RSV-LTR, marcador seleccionable de higromicina, péptido del extremo N-terminal purificable vía la resina ProBond y dividido por enteroquinasa; Invitrogen). Los vectores de expresión de mamíferos seleccionables para uso en la invención incluyen pRc/CMV (sitio de clonación *HindIII*, *BstXI*, *NotI*, *Sbal* y *Apal*, selección G418; Invitrogen), pRc/RSV (sitio de clonación *HindIII*, *SpeI*, *BstXI*, *NotI*, *XbaI*, selección G418; Invitrogen), y otros. Los vectores de expresión mamíferos del virus de vaccinia (véase, Kaufman, 1991, *supra*) para uso de acuerdo con la invención incluyen, pero no están limitados a, pSC11 (sitio de clonación *SmaI*, selección TO- y  $\beta$ -gal), pMJ601 (sitio de clonación *Sall*, *SmaI*, *AflI*, *NarI*, *BspMII*, *BamHI*, *Apal*, *NheI*, *Sall*, *KpnI* y *HindIII*; y selección TK-y  $\beta$ -gal) y pTKgptF1S (sitio de clonación *EcoRI*, *PstI*, *Sall*, *Accl*, *HindII*, *Sbal*, *BamHI* y *HpaI*, selección TK o XPR1).

Los sistemas de expresión en levadura también pueden ser usados de acuerdo con la invención para expresar la proteína TACI. Por ejemplo, pueden ser empleados de acuerdo con la invención el vector de no fusión pYES2 (sitio de clonación *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *GstXI*, *EcoRI*, *BstXI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI* y *HindIII*; Invitrogen) o de fusión pYESHisA, B, C (sitio de clonación *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *BstXI*, *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI*, y *HindIII*, péptido del extremo N-terminal purificado con resina ProBond y dividido con enteroquinasa; Invitrogen), por mencionar solamente dos.

Una vez que una molécula de ADN particular recombinante es identificada y aislada, pueden ser usados varios métodos conocidos en la técnica para propagarla. Una vez que un sistema huésped adecuado y las condiciones de crecimiento son establecidos, los vectores de expresión recombinantes pueden ser propagados y preparados en una cantidad. Como antes se ha explicado, los vectores de expresión que pueden ser usados incluyen, pero no están limitados a, los vectores siguientes o sus derivados: virus humanos o de animal tales como virus vaccinia o adenovirus; virus de insecto tales como baculovirus; vectores de levadura; vectores de fago (por ejemplo, lambda), y vectores de plásmido y ADN de cósmido, por nombrar unos cuantos.

Además, una cepa de célula huésped puede ser escogida que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la manera específica deseada. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento de translación y post-translación y modificación (por ejemplo, glicosilación, división, por ejemplo, de la secuencia señal) de proteínas. Pueden ser escogidas líneas celulares apropiadas o sistemas de huésped para asegurar la modificación deseada y el procesamiento de la proteína expresada ajena. Por ejemplo, puede ser usada la expresión en un sistema bacteriano para producir un producto de la proteína de núcleo no glicosilado.

Los vectores son introducidos en las células huésped deseadas por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, micro-inyección, transducción, fusión de células, dextrano DEAE, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosoma), el uso de una pistola génica o un transportador de vectores de ADN (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **267**:963-967 (1992); Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, **263**:14621-14624 (1988); Hartmut *et al.*, Solicitud de Patente Canadiense N° 2.012.311, presentada el 15 de Marzo de 1990).

#### Terapia génica y vectores transgénicos

Una deficiencia genética de una proteína TACI puede ser uno de los muchos factores que intervienen en la inmunodeficiencia heredada. La presente descripción incluye la terapia génica con el ADNc de la proteína TACI que restaura la función normal de linfocitos en pacientes que tienen un defecto genético en el gen de la proteína *transmembrana activadora e interactuante con CAML (TACI, por sus siglas en inglés)*. La presente descripción también incluye formas modificadas de TACI para su uso como herramientas de gen terapéutico a través de la inserción de ellas en las células madre de la sangre en la preparación para la re-infusión en pacientes como parte de regímenes de trasplante de médula ósea. En una realización se usa un derivado de TACI marcado con un epítipo como una manera de activar selectivamente sólo los linfocitos derivados del trasplante de médula mediante inyección del anticuerpo específico en el paciente. En una realización alternativa, se emplea la transducción de un gen TACI que carece de su porción intracelular para crear un linfocito relativamente inocuo con una respuesta disminuida. Esta realización es útil en las enfermedades autoinmunes que implican la activación de las células B.

En una realización, un gen que codifica una proteína TACI o un fragmento de dominio polipeptídico de la misma se

introduce in vivo en un vector viral. Tales vectores incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso, tal como, pero no limitado a virus herpes simplex (HSV), virus del papiloma, virus de Epstein Barr (EBV), adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), y similares. Se prefieren los virus defectuosos, que carecen por completo o casi por completo de genes virales. El virus defectuoso no es infeccioso después de la introducción en una célula. El uso de vectores virales defectuosos permite la administración a células en un área específica, localizada, sin preocuparse de que el vector pueda infectar otras células. Por lo tanto, los linfocitos pueden ser dirigidos específicamente. Ejemplos de vectores particulares incluyen, pero no se limitan a, un vector defectuoso de herpes virus 1 (HSV1) [Kaplitt et al., Molec. Cell. Neurosci., 2:320-330 (1991)], un vector de adenovirus atenuado, tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet [J. Clin. Invest., 90: 626-630 (1992)], y un vector de virus adeno-asociado defectuoso [Samulski y otros, J. Virol., 61: 3096 hasta 3101 (1987)]; [Samulski et al, J. Virol., 63: 3822 hasta 3.828 (1989)].

Preferiblemente, para la administración *in vivo*, se emplea un tratamiento inmunosupresor apropiado junto con el vector viral, por ejemplo, vector de adenovirus, para evitar inmuno-desactivación del vector viral y de las células transfectadas. Por ejemplo, se pueden administrar citoquinas inmunosupresoras, tales como interleucina-12 (IL-12), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), o anticuerpo anti-CD4, para bloquear las respuestas inmunes humorales o celulares a los vectores virales [véase, por ejemplo, Wilson, Nature Medicine (1995)]. Además, es ventajoso emplear un vector viral que está diseñado para expresar un número mínimo de antígenos.

En otra realización, el gen puede introducirse en un vector retroviral, por ejemplo, como se describe en Anderson et al, Patente de Estados Unidos No. 5.399.346; Mann et al, 1983, Cell 33: 153; Temin et al, Patente de EE.UU. No. 4.650.764; Temin et al, Patente de EE.UU. No. 4.980.289; Markowitz et al, J. Virol., 62: 1.120 (1988); Temin et al, Patente de EE.UU. N° 5.124.263; Publicación de Patente Internacional N° WO 95/07358, publicada el 16 de marzo de 1995, por Dougherty et al.; y Kuo et al, Blood, 82: 845 (1993).

La administración de genes dirigidos se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 95/28494, publicada en octubre de 1995.

Alternativamente, el vector puede introducirse in vivo mediante lipofección. Durante la última década, ha habido un creciente uso de liposomas para la encapsulación y transfección de ácidos nucleicos in vitro. Pueden utilizarse lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y riesgos encontrados con la transfección mediada por liposomas para preparar liposomas para la transfección in vivo de un gen que codifica un marcador [Feigner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 7413-7417 (1987); ver Mackey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 8.027-8031 (1988)]. El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente, y también promover la fusión con membranas celulares cargadas negativamente [Felgner y Ringold, Science, 337: 387-388 (1989)]. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en los órganos específicos in vivo tiene ciertas ventajas prácticas. El transporte molecular de liposomas dirigido a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que dirigir la transfección a tipos celulares particulares sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, tal como páncreas, hígado, riñón, y el cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas para el propósito del transporte dirigido [ver Mackey, et al., Supra]. Los péptidos dirigidos, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas, podrían acoplarse a liposomas químicamente.

También es posible introducir el vector in vivo como un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudos para terapia génica pueden introducirse en las células huésped deseadas mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, uso de una pistola génica o uso de un vector de ADN transportador [véase, por ejemplo, Wu et al., J. Biol. Chem., 267: 963 - 967 (1992); Wu y Wu, J. Biol. Chem., 263: 14621 - 14.624 (1988); Hartmut et al., Solicitud de Patente Canadiense No, 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990].

En una realización preferida de la presente descripción, un vector de terapia génica como se ha descrito anteriormente emplea una secuencia de control de la transcripción operativamente asociado con la secuencia para la proteína TACI insertada en el vector. Es decir, un vector de expresión específico de la presente invención se puede utilizar en la terapia génica.

#### Reconocimiento génico

Como se usa en este documento el "reconocimiento génico" es un tipo de recombinación homóloga que ocurre cuando un fragmento de ADN genómico es introducido en una célula de mamífero y aquel fragmento se localiza y se recombina con secuencias homólogas endógenas.

Como se usa en este documento un "ratón genosuprimido" es un ratón que contiene dentro de su genoma un gen específico que ha sido inactivado por el método de reconocimiento génico. Un ratón genosuprimido incluye tanto el ratón heterocigótico (es decir, un alelo defectuoso tal como un alelo tipo silvestre) y el mutante homocigótico (es decir, dos alelos defectuosos).

Como se usa en este documento un "gen marcador" es un marcador de selección que facilita el aislamiento de células transfectadas raras a partir de la mayoría de células tratadas en la población. Una lista no comprensiva de tales marcadores incluye neomicina fosfotransferasa, higromicina B fosfotransferasa, xantina/guanina fosforibosilo transfe-

rasa, timidina quinasa del herpes simple y toxina de difteria.

La actividad funcional de la proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML puede ser evaluada transgénicamente. En relación a esto, puede ser usado un modelo de ratón genosuprimido. El gen de la proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML puede ser usado en estudios de complementación empleando un ratón genosuprimido. Los vectores transgénicos, incluyendo vectores virales, o clones de cósmido (o clones de fago) correspondientes al *locus* tipo silvestre de un gen candidato pueden ser construidos usando el gen de la proteína TACI aislado. Pueden ser introducidos cósmidos en ratones transgénicos usando procedimientos publicados [Jaenisch, *Science*, **240**:1468-1474 (1988)]. En un sentido genético, el transgen actúa como una mutación supresora.

De forma alternativa, un modelo de animal transgénico puede prepararse en el cual sea interrumpida la expresión del gen de la proteína TACI. La expresión génica es interrumpida, de acuerdo con la invención, cuando ninguna proteína funcional es expresada. Un método estándar para evaluar el efecto fenotípico de un producto génico es emplear la tecnología transgénica para suprimir el gen. De forma alternativa, pueden ser usadas técnicas recombinantes para introducir mutaciones, tales como mutaciones sin sentido y ámbar, o mutaciones que conduzcan a la expresión de una proteína inactiva. En otra realización, los genes de la proteína TACI pueden ser analizados examinando sus efectos fenotípicos cuando se expresan en la orientación antisentido en animales tipo silvestre. En este enfoque, la expresión del alelo tipo silvestre es suprimida, lo que conduce a un fenotipo mutante. La formación de la doble hélice de ARN · ARN (antisentido-sentido) previene la manipulación normal del mRNA, causando la eliminación parcial o completa del efecto del gen tipo silvestre. Esta técnica ha sido usada para inhibir la síntesis de TK en un cultivo de tejido y para producir los fenotipos de la mutación *Kruppel* en drosófila, y la mutación *Shiverer* en ratones [Zant *et al.*, *Cell*, **36**:1007-1015 (1984); Green *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, **55**:569-597 (1986); Katsuki *et al.*, *Science*, **241**:593-595 (1988)]. Una ventaja importante de este enfoque es que sólo se necesita que se exprese una pequeña parte del gen para la inhibición eficaz de la expresión del mRNA cognado entero. El transgen antisentido será colocado bajo el control de su propio promotor u otro promotor expresado en el tipo de célula correcta, y colocado corriente arriba del sitio polyA de SV40. Este transgen será usado para generar ratones transgénicos o usando la tecnología transgénica génica.

