

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 858**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)  
**C12N 15/19** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 14/52** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.1999 E 07109688 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 1847608**

54 Título: **Miembro de la familia de ligandos de TNF**

30 Prioridad:

**23.12.1998 GB 9828628**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**FARROW, STUART NEVILLE;  
KAPTEIN, ALLARD;  
KITSON, JEREMY DAVID ALISDAIR y  
WINDER, ALISON JANET**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 621 858 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).

**DESCRIPCION**

Miembro de la familia de ligandos de TNF

La presente descripción proporciona lo siguiente:

1. Un anticuerpo que es específico para una proteína trimérica seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 a) una proteína trimérica que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y  
 b) una proteína trimérica que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos idéntica en un 98% a SEQ ID NO 1 y capaz de unirse a la células B;

para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, artritis reumatoide, inflamación o cáncer;

10 donde dicho anticuerpo es un antagonista de la unión de dicha proteína trimérica a su receptor en la línea celular RPMI 8866 del linfoma B

2. El anticuerpo según el punto 1, donde dicha proteína se expresa en una célula de mamífero.  
 3. El anticuerpo según el punto 2, donde la célula de mamífero es una célula HEK293T o HeLa.  
 4. El anticuerpo según cualquiera de los puntos anteriores el cual es un anticuerpo monoclonal.  
 5. El anticuerpo según cualquiera de los puntos anteriores el cual es un anticuerpo quimérico o humanizado.  
 15 6. El anticuerpo según cualquiera de los puntos anteriores donde dicho anticuerpo es un antagonista de la unión de una proteína trimérica que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a las líneas de células B RPMI8866, RPMI8226 y Raji.

20 La presente descripción se refiere a una nueva proteína de la superfamilia de ligandos de TNF, los nucleótidos que la codifican, los vectores y las células hospedadoras que la contienen y los métodos de selección de moduladores de la interacción entre dicha proteína y su receptor, estos moduladores se utilizan en la terapia de diversos trastornos que incluyen, pero no se limitan a, cáncer, inflamación, infección y enfermedades autoinmunes. También, se describe el uso directo de dicho ligando en terapias contra, por ejemplo, enfermedades virales o como adyuvante potencial en vacunas.

25 Actualmente se han clonado y publicado otros quince miembros de la familia de ligandos de TNF y se ha demostrado que la mayoría se une a los receptores de la superficie celular de la familia de los receptores de TNF. La interacción entre un ligando de TNF y su receptor es la señal clave para iniciar una cadena de acontecimientos que conducen a una serie de respuestas tan diversas como la proliferación de células T, la apoptosis y la inducción de la producción de citoquinas. Algunas actividades, tales como la inducción de la proliferación de células T, son comunes a muchos miembros de la familia, mientras que otras son compartidas sólo por unos pocos y otras son exclusivas.  
 30 La interacción entre estos ligandos y sus receptores proporciona una diana atractiva para el desarrollo de nuevas terapias.

35 La presente descripción describe una proteína aislada que comprende i) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 1 o ii) una variante del polipéptido de i). La descripción también describe una proteína aislada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se proporciona en la figura 2 o variantes de la misma. La proteína que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la figura 2 se puede obtener de humanos y es una proteína de membrana de tipo II con un único dominio transmembrana cerca del extremo N-terminal, que contiene dos sitios potenciales de N-glicosilación, y un sitio de escisión de proteasas entre los aminoácidos arginina 133 y alanina 134. El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la figura 1 es soluble y forma parte de la región extracelular del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos  
 40 proporcionada en la figura 2. La proteína puede comprender un polipéptido que tiene una homología del 65%, 75%, 80% o 90% con la secuencia de aminoácidos de la figura 1. La proteína puede comprender un polipéptido que tiene una homología de, al menos 95%, por ejemplo 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos de la figura 1. La proteína se puede obtener de mamíferos, por ejemplo de ratones o de humanos.

45 La presente descripción describe además una proteína que comprende un polipéptido que tiene la secuencia que se proporciona en la figura 2 desde el aminoácido 134 en adelante, o la secuencia que se proporciona en la figura 6 desde el aminoácido 127 en adelante.