Así, la presente descripción se extiende a la preparación de nucleótidos antisentido y ribozimas que pueden ser usados para interferir con la expresión de la proteína TACI a nivel translacional. Este enfoque utiliza el ácido nucleico antisentido y ribozimas para bloquear la translación del mRNA específico, enmascarando este mRNA con un ácido nucleico antisentido o dividiéndolo con una ribozima. Pueden ser introducidos genes que codifican ácidos nucleicos antisentido específicos del mRNA de TACI o ribozimas, por ejemplo, usando técnicas como las descritas anteriormente para la "Terapia Génica". De forma alternativa, pueden prepararse oligonucleótidos antisentido sintéticos o ribozimas.

Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una parte de una molécula de mRNA específica [véase Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.*, **172**:298 (1988)]. En la célula, se hibridan a este mRNA, formando una molécula bicatenaria. La célula no traduce un mRNA en esta forma bicatenaria. Por lo tanto, los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la expresión de mRNA en la proteína. Oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos y moléculas que se hibriden al codon de iniciación AUG serán particularmente eficientes, ya que éstas son fáciles de sintetizar y probablemente plantean menos problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en células de órganos. Los métodos de antisentido han sido usados para inhibir la expresión de muchos genes *in vitro* [Marcus-Sekura, 1988, *supra*; Hambor *et al.*, *J. Exp. Med.*, **168**:1237 (1988)]. Los nucleótidos antisentido sintéticos preferiblemente contienen análogos de fosfoester, tales como fosforiolatos, o tioesteres, más bien que enlaces fosfoester naturales. Tales análogos con enlace fosfoester son más resistentes a la degradación, aumentando la estabilidad y, por lo tanto, la eficacia de los ácidos nucleicos antisentido.

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de dividir específicamente otras moléculas de ARN monocatenarias de una manera algo análoga a las endonucleasas de restricción del ADN. Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, tipo *Tetrahymena* y tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas tipo *Tetrahymena* para inactivar a una especie de mRNA específica, y las secuencias de reconocimiento de dieciocho bases son preferibles a las secuencias de reconocimiento más cortas.

Las secuencias de ADN que codifican la proteína TACI descrita y proporcionada en este documento pueden así ser usadas para preparar moléculas antisentido contra los mRNA y ribozimas que los dividen para la proteína TACI, inhibiéndose así la expresión del gen que codifica la proteína TACI, lo que puede reducir el nivel de estimulación inmune por las células dendríticas, o el nivel de detección clonal mediado por las células epiteliales del timo.

El reconocimiento génico en células madres embrionarias es una técnica relativamente nueva que permite la manipulación exacta de los genes *in vivo*. Esta técnica permite la creación de ratones con mutaciones definidas en la estructura de cualquier gen dado. Esta capacidad de generar mutaciones predeterminadas da a los investigadores la capacidad de aplicar el poder de la genética al complejo sistema inmunológico humano, tal como ha sido aplicado satisfactoriamente en sistemas neuronales para organismos tales como la drosófila y *C. elegans*.

Una clave para encontrar tratamientos para muchos trastornos ha sido el desarrollo de modelos apropiados de ani-

mal. La presente descripción incluye un ratón genosuprimido que contiene un alelo no funcional para el gen que codifica de forma natural y expresa la proteína TACI funcional. Incluido dentro de este aspecto de la invención hay un ratón genosuprimido que contiene dos alelos no funcionales para el gen que codifica de forma natural y expresa la proteína TACI funcional y que, por lo tanto, es incapaz de expresar la proteína TACI funcional.

- 5 Pueden ser generados alelos no funcionales en cualquier número de los caminos que son conocidos en la técnica, todos lo cuales pueden ser usados en la presente invención. En algunas realizaciones, un alelo no funcional es defectuoso por una inserción de ADN ajeno en la región de codificación del alelo de la proteína TACI. En una realización preferida, la inserción se coloca en el primer exón de la región de codificación del gen de la proteína TACI. En las realizaciones más preferidas, la inserción contiene una señal para terminar la transcripción antes de la transcripción de una región del alelo que codifica la proteína TACI. En estas realizaciones preferidas es todavía más preferido eliminar una sección de ADN al principio de la región de codificación para la proteína TACI y sustituirla con la inserción anterior.

15 La presente descripción también incluye un método para producir el ratón genosuprimido de la presente invención que incluye: obtener el ADN genómico que codifica una proteína TACI, construir un vector que contiene dicho ADN genómico y un gen marcador en el que dicho gen marcador es colocado dentro del exón de dicho ADN genómico. El vector entonces es electroporado en una célula madre embrionaria y se selecciona una célula madre embrionaria que ha integrado el vector en el genoma, en el que la célula seleccionada ha integrado el gen marcador en el sitio endógeno del gen para la proteína TACI en el genoma de ratón. La célula entonces se inyecta en un blastocisto de ratón que entonces es implantado de nuevo en un ratón hembra pseudoembarazado, que da a luz a un ratón quimérico que contiene un alelo defectuoso para la proteína TACI en su línea germinal. El ratón quimérico es entonces cruzado con un ratón de una línea innata estándar para generar un ratón genosuprimido heterocigótico. Dos ratones heterocigóticos entonces son criados generando un descendiente de ratón genosuprimido homocigótico. Los protocolos detallados para un reconocimiento génico con éxito son conocidos en la técnica y, por ejemplo, como se describe en Joyner, A. L. (1993) "Gene Targeting: A Practical Approach. The Practical Approach Series" (Rickwood, D., y Hames, B. D., Eds.), IRL Press, Oxford, que se incorpora por referencia en la presente en su totalidad.

20 Otro aspecto de la descripción es un método para seleccionar a un agente terapéutico para su uso posible como inmunodepresivo, que comprende administrar un agente terapéutico problema al ratón genosuprimido de la presente descripción y medir y/o determinar el efecto del supuesto agente terapéutico sobre cualquiera de las características fenotípicas que, según se puede pensar, están relacionadas con la inmunodeficiencia.

- 30 Una realización preferida de este aspecto de la descripción incluye administrar un agente terapéutico problema al ratón genosuprimido de la presente invención y medir una respuesta de prueba en el ratón genosuprimido, en el que la respuesta normal del ratón genosuprimido en ausencia de un agente terapéutico es característicamente diferente de la de los ratones tipo silvestre. Los agentes terapéuticos potenciales son seleccionados sobre la base de si hay detrás una importancia estadística entre la respuesta de prueba y la respuesta normal. Los agentes terapéuticos potenciales son seleccionados por mostrar un cambio estadísticamente significativo de la característica medida/determinada.

En una realización preferida, la respuesta normal del ratón genosuprimido en ausencia de un agente terapéutico es característicamente diferente por ser característicamente más baja que la de los ratones tipo silvestre y los agentes terapéuticos seleccionados actúan para aumentar la sensibilidad de aquella característica.

- 40 Los agentes terapéuticos problemas pueden ser obtenidos a partir de cualquier número de fármacos o genotecas de péptidos incluyendo las disponibles en el comercio de las empresas químicas farmacéuticas.

#### Purificación de proteínas TACI y sus homólogos

45 La proteína TACI de la presente invención y sus homólogos pueden purificarse por cualquier número de los procedimientos que abarcan una amplia variedad de etapas de purificación conocidas. Los expertos en la técnica saben dirigirse a referencias, tales como las series "Methods in Enzymology", para un mayor detalle y profundizaje. Las etapas iniciales para purificar las proteínas de la presente invención incluyen dilución o precipitación con sales, tal como en fraccionamientos con sulfato de amonio; fraccionamientos por exclusión de disolventes, por ejemplo, una precipitación con etanol; extracciones con detergentes para liberar a las proteínas unidas a la membrana usando detergentes tales como Triton X-100, Tween-20 etc.; o extracciones salinas superiores. La solubilización de proteínas también puede ser lograda usando disolventes apróticos tales como el dimetil-sulfóxido y la hexametilfosforamida. Además, puede usarse la ultracentrifugación a alta velocidad sola o junto con otras técnicas de extracción.

55 Las etapas de aislamiento secundario o purificación generalmente buenas incluyen la absorción en fase sólida usando gel de fosfato de calcio o hidroxiapatito; o la unión en fase sólida. La unión en fase sólida puede ser realizada por unión iónica, con un intercambiador aniónico, tal como dietilaminoetilo (DEAE), o con dietil-[2-hidroxiopropil]aminoetilo (QAE) Sephadex o celulosa; o con un intercambiador catiónico tal como carboximetilo (CM) o sulfo-propilo (SP) Sephadex o celulosa. El medio alternativo de unión en fase sólida incluye la explotación de las interacciones hidrófobas, por ejemplo, usando un soporte sólido tal como fenilSepharse y un tampón salino superior; unión de afinidad, utilizando, por ejemplo, CAML (o uno de los fragmentos de unión de TACI) unido a un soporte

5 activado; inmuno-unión, utilizando, por ejemplo, un anticuerpo frente a la proteína TACI unida a un soporte activado; así como otros soportes en fase sólida incluyendo aquellos que contienen tintes específicos o lectinas, etc. Una técnica de soporte en fase sólida más que a menudo se usa al final del procedimiento de purificación se basa en la exclusión por tamaños, tal como con geles de Sephadex y Sepharose, o técnicas presurizadas o centrífugas de membrana, usando filtros de membrana de exclusión por tamaños.

Las separaciones con soportes en fase sólida generalmente son realizadas por lotes con centrifugaciones lentas o por cromatografía de columna. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), incluyendo las técnicas relacionadas tales como FPLC, es, en este momento, el medio más común para realizar la cromatografía líquida. Las técnicas de exclusión por tamaños también pueden ser logradas con la ayuda de una centrifugación a baja velocidad.

10 Además pueden ser empleadas técnicas de permeación por tamaños tales como las técnicas electroforéticas de gel. Estas técnicas son realizadas generalmente en tubos, placas o por electroforesis capilar.

15 Casi todas las etapas que implican la purificación de la proteína emplean un tampón biológico a un pH cercano al pKa de aquel tampón. Los tampones típicos pueden ser comprados con la mayoría de los catálogos bioquímicos e incluyen tampones clásicos tales como Tris, pirofosfato, monofosfato y difosfato, o tampones de Good [Good, N. E., *et al.*, *Biochemistry*, **5**:467 (1966)]; [Good, N. E. e Izawa, S., *Meth. Enzymol.*, **24**, Parte B, 53 (1972)]; y [Ferguson, W. J. y Good, N. E., *Anal. Biochem.*, **104**:300 (1980)] tales como Mes, Hepes, Mops, tricina y Ches.

Los materiales para realizar todas estas técnicas están disponibles a partir de una variedad de fuentes tales como la empresa química Sigma en San Louis, Missouri.

#### Anticuerpos contra la proteína TACI

20 La presente descripción describe la secuencia de la proteína y las propiedades de una proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML específica, TACI, permitiendo así el desarrollo de reactivos de anticuerpo específicos para la parte extracelular del receptor. Los reactivos de anticuerpo polivalentes pueden actuar para reticular y activar la señalización de TACI en linfocitos, un procedimiento útil en las situaciones en las que una mayor sensibilidad de los linfocitos es beneficiosa. Tales situaciones incluyen, por ejemplo, en el tratamiento de las inmunodeficiencias que son congénitas o adquiridas, por ejemplo, el SIDA. Además, estos reactivos de anticuerpo pueden ser usados como un tratamiento adyuvante en el cáncer en los casos en los que el sistema inmunológico puede ayudar a la erradicación de las células neoplásicas. Los reactivos de anticuerpos monovalentes pueden actuar de modo similar para bloquear el acceso a TACI en los linfocitos, un procedimiento que es útil en situaciones en las que la sensibilidad deprimida de los linfocitos es beneficiosa, tal como durante los trasplantes.

30 De acuerdo con la presente descripción, la proteína TACI producida de forma natural, recombinantemente o por síntesis química, y sus fragmentos u otros derivados o análogos, incluyendo las proteínas de fusión, puede ser usada como un inmunógeno para generar los anticuerpos que reconocen a la proteína TACI. Tales anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, policlonales, monoclonales, quiméricos, cadena simple, fragmentos Fab y una genoteca de expresión de Fab. Los anticuerpos de la proteína anti-TACI de la invención pueden ser inespecíficos, por ejemplo, pueden reconocer a la proteína TACI de especies diferentes. Los anticuerpos policlonales tienen una mayor probabilidad de inespecificidad. De forma alternativa, un anticuerpo aquí descrito puede ser específico para una forma sola de la proteína TACI. Preferiblemente, tal anticuerpo es específico para la proteína TACI humana. Se pueden marcar los anticuerpos, como se describe anteriormente para las proteínas TACI y los polipéptidos.

40 Varios procedimientos conocidos en la técnica pueden ser usados para la producción de anticuerpos policlonales frente a la proteína TACI o sus derivados o análogos. Para la producción del anticuerpo, pueden ser inmunizados varios animales huésped por la inyección con la proteína TACI, o su derivado (por ejemplo, el fragmento o la proteína de fusión), incluyendo, pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, oveja, cabras, etc. En una realización, la proteína TACI o sus fragmentos pueden ser conjugados a un vehículo inmunogénico, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH). Varios adyuvantes pueden ser usados para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero no limitado a, Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (*bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

50 Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína TACI, o su fragmento, análogo o derivado, puede ser usada cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en un cultivo. Éstas incluyen, pero no están limitados a, la técnica de hibridoma desarrollada en sus inicios por Kohler y Milstein [*Nature*, **256**:495-497 (1975)], así como la técnica del trioma, técnica del hibridoma de células B humanas [Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, **4**:72 (1983)]; [Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:2026-2030 (1983)], y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole *et al.*, en "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 (1985)]. En una realización adicional, pueden ser producidos anticuerpos monoclonales en animales sin germen utilizando una tecnología reciente [documento PCT/US90/02545]. De hecho, pueden ser usadas técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" [Morrison *et al.*, *J. Bacteriol.*, **159**:870 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature*, **312**:604-608 (1984);



Takeda *et al.*, *Nature*, **314**:452-454 (1985)] empalmado los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para una proteína TACI junto con los genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada; tales anticuerpos están descritas aquí. Tales anticuerpos humanos o quiméricos humanizados son preferidos para su uso en la terapia de enfermedades humanas o trastornos (descritos *infra*), porque es mucho menos probable que los anticuerpos humanos o humanizados induzcan una respuesta inmune que los anticuerpos xenogéneos, en particular, una respuesta alérgica, por sí mismos.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple [Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup> 5.476.786 y 5.132.405 de Huston; Patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 4.946.778] pueden ser adaptadas para producir los anticuerpos de cadena simple específicos de la proteína TACI. Una realización adicional utiliza las técnicas descritas para la construcción de genotecas de expresión de Fab [Huse *et al.*, *Science*, **246**:1275-1281 (1989)] para permitir una identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para una proteína TACI, o sus derivados o análogos.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen el ideotipo de la molécula de anticuerpo pueden ser generados mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no están limitados a: el fragmento F(ab')<sub>2</sub> que puede ser producido por la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden ser generados reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')<sub>2</sub>, y los fragmentos Fab que pueden ser generados tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

En la producción de anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado puede ser lograda por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas), inmunoensayos "sandwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, enzimas o radioisótopos marcadores, por ejemplo), inmunotransferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación complementa, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos con inmunoelectroforesis, etc. En una realización, se detecta la unión del anticuerpo detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, se detecta el anticuerpo primario detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. En una realización más, se marca el anticuerpo secundario. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y están en la amplitud de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un epítipo específico de una proteína TACI, se pueden analizar los hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de la proteína TACI que contiene tal epítipo. Para la selección de un anticuerpo específico contra una proteína TACI de una especie animal particular, se puede seleccionar sobre la base de la unión positiva con la proteína TACI expresada o aislada a partir de las células de aquella especie animal.

Los anticuerpos precedentes pueden ser usados en métodos conocidos en la técnica que se refiere a la localización y la actividad de la proteína TACI, por ejemplo, para inmunotransferencia Western, imagenología de la proteína TACI *in situ*, midiendo su nivel en muestras fisiológicas apropiadas, etc. usando cualquiera de las técnicas de detección mencionadas anteriormente o conocidas en la técnica.

En una realización específica, pueden ser generados anticuerpos agonistas o antagonistas frente a la actividad de la proteína TACI. Tales anticuerpos pueden ser analizados usando los ensayos descritos *infra* para identificar a los ligandos.

#### Ligandos frente a la proteína TACI

La identidad del ligando endógeno de la proteína TACI es desconocida. La proteína TACI puede ser usada para seleccionar a clones para identificar el(los) ligando(s) endógeno(s). Este ligando está implicado probablemente en la regulación del sistema inmunológico también, y así debe tener usos similares o complementarios a los descritos en este documento. Los métodos para seleccionar los ligandos de TACI-1 incluyen: (i) a través del uso de un sistema de dos híbridos de levadura con TACI-1 como "cebo", como se describe, por ejemplo, en Chien *et al.*, *Proc. Natl. Science. USA*, **88**:9578-9582 (1991) y Durfee *et al.*, *Genes Dev.*, **7**:555-69 (1993); (ii) la interacción clonando genotecas de expresión de *E. coli* como se describe anteriormente; y (iii) la expresión funcional clonando en células de mamífero como se describe anteriormente.

La identificación y el aislamiento de un gen que codifica una proteína TACI de la descripción proporcionan la expresión de la proteína TACI o sus fragmentos en cantidades mayores a las que pueden conseguirse ser aislada a partir de fuentes naturales, o en células que son manipuladas especialmente para ser reguladas por la proteína TACI expresada después de la transfección o la transformación de las células. En consecuencia, además del diseño racional de agonistas y antagonistas basados en la estructura de la proteína TACI, la presente descripción contempla un método alternativo para identificar los ligandos específicos de la proteína TACI usando varios ensayos de selección conocidos en la técnica.

Cualquier técnica de selección conocida en la técnica puede ser usada para seleccionar a los agonistas de la proteína TACI o los antagonistas. La presente descripción contempla rastreos para pequeñas moléculas ligando o análogos de ligando y miméticos, así como rastreos para el(los) ligando(s) natural(es) que se unen y actúan como agonis-

tas o antagonistas de la proteína TACI *in vivo*. Por ejemplo, pueden ser seleccionadas genotecas de productos naturales usando ensayos aquí descritos para moléculas que actúan como agonistas o antagonistas de la actividad de la proteína TACI, o que se unen al dominio extracelular o al dominio citoplásmico de TACI.

5 El conocimiento de la secuencia primaria de la proteína TACI, y la semejanza de aquella secuencia con las proteínas de función conocida, puede proporcionar una pista inicial de los inhibidores o antagonistas de la proteína. La identificación y el rastreo de antagonistas además son facilitados determinando las propiedades estructurales de la proteína, por ejemplo, usando cristalografía de rayos X, difracción con neutrones, espectrometría de resonancia magnética nuclear, y otras técnicas para la determinación de la estructura. Estas técnicas proporcionan el diseño racional o la identificación de agonistas y antagonistas.

10 Otro enfoque usa fagos recombinantes para producir grandes genotecas. Usando el "método del fago" [Scott y Smith, *Science*, **249**:386-390 (1990); Cwirla, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**:6378-6382 (1990); Devlin *et al.*, *Science*, **249**:404-406 (1990)], pueden ser construidas genotecas muy grandes ( $10^6$ - $10^8$  entidades químicas). Un segundo enfoque usa principalmente métodos químicos, de los cuales el método de Geysen [Geysen *et al.*, *Molecular Immunology*, **23**:709-715 (1986); Geysen *et al.*, *J. Immunologic Method*, **102**:259-274 (1987)] y el método de Fodor *et al.* [Science, **251**:767-773 (1991)] son ejemplos. Furka *et al.* [14<sup>o</sup> Congreso Internacional de Bioquímica, Volumen 5, Resúmen FR:013 (1988); Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **37**:487-493 (1991)], Houghton [Patente de EE.UU. N° 4.631.211, expedida en Diciembre de 1986] y Rutter *et al.* [Patente de EE.UU. N° 5.010.175, expedida el 23 de Abril de 1991] describen métodos para producir una mezcla de los péptidos que pueden ser analizados como agonistas o antagonistas.

20 En otro aspecto, pueden usarse genotecas sintéticas [Needels *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA*, **90**:10700-4 (1993); Ohlmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA*, **90**:10922-10926 (1993); Lam *et al.*, publicación de Patente Internacional N° WO 92/00252; Kocis *et al.*, publicación de Patente Internacional N° WO 9428028 y similares para seleccionar los ligandos de la proteína TACI. De forma alternativa, pueden ser realizados ensayos para unir el ligando soluble a las células que expresan las formas recombinantes del dominio extracelular del extremo N-terminal de TACI. Los ligandos solubles pueden ser proporcionados fácilmente como polipéptidos recombinantes o sintéticos.

El rastreo puede ser realizado con células recombinantes que expresen TACI, o sus fragmentos, o de forma alternativa, usando la proteína purificada, por ejemplo, producida recombinantemente, como se describe anteriormente. Por ejemplo, la capacidad del fragmento de TACI marcado, soluble o solubilizado para unir el ligando puede ser usada para rastrear genotecas, como se describe en las referencias precedentes.

30 Selección de nuevos fármacos inmunodepresivos

Ciertas enfermedades son el resultado de la activación de la respuesta de los linfocitos B. Un ejemplo es el lupus eritematoso sistémico (SLE), en el cual se crean anticuerpos que reaccionan con antígenos (proteínas, ADN, etc.) naturalmente presentes en el paciente. Los anticuerpos forman complejos con los antígenos, y circulan como aglomerados de la proteína reactiva. Estos complejos se depositan en órganos diferentes y conducen a muchos de los síntomas del SLE, incluyendo el fallo de riñón, síntomas neurológicos y la muerte. Los tratamientos actuales incluyen el uso de inmunodepresivos relativamente no específicos tales como la ciclosporina A o los esteroides que deprimen las respuestas tanto en células B como en células T. Aunque a menudo se puedan tratar el SLE y enfermedades similares eficazmente, hay un riesgo significativo de sobre-inmunodepresión, en el cual el paciente desarrolla infecciones serias debido a la carencia de células T que funcionen. Un nuevo fármaco inmunodepresivo que bloquee selectivamente la acción de los linfocitos B, dejando las células T intactas para proteger a los pacientes de patógenos virales sería extremadamente útil para tratar estas enfermedades. Por lo tanto, puede ser usado TACI-1 como una nueva herramienta para desarrollar fármacos inmunodepresivos específicos para los linfocitos B.