La presente descripción describe además una proteína que comprende un polipéptido que tiene la secuencia que se proporciona en la figura 2 desde el aminoácido 122 en adelante.

50 La presente descripción describe además una proteína que comprende un polipéptido que tiene la secuencia que se proporciona en la figura 6 desde el aminoácido 195 en adelante.

- La presente descripción describe además una proteína aislada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se proporciona en la figura 5, o variantes de la misma. Por otra parte, la descripción describe una proteína aislada que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se proporciona en la figura 6 o variantes de la misma. La proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se proporciona en la figura 5 se puede aislar de ratones y es una proteína de membrana de tipo II con un único dominio transmembrana cerca del extremo N-terminal, esta proteína contiene un sitio potencial de N-glicosilación, y un sitio de escisión de proteasas entre los aminoácidos arginina 126 y alanina 127. El polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionado en la figura 5 es soluble, y forma parte de la región extracelular del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la figura 6.
- Las proteínas descritas en esta memoria que se pueden aislar de humanos, y las proteínas descritas en esta memoria que se pueden aislar de ratones son altamente homólogas, mostrando una identidad de aminoácidos del 67% de la secuencia completa. En la región C-terminal implicada en la unión al receptor, la identidad de aminoácidos es mucho mayor (87%). Una diferencia significativa entre las proteínas descritas en esta memoria que se pueden aislar de humanos o de ratones, es la presencia de un exón adicional en la secuencia de ratón que codifica 31 aminoácidos extra, lo que reduce la homología total entre las dos proteínas.
- El término variante se refiere a proteínas que tienen sustancialmente la misma funcionalidad biológica que la proteína para la que se ha proporcionado información en la secuencia. El término variante abarca fragmentos, derivados y análogos de la proteína de la descripción.
- Los fragmentos incluyen porciones de la proteína que conservan una identidad suficiente con la proteína original para ser eficaces, por ejemplo, en un cribado.
- Los derivados incluyen formas alternativas de la secuencia de la proteína que pueden tener deleciones, adiciones o sustituciones de uno o más aminoácidos. Un experto en la técnica entenderá que se pueden llevar a cabo determinadas sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, o bien pueden ocurrir de forma natural, sin alterar sustancialmente la función de la proteína.
- Los análogos incluyen, pero no están limitados a proteínas precursoras que pueden activarse por escisión de la proteína precursora para producir una proteína madura activa o una fusión con una secuencia líder o secretora que ayude a la purificación.
- La proteína de la presente descripción puede ser una proteína recombinante, una proteína natural o una proteína sintética.
- Las proteínas de la descripción pueden estar presentes en esta memoria en forma trimérica. Normalmente, las proteínas de la descripción se unirán a su receptor como un trímero, permitiendo así que dos o más moléculas del receptor se aproximen. Un trímero puede ser un heterotr trímero en el que este presente más de un tipo de subunidades, o un homotr trímero en el que todas las subunidades son iguales.
- La presente descripción también describe anticuerpos específicos para una proteína tal y como se define en las reivindicaciones. El término anticuerpo según se utiliza en este documento incluye todas las inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que contienen sitios de reconocimiento para determinantes antigénicos de las proteínas de la presente descripción. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, pueden ser moléculas de anticuerpos intactas o fragmentos que contienen la región de unión activa del anticuerpo, por ejemplo Fab o F(ab)<sub>2</sub>. También se describen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y anticuerpos humanizados y fusiones con moléculas que no son inmunoglobulinas. Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.
- Las proteínas de la descripción, sus variantes o células que las expresan se pueden utilizar como un inmunógeno para producir anticuerpos contra ellas. Los anticuerpos generados contra las proteínas de la descripción pueden obtenerse mediante inyección directa del polipéptido en un animal, por ejemplo, no humano. El anticuerpo obtenido de este modo se unirá entonces a la proteína misma. De esta manera, puede utilizarse incluso un fragmento de la proteína de la descripción para generar anticuerpos que se unan a la proteína nativa completa.
- Los anticuerpos se pueden utilizar para localizar la proteína de la descripción en el tejido que expresa esa proteína. También son útiles, por ejemplo, para la purificación de una proteína de la descripción, y en consecuencia se describe un método de purificación de una proteína de la descripción, método que comprende el uso de un anticuerpo descrito en esta memoria. Los anticuerpos de la presente descripción también se pueden usar como agentes terapéuticos como se define en las reivindicaciones.
- Un aspecto adicional de la descripción describe un polinucleótido aislado que codifica una proteína de la descripción. También se incluyen dentro de la descripción nucleótidos anti-sentido o cadenas complementarias. El nucleótido puede codificar una proteína de la descripción que puede aislarse a partir de ratón o de humano. El polinucleótido aislado puede comprender la parte de un polinucleótido que tiene la secuencia nucleotídica mostrada en la figura 3, que codifica el polipéptido mostrado en la figura 1, una variante de dicha porción, o una cadena complementaria. La presente descripción describe además un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos

mostrada en la figura 4, que codifica para el polipéptido de la figura 2.

La secuencia de nucleótidos se puede aislar de una célula (por ejemplo una célula humana), mediante cribado con una sonda derivada de la proteína de la descripción, o mediante otras metodologías conocidas en la técnica tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo sobre el ADN genómico con cebadores oligonucleotídicos apropiados derivados o diseñados basándose en la proteína de la descripción. Se puede generar una biblioteca de cromosomas artificiales bacterianos utilizando ADN de ratón o humano con fines de cribado.

Las secuencias de nucleótidos de la presente descripción pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, por ejemplo ADNc, ADN genómico y ADN sintético. La secuencia de nucleótidos puede ser ADNc. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o cadena no codificante (antisentido). La secuencia de codificación que codifica la proteína de la descripción puede ser idéntica a una de las secuencias de codificación establecidas en las figuras, o puede ser una secuencia codificante diferente que, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica la misma proteína que las secuencias mostradas en estas.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la presente descripción puede incluir: una secuencia que codifica la proteína o cualquier variante de la misma; una secuencia que codifica la proteína o cualquier variante de la misma y una secuencia de codificación adicional, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia de proproteína; una secuencia que codifica la proteína o cualquier variante de la misma (y opcionalmente la secuencia de codificación adicional) y secuencias no codificantes, tales como intrones o secuencias no codificantes 5' y/o 3' de la secuencia de codificación de la proteína de longitud completa.

La descripción también describe variantes de nucleótidos, análogos, derivados y fragmentos que codifican una proteína de la descripción. Se incluyen nucleótidos que pueden tener una identidad de al menos 65% a lo largo de su longitud completa con el nucleótido que tiene la secuencia de la figura 3. Las secuencias pueden tener una identidad de al menos 75% a lo largo de su longitud completa con el nucleótido que tiene la secuencia de la figura 3. Los polinucleótidos pueden mostrar una identidad de al menos 90%, por ejemplo 95%, 97%, 98% o 99% a lo largo de su longitud completa con el nucleótido que tiene la secuencia de la figura 3.

Las secuencias de nucleótidos de la descripción también pueden tener la secuencia codificante fusionada en marco con una o más secuencias marcadoras que permiten la purificación de la proteína de la presente descripción, tal como un epitopo FLAG, una secuencia myc o una señal secretora.

Las secuencias de nucleótidos de la presente descripción pueden emplearse para producir una proteína de la descripción mediante técnicas recombinantes. Así, por ejemplo la secuencia de nucleótidos puede incluirse en uno cualquiera de los diversos vehículos de expresión o vehículos de clonación, en particular vectores o plásmidos para la expresión de una proteína. Estos vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen los derivados de plásmidos bacterianos; ADN de fago; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago y ADN viral. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en el hospedador.

También se describe un vector que comprende una o más secuencias de nucleótidos descritas anteriormente. Los vectores son, por ejemplo, un vector de expresión, tal como un plásmido o un vector viral en el que se ha insertado un polinucleótido aislado de la descripción, en una orientación directa o inversa. El vector puede además comprender una o más secuencias reguladoras para dirigir la síntesis de ARNm, incluyendo, por ejemplo, un promotor, unido de forma operativa a la secuencia. Los promotores adecuados incluyen: los promotores CMV, LTR o SV40 y otros promotores conocidos que controlan la expresión de los genes en células procariontas o eucariotas o sus virus. El vector puede contener un potenciador y un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción.

Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores y promotores/potenciadores adecuados, pero cualquier plásmido o vector, promotor/potenciador pueden ser utilizados, siempre que sean replicables y funcionales en el hospedador.

Los vectores de clonación y los vectores de expresión apropiados para su uso con hospedadores procariontas y eucariotas incluyen vectores de expresión de mamífero, vectores de expresión de insectos, vectores de expresión de levaduras, vectores de expresión bacterianos y vectores de expresión de virus y se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY., (1989) Un vector puede ser pFLAG-CMV-1 o pcDNA3.

El vector también puede incluir secuencias apropiadas para la selección y/o amplificación de la expresión. Para esto, el vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos que se puedan seleccionar/amplificar. Estos marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica.

También están descritas células hospedadoras que comprenden un vector de la descripción, y que son capaces de expresar una secuencia de nucleótidos de la descripción. Las células hospedadoras pueden ser, por ejemplo, una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero o una célula eucariota inferior, tal como una célula de

levadura o una célula procariota, tal como una célula bacteriana. Los hospedadores procariotas adecuados para la transformación incluyen E. coli. Los hospedadores eucariotas adecuados incluyen células HEK293T y células HeLa.

También se pueden emplear sistemas de traducción sin células para producir tales proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN de la presente descripción.

- 5 Se pueden emplear métodos rutinarios para purificar la proteína de la descripción a partir de cultivos de células recombinantes. Estos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las proteínas y las secuencias de nucleótidos de la presente descripción se describen en una forma aislada. El término "aislado" pretende dar a entender que el material no se encuentra en su estado nativo. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos o la proteína de origen natural presente en un animal vivo están en su estado nativo y no están aisladas, pero la misma secuencia de nucleótidos o la proteína, separadas de alguno o de todos los materiales con los que coexisten en el sistema natural, están aisladas. Del mismo modo, una proteína que ha sido producida por métodos sintéticos, por ejemplo, por métodos recombinantes, está "aislada". Dicha secuencia de nucleótidos podría ser parte de un vector. Dicha secuencia de nucleótidos o proteína podría ser parte de una composición, y seguir estando aislada en dicho vector o composición que no son parte de su entorno natural. Las proteínas y secuencias de nucleótidos también pueden estar en forma purificada, y pueden estar purificadas por lo menos a menos del 50% de pureza, aproximadamente 75% de pureza, 90% de pureza o más, tal como 95%, 98% de pureza.

También se describe el uso de las proteínas de acuerdo con la descripción en métodos de cribado. Estos métodos identifican compuestos que actúan como moduladores de la interacción entre las proteínas de la descripción y sus receptores. En términos generales, este tipo de procedimientos de cribado comprende poner en contacto una proteína de la descripción, por ejemplo en forma trimérica, y su receptor en presencia o ausencia del compuesto de ensayo, y medir el aumento o disminución del nivel de unión, o el aumento o disminución de una respuesta, por ejemplo de la activación de NF- $\kappa$ B o de la activación de CD40, cuando el compuesto de ensayo está presente. Las proteínas de la descripción se pueden usar en cribados de alto rendimiento, lo que permite estudiar un gran número de compuestos. Los métodos de cribado de la descripción son generalmente conocidos para el experto en la técnica. También se describen aquellos compuestos identificados por medio de los métodos de cribado de la descripción por tener una actividad útil.

También se describen compuestos que son moduladores de la interacción entre una proteína de la descripción y su receptor para su uso en terapia, por ejemplo en inmunoterapia. Los compuestos se pueden utilizar en el tratamiento, por ejemplo, de enfermedades autoinmunes, inflamación y otras enfermedades asociadas con la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, por ejemplo, artritis reumatoide, inflamación neuronal, asma, en el tratamiento de cánceres, en el tratamiento de infecciones, tales como choque séptico y en el tratamiento de la aterosclerosis. Los compuestos pueden ser agonistas o antagonistas del receptor al cual se unen las proteínas de la descripción. Los compuestos incluyen, por ejemplo, aptámeros, polipéptidos y moléculas pequeñas.