45 La proteína TACI no está naturalmente presente en los linfocitos T maduros o células T Jurkat, una línea celular que tiene características fenotípicas de las células T maduras. En realidad, el nivel más alto de expresión de la proteína TACI está en los linfocitos B periféricos, mientras que las células T periféricas no expresan la proteína TACI. Sin embargo, las células T Jurkat pueden ser transfectadas con un plásmido de expresión de TACI y el TACI expresado puede ser fácilmente estimulado por la reticulación con un anticuerpo específico de TACI. Esta estimulación conduce a la activación de un par de rutas de segundos mensajeros que son tanto necesarias como suficientes para estimular el factor de transcripción de células T temprano NF-AT.

50 En una realización particular, las células T Jurkat son transfectadas con un plásmido de expresión de TACI-1 y un plásmido indicador de NF-AT. Las células T Jurkat expresan naturalmente el receptor de células T (TCR). Las células son estimuladas por la adición de anticuerpos contra TACI-1, anticuerpos contra TCR, o anticuerpos contra ambos. Los fármacos candidatos son mezclados con las células T Jurkat y el efecto de estos fármacos es determinado. Las genotecas de fago y químicas descritas anteriormente pueden ser usadas como fuentes para fármacos candidatos.

Estos fármacos candidatos entonces son aplicados en un experimento paralelo en el cual son usados anticuerpos contra TCR en lugar de anticuerpos contra TACI-1. Si el fármaco candidato no tiene ningún efecto sobre la estimulación de la señal de SEAP debido a la activación dependiente del anticuerpo de TCR, el fármaco candidato es identi-

ficado como que tiene inhibición selectiva de la respuesta activada de TACI-1. Tales fármacos seleccionados incluyen la clase de fármacos que pueden inhibir selectivamente a la respuesta de las células B (la producción del anticuerpo), permitiendo que proceda la inmunidad mediada por las células T (celular). Tales fármacos seleccionados pueden ser usados para tratar las enfermedades autoinmunes descritas anteriormente. Como TACI-1 activa a los linfocitos por un mecanismo nuevo (es decir, por el contacto directo con CAML) es probable que un número significativo de fármacos puedan descubrirse para que puedan interferir con la ruta dependiente de CAML, y que aún dejen intacta la señalización normal por el receptor de células T.

En una realización preferida de este tipo, el plásmido indicador de NF-AT contiene al indicador de SEAP. Esta señal se usa para medir el grado de inhibición de la activación. El ensayo del indicador de SEAP puede ser ampliado para ser realizado por un robot de rastreo. Los fármacos que bloquean la activación de TACI-1, pero no TCR así medida por el ensayo del indicador de SEAP son identificados como que tienen una inhibición selectiva de la respuesta activada de TACI-1.

De forma alternativa, puede ser empleada una genoteca de fagos. Se han construido genotecas de fagos que cuando se infectan en el huésped *E. coli* producen secuencias peptídicas aleatorias de aproximadamente 10 a 15 aminoácidos [Parmley y Smith, *Gene*, **73**:305-318 (1988), Scott y Smith, *Science*, **249**:386-249 (1990)]. Específicamente, la genoteca de fagos puede ser mezclada en diluciones bajas con *E. coli* permisivo en agar de LB de punto de fusión bajo que entonces es vertido sobre la cima de las placas de agar de LB. Después de la incubación de las placas a 37°C durante un periodo de tiempo, se formarán pequeñas placas claras en un cultivo de *E. coli* que representa el crecimiento del fago activo y la lisis de *E. coli*. Un representante de estos fagos puede ser absorbido en filtros de nilón colocando los filtros secos en las placas de agar. Los filtros pueden ser marcados por la orientación, retirados y colocados en soluciones lavadoras para bloquear cualquier sitio absorbente restante. Los filtros entonces pueden ser colocados en una solución que contenga, por ejemplo, un fragmento radiactivo de una proteína TACI que contenga el dominio extracelular del extremo N-terminal, por ejemplo, para TACI-1 humano esto es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. Después de un período de incubación especificado, los filtros pueden ser lavados a fondo y revelada su autoradiografía. Las placas que contienen el fago que se une al dominio extracelular del extremo N-terminal radiactivo entonces pueden ser identificadas. Estos fagos además pueden ser clonados y luego analizados de nuevo por su capacidad de inhibir la estimulación de TACI por un anticuerpo anti-TACI inhibiendo la estimulación correspondiente de TCR como se describe anteriormente.

Una vez que los fagos han sido purificados, la secuencia de unión contenida dentro del fago puede ser determinada por técnicas de secuenciación de ADN estándar. Una vez que se conoce la secuencia de ADN, pueden ser generados péptidos sintéticos que representen a estas secuencias.

El(los) péptido(s) eficaz o eficaces pueden ser sintetizados en grandes cantidades para su uso en modelos *in vivo* y eventualmente en seres humanos como fármacos inmunodepresivos, por ejemplo. Debe ser acentuado que la producción de un péptido sintético es un trabajo relativamente no intensivo, de fácil fabricación, y su calidad es controlada y, por eso, pueden ser producidas grandes cantidades del producto deseado a un precio bastante bajo. Combinaciones similares de péptidos sintéticos producidos en masa han sido usadas recientemente con mucho éxito [Patarroyo, *Vaccine*, **10**:175-178 (1990)].

#### Métodos y composiciones terapéuticas

La proteína transmembrana activadora e interactuante con CAML descrita aquí puede activar dos señales normalmente usadas para iniciar el crecimiento celular y la división. Este receptor probablemente está implicado en la transformación neoplásica de linfocitos T o B en el linfoma o la leucemia. Por lo tanto, las formas negativas dominantes de TACI-1 son útiles para deprimir el crecimiento de tales células cancerígenas. De forma alternativa, la sobreestimulación de TACI-1 puede conducir a la muerte celular programada. Aprovechando esta propiedad, se puede inducir la muerte de leucemia o de linfomas con la expresión de la superficie celular de TACI-1 por tal sobre-estimulación. La activación de la proteína TACI con el anticuerpo o la reticulación puede activar una ruta endógena que conduce a la apoptosis. La unión con una forma monomérica de un anticuerpo o ligando análogo puede bloquear la ruta endógena asociada a la proteína TACI e interferir con la simulación del crecimiento.

*Estimulación terapéutica de la actividad de TACI.* Como se ha discutido anteriormente, la presente descripción proporciona ventajosamente la estimulación selectiva del sistema inmunológico actuando como agonista de la actividad de TACI. Los agonistas de TACI incluyen el ligando o los ligandos de TACI descubiertos como se describe *supra*, y los anticuerpos que reticulan el receptor. Los agonistas de ligando o agonistas del anticuerpo pueden ser administrados como se describe más abajo para el tratamiento de sujetos para los que es deseada una estimulación inmune, particularmente de las células B.

Las respuestas de células B pueden ser particularmente importantes en la lucha contra las enfermedades infecciosas, incluyendo, pero no limitadas a, infecciones bacterianas, virales, de protozoos y parasitarias. Los anticuerpos contra microorganismos infecciosos pueden inmovilizar rápidamente a los organismos uniéndose al antígeno, seguido del ataque complementario o el ataque mediado por células. Así, un agonista de TACI descrito aquí puede ser proporcionado a un sujeto que sufra de una infección para reforzar las respuestas inmunes humorales. Los agonistas de TACI pueden ser particularmente útiles para reforzar las respuestas inmunes después de la vacunación, du-

rante la exposición con el organismo infeccioso. Así, los sujetos que están particularmente en peligro respecto a las enfermedades infecciosas, tales como la gripe, pueden complementar una vacunación o la inmunidad de recuerdo con un agonista de TACI durante la estación gripal. El refuerzo inmune comparable podría ser usado con los sujetos que entran o vuelven a una zona con una enfermedad infecciosa endémica, tal como la malaria.

- 5 Además, las respuestas de las células B pueden ser importantes en la amplificación de respuestas inmunes contra los tumores que expresen antígenos específicos al tumor. Así, puede ser proporcionado un agonista de TACI en el que son detectados los anticuerpos antitumor endógenos. En realidad, pueden ser seleccionadas células B o células de plasma que expresen la inmunoglobulina de la superficie celular antitumoral, tal como por extensión, y ser transformadas con TACI para proporcionar una amplificación de su producción de anticuerpos.
- 10 Además de la amplificación de respuestas inmunes beneficiosas, los agonistas de TACI presentes, es decir, los ligandos y anticuerpos, pueden ser usados para sobreestimar a células, tales como a células tumorales de células B (mielomas múltiples, linfomas y leucemias), tumores de células T inmaduros (leucemias y timomas) y células auto-inmunes o inflamatorias e inducir la apoptosis en tales células, reduciendo o eliminando así el cáncer o la condición autoinmune/inflamatoria.
- 15 *Terapias para reforzar las respuestas inmunes celulares.* Aunque TACI sea encontrado en sólo un subconjunto de células T inmaduras, pueden ser transfectadas o transformadas *in vivo* o *ex vivo* células T maduras para expresar un receptor de TACI funcional, para amplificar las respuestas inmunes celulares. Preferiblemente, se seleccionan células infiltrantes tumorales para tal refuerzo, y se introducen de nuevo en el sujeto para luchar más enérgicamente contra el tumor.
- 20 *Métodos terapéuticos para antagonizar la actividad de TACI.* Como se ha discutido anteriormente, la presente descripción contempla inhibir la actividad de TACI por varios medios, incluyendo, pero no limitados a, el uso del dominio extracelular del extremo N-terminal libre; la expresión de un dominio extracelular no funcional que carece de un dominio de transducción de señal, por ejemplo, TACI del extremo N-terminal unido a GPI; el uso de tecnologías de antisentido o ribozimas para suprimir la expresión de TACI; el uso de ligandos antagonistas de TACI o anticuerpos.
- 25 La supresión de la actividad de TACI es útil para tratar respuestas inmunes indeseables, incluyendo enfermedades autoinmunes e inflamatorias, el rechazo de trasplantes, y la enfermedad de injerto contra huésped (GVH). Las enfermedades autoinmunes e inflamatorias incluyen la vasculitis inducida por complejo inmune [Cochrane, *Springer Seminar Immunopathol.*, 7:263 (1984)], glomerulonefritis [Couser *et al.*, *Kidney Inst.*, 29:879 (1985)], anemia hemolítica [Schreiber y Frank, *J. Clin. Invest.*, 51:575 (1972)], miastenia gravis [Lennon, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 147:973 (1978)]; Biesecker y Gómez, *J. Immunol.*, 142:2654 (1989)], artritis tipo II inducida por colágeno [Watson y Townes, *J. Exp. Med.*, 162:1878 (1985)]; rechazo de xenoinjerto alérgico e hiperagudo experimental [Knechtle, *et al.*, *J. Heart Transplant*, 4 (5):541 (1985); Guttman, *Transplantation*, 17:383 (1974); Adachi, *et al.*, *Trans. Proc.*, 19 (1):1145 (1987)]; artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (SLE).
- 30 En otra realización, en la que un cáncer de linfocitos tal como el mieloma, linfoma o la leucemia expresa TACI, y TACI contribuye al crecimiento del cáncer, el uso de un antagonista de TACI de la invención puede ser usado para suprimir el crecimiento celular del cáncer.
- 35 En consecuencia, puede ser introducido un componente de una composición terapéutica tal como un anticuerpo polivalente o monovalente de la presente descripción parenteralmente, transmucosalmente, por ejemplo, oralmente, nasalmente o rectalmente o transdérmicamente. Preferiblemente, la administración es parenteral, por ejemplo, vía la inyección intravenosa e incluye también, pero no está limitada a, la administración intra-arterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal.
- 40 En otra realización, el compuesto terapéutico puede ser administrado en una vesícula, en particular, un liposoma [véase Langer, *Science*, 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en "Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer", López-Berestein y Fidler (ed.), Liss: Nueva York, págs. 353-365 (1989); López-Berestein, *ibid.*, págs. 317-327; véase generalmente *ibid.*]. Para reducir sus efectos secundarios sistémicos, éste puede ser un método preferido para introducir TACI.
- 45

- 50 En aún otra realización, el compuesto terapéutico puede ser administrado en un sistema de liberación controlado. Por ejemplo, un agonista o antagonista contra la proteína de unión de la transmembrana de la presente invención, tal como un anticuerpo, pueden ser administrados usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, puede usarse una bomba [véase Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery*, 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 321:574 (1989)]. En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos [véase "Medical Applications of Controlled Release", Langer y Wise (ed.), CRC Press: Boca Raton, Fla. (1974); "Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance", Smolen y Ball (ed.), Wiley: Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23:61 (1983); véase también Levy *et al.*, *Science*, 228:190 (1985); During *et al.*, *Ana. Neurol.*, 25:351 (1989); Howard *et al.*, *J. Neurosurg.*, 71:105 (1989)]. En aún otra realización, puede ser colocado un sistema de liberación controlada en la proximidad del objetivo terapéutico, es decir, el cerebro, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica [véase, por ejemplo, Goodson, en "Medical Applica-
- 55

tions of Controlled Release”, *supra*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)]. Preferiblemente, se introduce un dispositivo de liberación controlada en un sujeto en la proximidad del sitio de activación inmune inapropiado o un tumor.