También se describe el uso de compuestos que han sido identificados por medio de las técnicas de cribado de la descripción, para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o profilaxis de trastornos que es sensible a la modulación de la interacción entre la proteína de la descripción y su receptor.

También se describe un método de tratamiento de un trastorno que es sensible a la modulación de la interacción entre la proteína de la descripción y su receptor, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de un compuesto que se identifica por medio de las técnicas de cribado de la descripción, o una cantidad eficaz de la proteína de la descripción.

La proteína puede ser para uso en terapia, por ejemplo, para su uso en inmunoterapia, especialmente durante infecciones virales, como vacuna, o como un adyuvante de vacunas.

También se describe el uso de la proteína de la descripción en la preparación de un medicamento para uso en inmunoterapia, por ejemplo, durante infecciones virales o como adyuvante de vacuna.

- 45 También se describe un método de tratamiento de un trastorno que es sensible a un aumento de la cantidad de la proteína de la descripción, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de la proteína de la descripción.

La descripción también describe una secuencia de nucleótidos como se define en este documento, para uso en terapia génica o como vacuna, por ejemplo, para aumentar la producción de la proteína de la descripción en trastornos sensibles a un aumento del nivel de la proteína de la secuencia de la figura 1 o de la figura 2. Puede administrarse a un paciente dicho nucleótido como polinucleótido desnudo, en forma de un vector de expresión, como un plásmido, o con un vector viral que comprende dicho nucleótido o una célula que comprende dicho nucleótido o vector.

Las cadenas complementarias o antisentido de las secuencias de nucleótidos de la descripción también se pueden utilizar en terapia génica. Por ejemplo, una secuencia de ADNc o fragmentos de la misma se podrían usar en estrategias de terapia génica para regular por disminución la expresión de la proteína de la descripción. La

tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica mediante la formación de una triple hélice de ADN o de ARN antisentido, ambos procedimientos se basan en la unión de una secuencia de nucleótidos a ADN o a ARN.

5 Las técnicas adecuadas para introducir el polinucleótido o vector desnudo en un paciente incluyen la aplicación tópica con un vehículo apropiado. El polinucleótido desnudo o el vector pueden estar presentes junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Una técnica implica el bombardeo de partículas (que también se conoce como tecnología de "pistola de genes" y se describe en la patente de Estados Unidos US5371015). En la misma, se recubren partículas inertes (tales como perlas de oro) con un ácido nucleico, y se aceleran a una velocidad suficiente como para permitir que penetren en la superficie de un receptor (por ejemplo, la piel), por ejemplo por medio de la descarga a alta presión desde un dispositivo de proyección. (También se describen las partículas recubiertas con una molécula de ácido nucleico de la presente descripción, así como los dispositivos cargados con tales partículas.) Otros métodos de administración del ácido nucleico directamente a un receptor incluyen ultrasonidos, estimulación eléctrica, electroporación y microsiembra se describen en la patente de Estados Unidos US5697901.

15 Las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción también se pueden administrar por medio de vectores de administración especializados útiles en terapia génica. Se describen estrategias de terapia génica, por ejemplo en Verme et al., Nature 1997, 389: 239-242. Se pueden utilizar sistemas virales y no virales. Los sistemas basados en virus incluyen sistemas retrovirales, lentivirales, adenovirales, asociados a adenovirales, herpes virus y vaccinia virus. Los sistemas no basados en virus incluyen la administración directa de ácidos nucleicos y sistemas basados en liposomas.