Otros sistemas de liberación controlada son discutidos en la revisión de Langer (*Science*, **249**:1527-1533 (1990)).

5 En un aspecto más, las células recombinantes que han sido transformadas con el gen de la proteína TACI y que expresa altos niveles del polipéptido pueden ser trasplantadas en un sujeto en necesidad de la proteína TACI. Células autólogas preferiblemente transformadas con la proteína TACI son trasplantadas para evitar el rechazo.

10 Los compuestos terapéuticos de la presente invención pueden ser administrados por rutas de administración intravenosas, intraarteriales, intraperitoneales, intramusculares o subcutáneas. De forma alternativa, estos compuestos, correctamente formulados, pueden ser administrados por administración nasal u oral. Un suministro constante de estos compuestos terapéuticos puede ser asegurado proporcionando una dosis terapéuticamente eficaz (es decir, una dosis eficaz para inducir los cambios metabólicos en un sujeto) en los intervalos necesarios, por ejemplo, a diario, cada 12 horas, etc. Estos parámetros dependerán de la severidad de la condición de la enfermedad que está siendo tratada, otras acciones, tales como la modificación de la dieta, que se pongan en práctica, el peso, la edad y el sexo del sujeto, y otros criterios, que pueden ser determinados fácilmente de acuerdo con la buena práctica médica estándar de los expertos en la técnica.

15 Un sujeto en quien la administración de estos agentes terapéuticos es un régimen terapéutico eficaz para una enfermedad inmunodeficiente, preferiblemente para un ser humano, pero puede ser para cualquier animal. Así, como puede ser fácilmente apreciado por cualquier experto ordinario en la técnica, los métodos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente adecuadas para la administración a cualquier animal, particularmente un mamífero, e incluyendo, pero en ningún caso limitado a, animales domésticos, tales como felinos o caninos, animales de granja, tales como, pero no limitados a, bovinos, equinos, caprinos, ovinos y porcinos, animales silvestres (tanto en el hábitat natural como en un jardín zoológico), animales de investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, etc., especie aviarias, tales como pollos, pavos, pájaros cantores, etc., es decir, para su uso médico veterinario.

25 Los Ejemplos siguientes son presentados para ilustrar más ampliamente las realizaciones preferidas de la invención. De ninguna forma deberían ser interpretados, sin embargo, como limitantes del alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones.

### Ejemplo

Señalización de calcio mediante un receptor de superficie de linfocitos mediada por CAML

#### 30 Introducción

La entrada de  $Ca^{2+}$  es un regulador clave de la activación de linfocitos estimulada por antígenos [Imboden *et al.*, *Immunol.*, **134**:663-665 (1985)]; [Crabtree y Clipstone, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**:1045-1083 (1994)]; [Weiss y Littman, *Cell*, **76**:263-274 (1994)]. La proteína CAML ha sido identificada como un regulador de la señalización de  $Ca^{2+}$  que es necesario, pero no suficiente para la activación del factor de transcripción de linfocitos, NF-AT (Bram y Crabtree, 1994, *supra*). La posición de CAML en las vesículas citoplásmicas es compatible con la regulación de la entrada de  $Ca^{2+}$  modulando la liberación del  $Ca^{2+}$  intracelular. En esta invención, se describe un nuevo receptor humano que interactúa con CAML expresado por los linfocitos B que actúa como una molécula de señalización de la superficie celular. Este receptor, TACI (transmembrana activadora e interactuante con CAML), inicia la activación dependiente de  $Ca^{2+}$  de NF-AT cuando reacciona con un anticuerpo. La señal puede ser bloqueada por un mutante negativo dominante de CAML. Como se muestra en este documento, la proteína TACI también puede activar por separado el factor de transcripción AP-1, proporcionando así ambas señales requeridas para la activación de linfocitos. La proteína TACI inicia un nuevo mecanismo de transducción de la señal que une directamente estimulaciones de la superficie celular hacia la molécula de señalización intracelular, CAML, y así define una nueva clase de receptores de superficie celular específicos de linfocitos que modulan la respuesta inmune. Además, la proteína TACI es una nueva herramienta que puede ser usada para regular el sistema inmunológico en una dirección positiva o negativa. TACI-1 es el homólogo humano de TACI ilustrado en el presente ejemplo.

#### Materiales y métodos

50 *Clonación molecular y rastreo.* Una genoteca de cADN de linfocitos B humanos se rastrea por el sistemas de dos híbridos [Fields & Song, *Nature*, **340**:245-246 (1989)]; [Durfee *et al.*, *Genes Dev.*, **7**:555-569 (1993)], con la región de codificación de CAML completa usada como cebo. El cADN de CAML humano es insertado en el vector de cebo de dos híbridos pAS1 de levadura. Esta construcción dirige la expresión de un dominio de unión de GAL4-ADN fusionado a la secuencia de la proteína entera de CAML. Una genoteca de linfocitos B en el pACT del plásmido es transformada en la levadura Y153 y los potenciales plásmidos interactuantes son identificados por el crecimiento de colonias en un medio que carece de histidina y que contiene 3-amino-triazol.

55 Un clon (TACI-1), de ocho positivos primarios fue identificado. El cADN de TACI-1 es subclonado en un plásmido de expresión de mamífero que añade un marcador de epítipo al extremo amino-terminal de la proteína expresada. Esta

construcción entonces es transfectada en la línea celular de linfocitos T Jurkat, células COS, o células NIH3T3. En cada caso, la expresión de la superficie celular de la proteína TACI es demostrada. La orientación de la proteína es con el extremo N-terminal hacia afuera de la célula, ya que el epítipo está disponible para la reacción con un anticuerpo específico incluso sin permeabilizar la membrana de la célula. Este resultado facilitó los estudios funcionales descritos en este documento.

El rastreo secundario se basó en la sobre-expresión forzada de clones positivos en células T Jurkat, y el ensayo para la activación de NF-AT. (Bram *et al.*, 1993, *supra*) Células T Jurkat transitoriamente transfectadas con la construcción TACI-1 marcada y el plásmido del indicador de NFAT se incuban en un medio que contiene el anticuerpo monoclonal específico de epítipo. Para maximizar la reticulación de TACI1, los anticuerpos están unidos a perlas antes de la adición a las suspensiones celulares. Después de una incubación de 24 horas, la actividad del indicador de NFAT es determinada. Una inducción drástica de la actividad del indicador de NFAT es encontrada cuando las células son estimuladas de esta manera. Las transfecciones de control sin la construcción TACI-1 no muestran la activación después de tal tratamiento. De la misma manera, la transfección de una molécula de la superficie celular no relacionada (CD8) seguido de la estimulación de anti-CD8 no activó a NFAT en estas células. El grado de activación fue del 70-80% de la estimulación máxima que se podría alcanzar en estas células T Jurkat por la adición de éster de forbol más ionomicina.

Después del rastreo de una transferencia Northern de tejido múltiple (Clontech) con cADN de TACI-1 (excindido a partir del vector de dos híbridos de levadura), se obtiene un clon de TACI-1 independiente de una genoteca de cADN de bazo fetal humano (Stratagene). La región codificante del extremo 5'-terminal es confirmada por la amplificación rápida de los extremos de cADN (RACE) usando una genoteca de cADN de bazo humano 'Marathon ready' (Clontech), cebadores específicos de TACI-1 anidados (5'-TCTGAATTGTTTTCAACTTCTC-3' y 5'-CAGCAGAGGATCCCAGTACTGCTC-3'), y polimerasa Pfu (Stratagene) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

*Antisuero.* Los cADN que codifican los 146 restos de aminoácido del extremo N-terminal de CAML y los 151 restos del extremo N-terminal de TACI-1 son cada uno clonados en un vector de expresión bacteriano GST-fusión (Pharmacia). Antisuero policlonal de conejo es generado contra las proteínas de GST-fusión purificadas [Smith y Johnson, *Gene*, **67**:31-40 (1988)], y los anticuerpos específicos se purifican por cromatografía de inmovilización sobre las proteínas purificadas acopladas a agarosa (Pierce), usando técnicas estándar. El anti-TACI-1 reticulado se prepara incubando anticuerpos anti-TACI-1 poligonales purificados por inmovilización con perlas magnéticas acopladas al anticuerpo de IgG anti-conejo (PerSeptive Diagnostics).

*Rastreo para identificar nuevos fármacos inmunodepresivos:* Células T Jurkat son transfectadas con un plásmido de expresión de TACI-1 y un plásmido de indicador de NF-AT. Las células T Jurkat expresan naturalmente el receptor de células T (TCR). Las células son estimuladas por la adición de anticuerpos contra TACI-1, anticuerpos contra TCR, o anticuerpos contra ambos. Los fármacos candidatos se mezclan con las células T Jurkat y se determina el efecto de estos fármacos.

El plásmido del indicador de NF-AT contiene al indicador de SEAP. Esta señal se usa para medir el grado de inhibición de la activación. El ensayo del indicador de SEAP es amplificado al ser realizado por un robot de rastreo. Los fármacos que bloquean la activación de TACI-1, pero no TCR como se mide por el ensayo de indicador de SEAP son identificados como que poseen una inhibición selectiva de la respuesta activada de TACI-1.

#### Resultados y discusión

Las proteínas que pueden interactuar con CAML se identifican usando un rastreo de dos híbridos (Fields y Song, 1989, *supra*); (Durfée *et al.*, 1993, *supra*) con CAML como cebo. Para determinar si alguna de estas proteínas de unión de CAML identificadas puede afectar a la señalización de  $Ca^{2+}$  en células T, se examina su capacidad de modular la actividad del  $Ca^{2+}$  - el factor de transcripción dependiente de NF-AT [Truneh *et al.*, *Nature*, **313**:318-321 (1985)]; [Verweij *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **265**:15788-15795 (1990)]; [Karttunen y Shastri, *Proc. Natl. Sci. USA*, **88**:3972-3976 (1991)]; [Emmel *et al.*, *Science*, **246**:1617-1620 (1989)]. La sobre-expresión forzada de los clones de dos híbridos en células T Jurkat revela que un clon (que codifica para la proteína TACI-1), sustituyó el requerimiento de la entrada de  $Ca^{2+}$ , implicando que TACI-1 se encuentra en la misma ruta de señal que CAML. El análisis de transferencia Northern para el mRNA de TACI-1 demuestra un mRNA de 1,4 kilobytes expresado sólo en el bazo, intestino delgado, timo y linfocitos de sangre periférica lo que sugiere una expresión limitada de TACI-1 (Figura 1). El modelo observado es compatible con la expresión de TACI-1 que está predominantemente en células de sangre periférica, ya que las células de la sangre periférica y, en particular, los linfocitos, pueden estar presentes en todos estos órganos (incluyendo las placas de Peyer que cubren el intestino delgado.) Además, no hay ninguna detección de la expresión en colon, testículo, ovario o próstata. Además, la proteína TACI-1 es detectada en todos los linfocitos B periféricos normales usando la tinción del anticuerpo específico. No hay ninguna proteína detectable expresada en los linfocitos T periféricos, monocitos o neutrófilos.