20 Se puede administrar una secuencia de ácido nucleico de la presente descripción por medio de células transformadas. Estas células incluyen células recogidas de un sujeto. El polinucleótido o vector desnudo de la presente descripción se pueden introducir en dichas células *in vitro* y las células transformadas posteriormente pueden devolverse al sujeto. El polinucleótido de la descripción puede integrarse en un ácido nucleico ya presente en una célula mediante recombinación homóloga. Una célula transformada puede cultivarse *in vitro*, si se desea, y se pueden utilizar una o más células resultantes de la presente memoria. Las células se pueden administrar a un paciente en una zona apropiada, mediante técnicas quirúrgicas o microquirúrgicas conocidas (por ejemplo, injerto, microinyección, etc.)

25 También se describen composiciones que comprenden el polipéptido, polinucleótido, vector o célula transfectada de la descripción además de aquellas que se pueden administrar mediante pistola de genes. Por lo tanto, los polipéptidos de la presente descripción se pueden utilizar en combinación con un vehículo no estéril o estéril o con vehículos para uso con células, tejidos u organismos, tales como un vehículo farmacéutico adecuado para la administración a un sujeto. Estas composiciones comprenden, por ejemplo, un medio aditivo o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la descripción y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos vehículos pueden incluir, pero no se limitan a, una solución salina, una solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

30 También se describen envases y kits de diagnóstico y farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones anteriormente mencionadas. Adjunto a este contenedor o contenedores puede haber una indicación en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para la administración a humanos.

35 Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos de la presente descripción, tales como aquellos identificables por los métodos de cribado descritos anteriormente, se pueden emplear solos o en conjunción con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier forma eficaz conveniente incluyendo, por ejemplo, la administración por vía tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica, entre otras. Las composiciones farmacéuticas generalmente se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento o profilaxis de una indicación o indicaciones específicas. En general, las composiciones se administran en una cantidad de al menos aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal. En la mayoría de los casos se administrarán en una cantidad no superior a aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal por día. En la mayoría de los casos, la dosis es de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, diariamente. Se considerará que la dosificación óptima se determinará por métodos estándar para cada modalidad de tratamiento e indicación, teniendo en cuenta la indicación, la gravedad, la vía de administración, las complicaciones y similares.

40 En terapia o como profiláctico, el agente activo se puede administrar a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo como una dispersión acuosa estéril, por ejemplo isotónica.

55 Como alternativa, la composición puede formularse para una aplicación tópica, por ejemplo en forma de ungüentos, cremas, lociones, pomadas oculares, gotas para los ojos, gotas para los oídos, enjuague bucal, vendajes impregnados y suturas y aerosoles, y puede contener aditivos convencionales apropiados, incluyendo, por ejemplo, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco y emolientes en ungüentos y cremas. Estas

formulaciones tópicas también pueden contener vehículos convencionales compatibles, por ejemplo bases para cremas o pomadas, y etanol o alcohol oleico para lociones. Estos vehículos pueden constituir aproximadamente de 1% a aproximadamente 98% en peso de la formulación; más usualmente constituirán hasta aproximadamente 80% en peso de la formulación.

5 Para la administración a mamíferos, y particularmente a humanos, se piensa que el nivel de dosis diaria del agente activo será de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg, normalmente aproximadamente de 1 mg/kg. El médico en cualquier caso determinará la dosis real más adecuada para un individuo que variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplos del caso promedio. Puede haber, por supuesto, casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación mayores o menores.

10 También se describe un método de producción de una proteína de la descripción, método que comprende introducir en una línea celular apropiada un vector que comprende un polinucleótido como se define en el presente documento en condiciones adecuadas para obtener la expresión de la proteína.

También se describe un método de producción de trómeros que comprenden la proteína de la descripción, método que comprende introducir en una línea celular apropiada un vector que comprende un polinucleótido como se define en el presente documento, en condiciones adecuadas para obtener la expresión de la proteína, y permitir que la proteína producida forme trómeros.

15 Como se muestra en el ejemplo 6, la proteína descrita en esta memoria, se une a líneas de células B, tales como la línea celular del linfoma de Burkitt Raji, la línea celular B del linfoma ROMI 8866 y PRMI8826. Como se muestra en el ejemplo 7, en preparaciones de sangre completa, la proteína descrita en esta memoria se une sólo a las células B, no a las células T. Estos ejemplos confirman la presencia del receptor de la proteína descrita en esta memoria en las células B, y apoyan el papel de la proteína descrita en esta memoria en la regulación del sistema inmune y en las enfermedades que se describen anteriormente. Esto también está apoyado por el hecho de que la proteína descrita en esta memoria se expresa fuertemente en las células y tejidos del sistema inmune, como se muestra en el ejemplo 5.

20 Uno de los primeros acontecimientos inducidos por la mayoría de los miembros de la familia de ligandos de TNF es la activación de NF- $\kappa$ B. Mukhopadhyay et al. (Journal of Biological Chemistry Vol. 274, número 23, 04 de junio 1999, pág. 15978-15981) han demostrado que la proteína descrita en esta memoria puede activar NF- $\kappa$ B de una manera dependiente de la dosis y el tiempo. El rango de dosis utilizado fue de 1 pM a 1000 pM. El tratamiento de células con tan poca cantidad como 1 pM de la proteína descrita en esta memoria, produjo un incremento de la activación de NF- $\kappa$ B en comparación con las células no tratadas. La activación de este importante factor de transcripción sugiere que la proteína descrita en esta memoria puede estar implicada en la activación de las rutas inflamatorias. Las moléculas que modulan la interacción de la proteína descrita en esta memoria con su receptor serán, por tanto, capaces de modular la activación de NF- $\kappa$ B y por lo tanto serán útiles en cualquier enfermedad que responda a la modulación del nivel de actividad de NF- $\kappa$ B, por ejemplo enfermedades del sistema inmune, tales como enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide, inflamación neuronal y asma, y enfermedades proliferativas, como el cáncer. Mukhopadhyay et al. demuestran además que la activación de NF- $\kappa$ B en el mismo sistema puede ser inhibida por anticuerpos específicos de la proteína de la descripción. Según Mukhopadhyay et al., la proteína descrita en esta memoria se incubó con los anticuerpos específicos antes de ser utilizada para tratar las células. Al contrario que con el experimento anterior, se observó una reducción de la activación de NF- $\kappa$ B.

25 Se postula que la presencia del anticuerpo afecta a la unión de la proteína descrita en esta memoria a su receptor, impidiendo así la generación de una señal y por lo tanto la reducción de la activación de NF- $\kappa$ B. Estos hallazgos indican que en un cribado se pueden identificar otros compuestos, por ejemplo moléculas pequeñas, que modulen la interacción entre la proteína descrita en esta memoria y su receptor, y se pueden utilizar para modular la activación de NF- $\kappa$ B y otros efectos posteriores.

30 En el Ejemplo 9, los experimentos de localización cromosómica muestran que el gen que codifica la proteína descrita en esta memoria, se localiza en la región q33 del cromosoma humano 13. No se han localizado otros miembros de la familia del ligandos de TNF en esta región. Las anomalías en este locus se han caracterizado como el segundo defecto más frecuente en los linfomas de Burkitt (Berger et al. Genes Chromosomes Cancer. 1:115-118). También, como se muestra en el ejemplo 6, la proteína descrita en esta memoria se une fuertemente a la línea celular de linfoma de Burkitt Raji, y Schneider et al. (según se hace referencia anteriormente) han demostrado que la forma soluble de la proteína descrita en esta memoria se une fuertemente a otras líneas de células del linfoma de Burkitt tales como BJAB, Namalawa, Ramos y JIYOYE.

35 Mukhopadhy et al. (según se hace referencia anteriormente) han demostrado que la proteína descrita en esta memoria es capaz de inhibir el crecimiento de líneas de células tumorales humanas. La activación de NF- $\kappa$ B es una respuesta celular temprana que generalmente va seguida de efectos citotóxicos para las células tumorales. Mediante el tratamiento de diversas líneas celulares con la proteína descrita en esta memoria y examinando la viabilidad, los autores fueron capaces de demostrar que hay una disminución dependiente de la dosis, en la viabilidad de las células en presencia de la proteína descrita en esta memoria. Esto se demostró para una línea

celular de linfoma histiocítico humano, una línea celular de cáncer de próstata, una línea celular de cáncer de colon, una línea celular de carcinoma de cuello de útero y una línea celular de carcinoma de mama.