La determinación de la secuencia de ADN a partir de ambas cadenas del ADN aislado revela un marco de lectura abierto completo de 1325 pares bajos, que se predice que codifica una proteína de 293 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos deducida de TACI-1 (figura 2a) incluye una sola región hidrófoba (restos de 167 a 186) que tiene las

propiedades de un segmento que atraviesa la membrana (Figura 2b). El análisis de la secuencia de la proteína por el método de Sipos [Sipos y von Heijne, *Eur. J. Biochem.*, **213**:1333-1340 (1993)]; [Claros y von Heijne, *Comput. Appl. Biosci.*, **10**:685-686 (1994)], predice la exposición extracelular para el extremo N-terminal y la exposición citoplásmica para el extremo C-terminal. Aunque TACI-1 carezca de una secuencia señal del extremo N-terminal, la presencia de un codón de terminación corriente arriba indica que el marco de lectura abierto completo está contenido dentro del clon. TACI-1 es relativamente rico en restos de cisteína, pero no hay ninguna semejanza de la secuencia significativa u homología con cualquier otra proteína descrita. Una búsqueda de motivos Prosite en TACI-1 revela un extremo N-terminal del motivo TNFR\_NGFR [Bairoch, *Nucleic Acids Res.*, **21**:3097-3103 (1993)] (restos 33-71) a una supuesta región de transmembrana, que consiste en C-x(4,6)-[FYH]-x(5,10)-C-x(0,2)-C-x(2,3)-C-x(7,11)-C-x(4,6)-[DNEQSKP]-x(2)-C en la mitad del extremo N-terminal de la proteína. Este elemento es encontrado en un número de proteínas, algunas de las cuales son receptores para factores de crecimiento. Algunas de estas proteínas tienen una copia de este motivo. Una comparación de la secuencia de la proteína TACI-1 consigo misma revela una repetición significativa entre el motivo TNFR\_NGFR en los restos 33-66 y los restos 70-104. Este análisis llamó la atención por la presencia de dos dominios ricos en cisteína tipo TNFR que abarcan estas regiones que indican que TACI-1 es un miembro de la superfamilia de receptores TNFR. (Figura 2c)

Para confirmar que TACI-1 es una proteína transmembrana, fue examinada su expresión sobre células T Jurkat transfectadas con un plásmido que codificaba TACI-1 usando citometría de flujo. Las células transfectadas con TACI-1 muestran una tinción de la superficie con anticuerpos policlonales de conejo generados contra una proteína de fusión que incluye la parte de 12 kilodalton del extremo N-terminal de TACI-1 (Figura 3a). Pruebas adicionales de que TACI-1 se localiza en la superficie celular son derivadas de la microscopía de inmunofluorescencia, donde es observada la tinción de la superficie de células intactas transfectadas con un plásmido de expresión de TACI-1 marcado con el epítipo FLAG del extremo N-terminal (figura 3b). Ya que el extremo N-terminal de TACI-1 es extracelular en ausencia de una secuencia señal dividida, ésta es una proteína de transmembrana tipo III [Wilson-Rawls *et al.*, *Virology*, **201**:66-76 (1994)].

Para evaluar el efecto de TACI-1 sobre la actividad de NF-AT en células T, la proteína es transitoriamente expresada en células T Jurkat TAG con un indicador de fosfatasa alcalina secretado conducido por las secuencias de unión de NF-AT del promotor IL-2 (Bram y Crabtree, 1994, *supra*); [Fiering *et al.*, *Genes Dev.*, **4**:1823-1834 (1990)]; (Bram *et al.*, 1993, *supra*). La sobre-expresión de TACI-1 puede sustituir parcialmente el requerimiento de ionomicina en este ensayo. La adición de anticuerpos anti-TACI-1 a las células además aumentó la activación de NF-AT (más del doble, véase la Figura 4a), demostrando que TACI-1 responde a la reticulación en la superficie de la célula. El grado de activación de NF-AT varía en diferentes experimentos debido a la eficacia de la transfección, pero es típicamente el 40-50% de la respuesta máxima frente al tratamiento correspondiente de las células con PMA más ionomicina. La activación de NF-AT mediada por TACI-1 es dependiente de la calcineurina, como es demostrado por la pérdida de la actividad de NF-AT en presencia de fármacos inmunodepresivos, tales como ciclosporina A o FK506 [Friedman y Weissman, *Cell*, **66**:799-806 (1991)]; (Lui *et al.*, 1991, *supra*) (Figura 4b).

Para examinar el requerimiento de la entrada de  $Ca^{2+}$  en la activación de NF-AT mediada por TACI-1, el calcio extracelular puede ser eliminado por la adición de concentraciones crecientes de EGTA. Esto causa la inhibición de la activación de NF-AT mediada por TACI-1, como se ha demostrado antes para la activación mediada por el receptor de células T (Figura 4c). Como control, se examina el efecto de la expresión en las células, un mutante constitutivamente activo, independiente de calcio de calcineurina A [Hubbard y Klee, *Biochemistry*, **28**:1868-74 (1989)]; (O'Keefe *et al.*, 1992, *supra*); (Clipstone y Crabtree, 1993, *supra*). Como se esperaba, en estas células la activación de NF-AT es vista hasta en presencia de EGTA (Figura 4c). Así, en células T, TACI-1 media el aspecto dependiente de calcineurina de la activación de NF-AT iniciando la entrada del  $Ca^{2+}$  extracelular (más probablemente por la ruta de entrada de  $Ca^{2+}$  capacitativa después del agotamiento de los almacenamientos intracelulares [Putney y Bird, *Cell*, **75**:199-201 (1993)]; Hoth y Prenner, *Physiol.*, **465**:359-386 (1993)]; [Zweifach y Lewis, *Proc. Natl. Sci. USA*, **90**:6295-6299 (1993)]; [Premack *et al.*, *J. Immunol.*, **152**:5226-5240 (1994)].

La activación de NF-AT por CAML requiere la estimulación exógena de la proteína quinasa C por la adición del éster de forbol (Bram y Crabtree, 1994, *supra*). TACI-1 reticulado al anticuerpo, sin embargo, es capaz de activar NF-AT en ausencia de PMA o en ausencia de ionomicina (Figura 4b, barras negras). Los experimentos que examinan la activación de un indicador de AP-1 por la sobre-expresión de TACI-1 muestran que la activación de AP-1 es elevada (aprox. el cuádruple) en células T Jurkat transfectadas con TACI-1. Este efecto además puede ser realizado con la adición de anticuerpos anti-TACI-1 entrecruzados (figura 4d). Por lo tanto, TACI-1 inicia la entrada de  $Ca^{2+}$ , que a la vez activa la calcineurina, así como activa la ruta de AP-1 después de la estimulación, mediando así el cumplimiento de ambos requerimientos para la activación de NF-AT.

Una confirmación más de que TACI-1 interactúa con CAML puede ser demostrada por su interacción específica en un experimento de cambio inverso de dos híbridos (Durfee *et al.*, 1993, *supra*) (Figura 5a). Para definir los restos de aminoácidos críticos implicados en la interacción, los mutantes de delección tanto de TACI-1 como de CAML son analizados por su capacidad de asociarse físicamente (Figura 5a). El extremo C-terminal de 126 aminoácidos de TACI-1 es encontrado que es suficiente para unirse al extremo N-terminal de 146 aminoácidos de CAML. Pruebas adicionales de la asociación *in vivo* de TACI-1 con CAML son proporcionadas por experimentos en los cuales CAML de longitud completa y un mutante que comprende los 146 restos de aminoácidos del extremo N-terminal de CAML se co-immunoprecipitan con TACI-1 a partir de lisados celulares (Figura 5b). Por lo tanto, puede ser concluido que la

cola del extremo C-terminal citoplásmico de TACI-1 puede asociarse físicamente con la mitad del extremo N-terminal de CAML.

Para examinar si la señalización de TACI-1 depende de la asociación de TACI-1 con CAML, se analiza el dominio que interactúa con CAML (restos 1-146) para determinar si éste puede inhibir la activación de NF-AT inducida por TACI-1 en una manera dominante negativa. La cotransfección del plásmido de expresión del CAML (1-146) mutante elimina completamente la activación de NF-AT inducida por TACI-1 en células T Jurkat. Por otra parte, no hay ningún efecto inhibitorio sobre la actividad de NF-AT inducida por ionomicina más PMA, excluyendo así un efecto tóxico no específico. La co-expresión de CAML (1-146) tampoco influye en la acumulación de la proteína TACI-1 como se detecta por el análisis de inmunotransferencia Western (Figura 5c). CAML (1-146) carece de los dominios transmembrana hidrófobos que se requieren para la actividad de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  [Holloway y Bram, *Biol. Chem.*, **271**:8549-8552 (1996)]. De ahí que la eliminación de la actividad de inducción de NF-AT en estas células pueda ser atribuida a la unión del fragmento de CAML (1-146) a la parte del extremo C-terminal intracelular de TACI-1, previniendo la asociación con CAML de cadena entera endógeno.

CAML es una proteína de membrana integral localizada en vesículas citoplásmicas (Bram y Crabtree, 1994, *supra*). El análisis de mutantes de deleción ha mostrado que los dominios hidrófobos en la mitad del extremo C-terminal de la proteína son esenciales para la actividad (Holloway y Bram, 1996, *supra*), y que la mitad del extremo N-terminal hidrófila de la proteína puede tener un papel regulador. Los experimentos de digestión con tripsina además demostraron que la mitad del extremo N-terminal de la molécula es citoplásmica. En este documento, se demuestra que se requiere la interacción entre TACI-1 y CAML para la activación de NF-AT mediada por TACI-1 en células T Jurkat. Tomados juntos, estos datos indican que una interacción física entre TACI-1 en la membrana celular y las vesículas que contienen CAML intracelulares puede iniciar una señal de entrada de calcio (Figura 5d). Estas conclusiones proporcionan las primeras pruebas para la comunicación directa entre los receptores de la superficie celular y los orgánulos intracelulares en los linfocitos. Este mecanismo puede ser algo análogo al modelo del receptor de dihidropiridín-riánodina en células de músculo, en las cuales la estimulación de una molécula puede modular directamente la actividad de otra [Marty *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA*, **91**:2270-2274 (1994)]; [Sham *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA*, **92**:121-125 (1995)]; [Nakai *et al.*, *Nature*, **380**:72-75 (1996)].

Otras proteínas de la superficie celular han sido mostradas que activan la función de los linfocitos, incluyendo el receptor de células T CD3, CD2, CD20 y Thy-1. Estas proteínas no tienen ninguna homología de secuencia con TACI-1, y es probable que juegan papeles diferentes entre sí, tanto en términos de la respuesta frente a diferentes señales extracelulares, y/o en términos de la etapa del desarrollo de la expresión en linfocitos. TACI-1 también debe desempeñar un papel en la modulación de la función de los linfocitos en rutas alternativas y/o co-estimuladoras. Así, además de la definición de un nuevo mecanismo de señalización, TACI-1 es un nuevo receptor específico de linfocitos capaz de activar a las células T.

Lo siguiente es una lista de documentos relacionados con la descripción anterior y particularmente con los procedimientos experimentales y las discusiones.

1. Imboden, J. B., Weiss, A. y Stobo, J. D., *J. Immunol.*, **134**:663-5 (1985).
2. Crabtree, G. R. y Clipstone, N. A., *Annu. Rev. Biochem.*, **63**:1045-83 (1994).
3. Weiss, A. y Littman, D. R., *Cell*, **76**:263-74 (1994).
4. Bram, R. J. y Crabtree, G. R., *Nature*, **371**:355-8 (1994).
5. Fields, S. y Song, O., *Nature*, **340**:245-6 (1989).
6. Durfee, T., *et al.*, *Genes Dev.*, **7**:555-69 (1993).
7. Truneh, A., Albert, F., Golstein, P. y Schmitt, V. A., *Nature*, **313**:318-21 (1985).
8. Verweij, C. L., Guidos, C. y Crabtree, G. R., *J. Biol. Chem.*, **265**:15788-95 (1990).
9. Karttunen, J. y Shastri, N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:3972-6 (1991).
10. Sipos, L. y von Heijne, G., *Eur. J. Biochem.*, **213**:1333-40 (1993).
11. Claros, M. G. y von Heijne, G., *Comput. Appl. Biosci.*, **10**:685-6 (1994).
12. Bairoch, A., *Nucleic Acids Res.*, **21**:3097-103 (1993).
13. Wilson-Rawls, J., Deutscher, S. L. y Wold, W. S., *Virology*, **201**:66-76 (1994).
14. Fiering, S., *et al.*, *Genes Dev.*, **4**:1823-34 (1990).
15. Bram, R. J., Hung, D. T., Martin, P. K., Schreiber, S. L. y Crabtree, G. R., *Mol. Cell. Biol.*, **13**:4760-9 (1993).



16. Friedman, J. y Weissman, I., *Cell*, **66**:799-806 (1991).
17. Liu, J., *et al.*, *Cell*, **66**:807-15 (1991).
18. Hubbard, M. J. y Klee, C. B., *Biochemistry*, **28**:1868-74 (1989).
19. O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J. y O'Neill, E. A., *Nature*, **357**:692-4 (1992).
- 5 20. Clipstone, N. A. y Crabtree, G. R., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **696**:20-30 (1993).
21. Putney, J. W., Jr. y Bird, G. S., *Cell*, **75**:199-201 (1993).
22. Hoth, M. y Prenner, R., *J. Physiol. (Lond.)*, **465**:359-86 (1993).
23. Zweifach, A. y Lewis, R. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6295-9 (1993).
24. Premack, B. A., McDonald, T. V. y Gardner, P., *J. Immunol.*, **152**:5226-40 (1994).
- 10 25. Holloway, M. P. y Bram, R. J., *J. Biol. Chem.*, **271**:8549-52 (1996).
26. Marty, I., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:2270-4 (1994).
27. Sham, J. S., Cleemann, L. y Morad, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:121-5 (1995).
28. Nakai, J., *et al.*, *Nature*, **380**:72-5 (1996).
29. Smith, D. B. y Johnson, K. S., *Gene*, **67**:31-40 (1988).
- 15 30. Takebe, Y., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **8**:466-72 (1988).
31. Emmel *et al.*, *Science*, **246**:1617-1620 (1989).
32. Mattila *et al.*, *Emble J*, **9**:4425-33 (1990).

**Listado de secuencias**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: Bram, Richard J. von Bulow, Gotz
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: UN RECEPTOR DE SUPERFICIE DE LINFOCITOS QUE SE UNE A CAML, ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN EL MISMO Y SUS MÉTODOS DE USO
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 10
- (iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
  - (A) DESTINATARIO: David A. Jackson, Esq
  - (B) CALLE: 411 Hackensack Ave, Continental Plaza, 4º piso
  - (C) CIUDAD: Hackensack
  - (D) ESTADO: Nueva Jersey
  - (E) PAÍS: EE.UU.
  - (F) CP: 07601
- (v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:
  - (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
  - (B) ORDENADOR: Ordenador personal IBM compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: Patentln Release N° 1.0, Versión N° 1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
  - (A) NÚMERO DE SOLICITUD: EE.UU.
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 28-FEB-1997
  - (D) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
  - (A) NOMBRE: Jackson Esq., David A.
  - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 26.742
  - (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 1340-1-007
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:
  - (A) TELÉFONO: 201-487-5800
  - (B) TELEFAX: 201-343-1684

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 1377 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CATENARIEDAD: doble
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
  - (A) ORGANISMO: Homo sapiens
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

ES 2 552 095 T3

AGCATCCTGA	GTAATGAGTG	GCCTGGGCGG	GAGCAGGCGA	GGTGGCCGGA	GCCGTGTGGA	60
CCAGGAGGAG	CGCTTTCCAC	AGGGCCTGTG	GACGGGGGTG	GCTATGAGAT	CCTGCCCCGA	120
AGAGCAGTAC	TGGGATCCTC	TGCTGGGTAC	CTGCATGTCC	TGCAAAACCA	TTTGCAACCA	180
TCAGAGCCAG	CGCACCTGTG	CAGCCTTCTG	CAGGTCACTC	AGCTGCCGCA	AGGAGCAAGG	240
CAAGTTCTAT	GACCATCTCC	TGAGGGACTG	CATCAGCTGT	GCCTCCATCT	GTGGACAGCA	300
CCCTAAGCAA	TGTGCATACT	TCTGTGAGAA	CAAGCTCAGG	AGCCCAGTGA	ACCTTCCACC	360
AGAGCTCAGG	AGACAGCGGA	GTGGAGAAGT	TGAAAACAAT	TCAGACAACT	CGGGAAGGTA	420
CCAAGGATTG	GAGCACAGAG	GCTCAGAAGC	AAGTCCAGCT	CTCCCGGGGC	TGAAGCTGAG	480
TGCAGATCAG	GTGGCCCTGG	TCTACAGCAC	GCTGGGGCTC	TGCCTGTGTG	CCGTCTCTG	540
CTGCTTCCTG	GTGGCGGTGG	CCTGCTTCC	CAAGAAGAGG	GGGGATCCCT	GCTCCTGCCA	600
GCCCCGCTCA	AGGCCCCGTC	AAAGTCCGGC	CAAGTCTTCC	CAGGATCACG	CGATGGAAGC	660
CGGCAGCCCT	GTGAGCACAT	CCCCCGAGCC	AGTGGAGACC	TGCAGCTTCT	GCTTCCCTGA	720
GTGCAGGGCG	CCCACGCAGG	AGAGCGCAGT	CACGCCTGGG	ACCCCCGACC	CCACTTGTGC	780
TGGAAGGTGG	GGGTGCCACA	CCAGGACCAC	AGTCTGCAG	CCTTGCCAC	ACATCCCAGA	840
CAGTGGCCTT	GGCATTGTGT	GTGTGCCTGC	CCAGGAGGGG	GGCCCAGGTG	CATAAATGGG	900
GGTCAGGGAG	CGAAAGGAGG	AGGGAGAGAG	ATGGAGAGGA	GGGGAGAGAG	AAAGAGAGGT	960
GGGGAGAGGG	GAGAGAGATA	TGAGGAGAGA	GAGACAGAGG	AGGCAGAAAG	GGAGAGAAAC	1020
AGAGGAGACA	GAGAGGGAGA	GAGAGACAGA	GGGAGAGAGA	GACAGAGGGG	AAGAGAGGCA	1080
GAGAGGGAAA	GAGGCAGAGA	AGGAAAGAGA	CAGGCAGAGA	AGGAGAGAGG	CAGAGAGGGA	1140
GAGAGGCAGA	GAGGGAGAGA	GGCAGAGAGA	CAGAGAGGGA	GAGAGGGACA	GAGAGAGATA	1200
GAGCAGGAGG	TCGGGGCACT	CTGAGTCCCA	GTTCCAGTG	CAGCTGTAGG	TCGTATCAC	1260
CTAACCACAC	GTGCAATAAA	GTCCTCGTGC	CTGCTGCTCA	CAGCCCCCGA	GAGCCCCCTCC	1320
TCCTGGAGAA	TAAAACCTTT	GGCAGCTGCC	CTTCCTCAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAA	1377

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 293 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: extremo N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

ES 2 552 095 T3

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg  
 20 25 30  
 Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met  
 35 40 45  
 Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala  
 50 55 60  
 Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His  
 85 90 95  
 Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val  
 100 105 110  
 Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn  
 115 120 125  
 Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser  
 130 135 140  
 Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys  
 165 170 175  
 Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro  
 180 185 190  
 Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser  
 195 200 205  
 Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro  
 210 215 220  
 Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro  
 225 230 235 240  
 Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala  
 245 250 255  
 Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro  
 260 265 270  
 His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu  
 275 280 285  
 Gly Gly Pro Gly Ala  
 290

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 321 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

ES 2 552 095 T3

```

AAGAAGAGGG GGGATCCCTG CTCCTGCCAG CCCCCTCAA GGCCCCGTCA AAGTCCGGCC      60
AAGTCTTCCC AGGATCACGC GATGGAAGCC GGCAGCCCTG TGAGCACATC CCCCAGAGCCA      120
GTGGAGACCT GCAGCTTCTG CTTCCCTGAG TGCAGGGCGC CCACGCAGGA GAGCGCAGTC      180
ACGCCTGGGA CCCCAGACC CACTTGTGCT GGAAGGTGGG GGTGCCACAC CAGGACCACA      240
GTCCTGCAGC CTTGCCACA CATCCAGAC AGTGGCCTTG GCATTGTGTG TGTGCCTGCC      300
CAGGAGGGGG GCCCAGGTGC A                                                    321

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: extremo C-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

```

Lys Lys Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg
 1          5          10          15
Gln Ser Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser
 20          25          30
Pro Val Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe
 35          40          45
Pro Glu Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr
 50          55          60
Pro Asp Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr
 65          70          75          80
Val Leu Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val
 85          90          95
Cys Val Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala
 100          105

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 498 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

ES 2 552 095 T3

```

ATGAGTGGCC TGGGCCGAG CAGGCGAGGT GGCCGGAGCC GTGTGGACCA GGAGGAGCGC      60
TTTCCACAGG GCCTGTGGAC GGGGGTGGCT ATGAGATCCT GCCCCGAAGA GCAGTACTGG      120
GATCCTCTGC TGGGTACCTG CATGTCCTGC AAAACCATTT GCAACCATCA GAGCCAGCGC      180
ACCTGTGCAG CCTTCTGCAG GTCACTCAGC TGCCGCAAGG AGCAAGGCAA GTTCTATGAC      240
CATCTCCTGA GGGACTGCAT CAGCTGTGCC TCCATCTGTG GACAGCACCC TAAGCAATGT      300
GCATACTTCT GTGAGAACAA GCTCAGGAGC CCAGTGAACC TTCCACCAGA GCTCAGGAGA      360
CAGCGGAGTG GAGAAGTTGA AAACAATTCA GACAACCTCGG GAAGGTACCA AGGATTGGAG      420
CACAGAGGCT CAGAAGCAAG TCCAGCTCTC CCGGGGCTGA AGCTGAGTGC AGATCAGGTG      480
GCCCTGGTCT ACAGCACG                                     498
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 166 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: extremo N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

```

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1                               5 10 15
Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
 20 25 30
Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
 35 40 45
Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
 50 55 60
Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
 65 70 75 80
His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
 85 90 95
Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
 100 105 110
Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
 115 120 125
Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
 130 135 140
Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
 145 150 155 160
Ala Leu Val Tyr Ser Thr
 165
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 60 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

CTGGGGCTCT GCCTGTGTGC CGTCCTCTGC TGCTTCCTGG TGGCGGTGGC CTGCTTCCTC 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

Leu	Gly	Leu	Cys	Leu	Cys	Ala	Val	Leu	Cys	Cys	Phe	Leu	Val	Ala	Val
1			5					10						15	
Ala	Cys	Phe	Leu												
			20												

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN:/desc = "Cebador"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

TCTGAATTGT TTTCAACTTC TC 22

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
(A) DESCRIPCIÓN:/desc = "Cebador"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

CAGCAGAGGA TCCCAGTACT GCTC

24



**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido aislado que comprende un fragmento soluble del dominio extracelular de la proteína TACI como se representa en SEQ ID NO: 6; en el que dicho fragmento soluble comprende restos de aminoácidos 33-66 y 70-104 de SEQ ID NO: 2; y en el que dicho polipéptido aislado antagoniza la actividad de TACI.
- 5 2. Una proteína quimérica que comprende un primer dominio unido a un segundo dominio, en la que el primer dominio comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, y el segundo dominio es otra proteína.
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido se obtiene por unión de uno o más restos químicos.
4. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el resto químico es un polímero soluble en agua.
- 10 5. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5.
7. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.
- 15 8. Un método *in vitro* de fabricación de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende introducir un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6 en una célula huésped, en donde el polipéptido se expresa en la célula huésped.
9. Un método según la reivindicación 8, en donde el ácido nucleico se integra por recombinación, dando como resultado la expresión cromosómica del polipéptido.
- 20 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que comprende además purificar el polipéptido expresado.
11. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno inflamatorio, o para inhibir la activación de linfocitos en trastornos autoinmunes mediados por linfocitos.
- 25 12. Uso según la reivindicación 11, en el que dicho trastorno inflamatorio o trastorno autoinmune se selecciona de vasculitis inducida por complejo inmune, glomerulonefritis, miastenia gravis, y artritis de tipo II.
13. Uso según la reivindicación 11, en el que dicho trastorno inflamatorio o trastorno autoinmune es artritis reumatoide.
14. Uso según la reivindicación 11, en el que dicho trastorno autoinmune es lupus eritematoso sistémico.
- 30 15. Uso según la reivindicación 11, en donde dicho trastorno autoinmune se selecciona de rechazo de trasplantes, enfermedad del injerto contra el huésped (ICH), y rechazo agudo y alérgico de injertos.
16. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor de células B.
17. Uso según la reivindicación 16, en el que dicho tumor de células B se selecciona de mielomas múltiples, linfoma y leucemia.
- 35 18. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento de un tumor de células B o un trastorno inflamatorio, o para uso en inhibir la activación de linfocitos en trastornos autoinmunes mediados por linfocitos.

## Distribución de TACI en tejidos

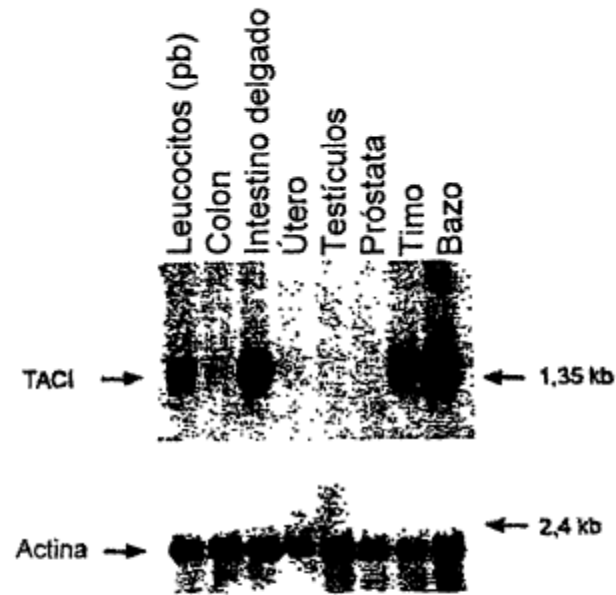


Figura 1

a.

MSGLGRSRAGGRSRVDQEERFPOGLWTGVAMRSCPEEQYM	40
DPLLGTMCSCXTICNHQSORTCAAFCRSLSCRKEQGKFYD	80
HLLRDCISCASICGQHPKQCAVFCENKLRSPVNLPPELRR	120
QRSGEVENNSDMSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQV	160
ALVYSTLGLCLCAVLCCFLVAVACFLKRGDPCSCQPRSR	200
PRQSPAKSSQDHAMEAGSPVSTSPVPVETCSFCFFECRAP	240
TQESAVTPTGTPDPTCAGRWGCHTRTTVLQPCPHIPDSGLG	280
IVCVPAQEGGPGA	293

b.



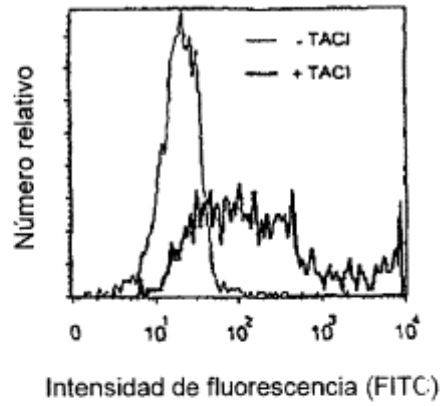
c.



Figura 2

TAC1 es una proteína de la superficie celular

a.



b.

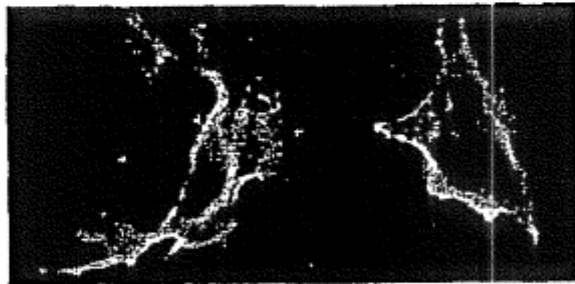


Figura 3

TAC1 es una proteína de señalización resultante de la activación de la transcripción específica de NF-AT

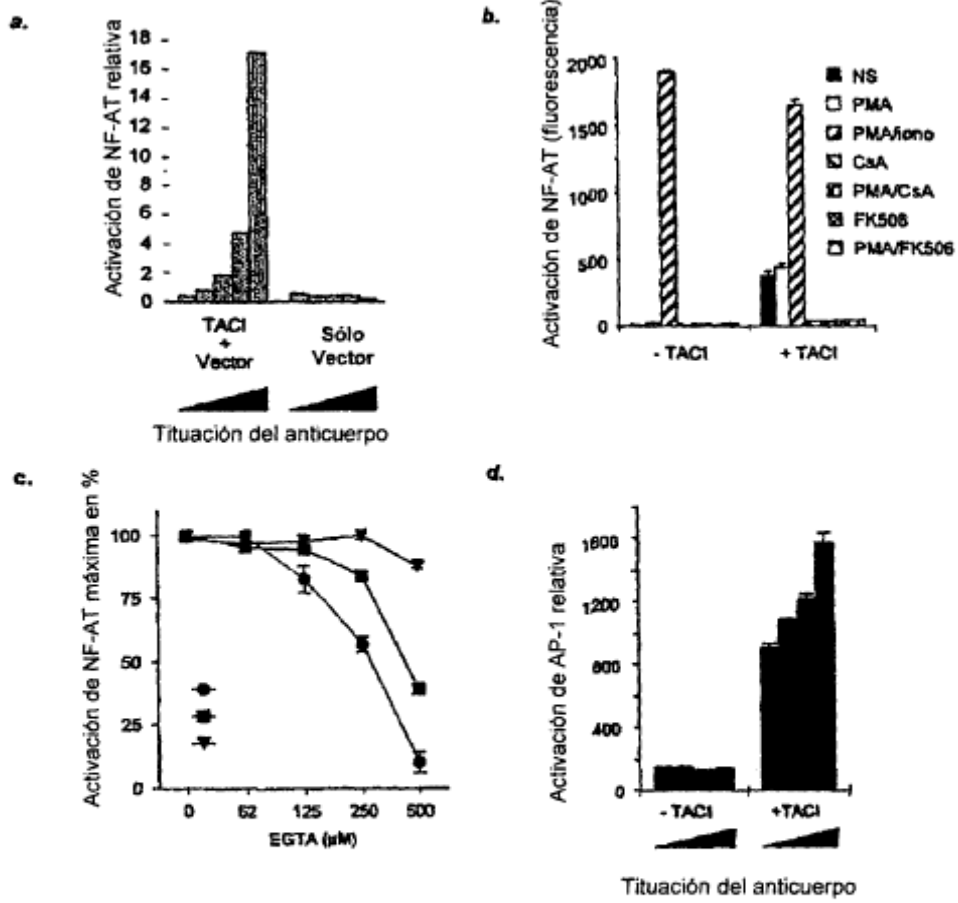


Figura 4

La interacción de TACI con CAML es crítica para la señalización de  $Ca^{2+}$

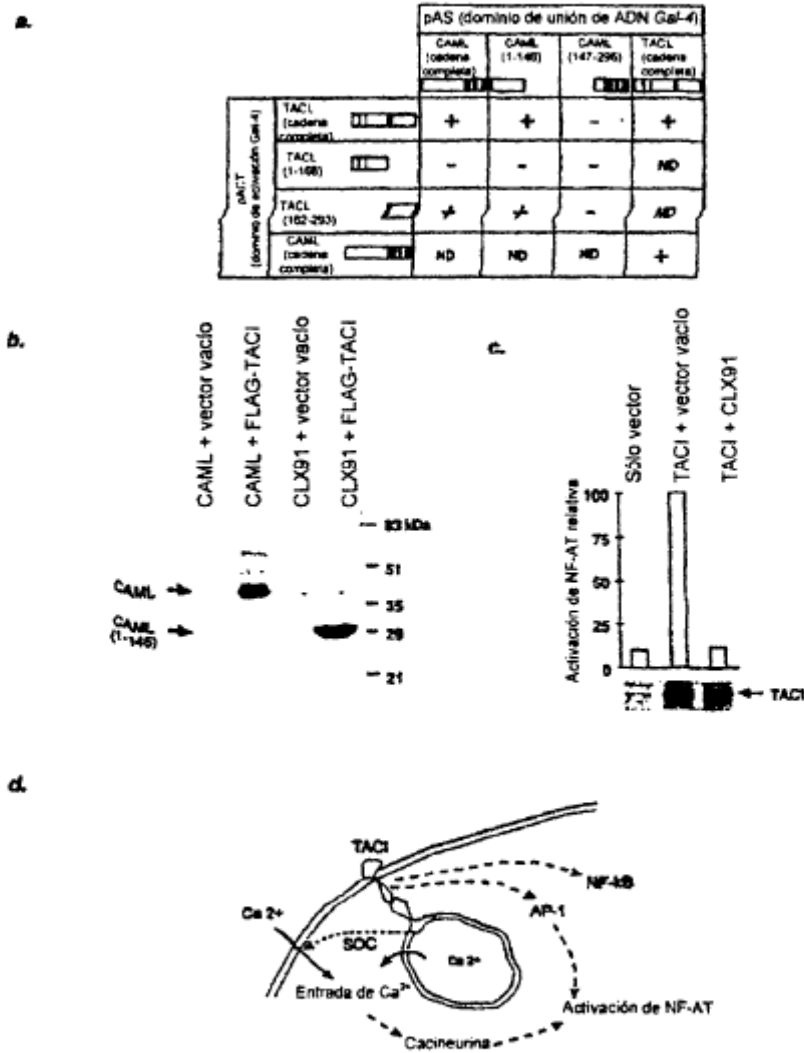


Figura 5