5 Estos hechos sugieren que la proteína descrita en esta memoria puede jugar un papel importante en la regulación del desarrollo tumoral, y que las moléculas que pueden modular la interacción de la proteína descrita en esta memoria con su receptor pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer. Además, la proteína descrita en esta memoria en sí misma, en su forma unida a la membrana o soluble, puede ser útil en el tratamiento del cáncer.

10 Schneider et al. (Journal of Experimental Medicine volumen 189, número 11, 7 de junio 1999 pág. 1747-1756) han demostrado que el crecimiento de células B se puede coestimular por la proteína de longitud completa descrita en esta memoria (es decir, la forma unida a la membrana), así como por la forma soluble de la proteína descrita en esta memoria. Por lo tanto ambas formas se pueden utilizar en terapia, o para establecer la base de un cribado de moléculas pequeñas que pueden modular la interacción entre la proteína descrita en esta memoria y su receptor.

Breve descripción de las figuras:

15 La figura 1 muestra la SEQ ID NO: 1 - la secuencia de aminoácidos de la forma humana soluble de la proteína descrita en esta memoria. Los sitios de unión al receptor se muestran en negrita, y los posibles sitios de N-glicosilación se marcan con un punto.

La figura 2 muestra la SEQ ID NO: 2 - la secuencia de aminoácidos de la forma de la proteína humana unida a la membrana descrita en esta memoria, que incluye la forma soluble de la SEQ ID N° 1. Las anotaciones son similares a las de la figura 1. La secuencia de transmembrana está subrayada.

20 La figura 3 muestra el la SEQ ID NO: 3 - la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, alineada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Las regiones de unión al receptor están enmarcadas, y los posibles sitios de N-glicosilación están marcados con un punto.

La figura 4 muestra la SEQ ID NO: 4 - la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, alineada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Las anotaciones son similares a las de la figura 3. La secuencia de transmembrana está subrayada.

25 La figura 5 muestra la SEQ ID NO: 5 - la secuencia de aminoácidos de la forma soluble de la proteína de ratón descrita en esta memoria. El sitio de N-glicosilación está marcado con un punto.

La figura 6 muestra la SEQ ID NO: 6 - la secuencia de aminoácidos de la forma unida a la membrana de la proteína de ratón descrita en esta memoria. Las anotaciones son similares a las de la figura 5. La región de transmembrana está subrayada.

30 La figura 7 muestra la SEQ ID NO: 7 - la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, alineada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. Las anotaciones son similares a las de la figura 5.

35 La figura 8 muestra la SEQ ID NO: 8 - la secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, alineada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Las anotaciones son similares a las de la figura 6.

La figura 9 muestra un alineamiento entre las formas el ratón y humanas de la forma de longitud completa de la proteína descrita en esta memoria. (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6).

La figura 10 muestra el análisis de la inducción de CD40 en presencia (sombreado) o ausencia (sin sombrear) de la forma humana soluble recombinante de la proteína descrita en esta memoria (A) o IL-4 (B).

40 La figura 11 muestra el análisis de transferencia de Northern de la expresión específica de tejido, de la proteína descrita en esta memoria, en un ratón normal (A) y en líneas celulares tumorales humanas (B). (B) los tejidos.

La figura 12 muestra el análisis de transferencia de Northern de la expresión específica de tejido, de la proteína descrita en esta memoria, en el tejido inmune relacionado (A) y en líneas celulares tumorales humanas (B).

45 La figura 13 muestra los datos de la unión de FLAG-sD7 (como se define en el ejemplo 3 a continuación). El área sombreada indica la unión a la línea celular del linfoma de células B RPMI 8866. En ausencia de FLAG-sD7 no se ve unión (línea de puntos).

La figura 14 muestra la unión del FLAG-sD7 a las células B CD19<sup>+</sup> (A) y a las células T CD3 + (B) en sangre completa, lo que demuestra la especificidad de la unión a las células B solamente.

50 La figura 15 muestra la filtración en gel de FLAG-sD7 recombinante, y el posterior análisis en SDS-PAGE de las fracciones de muestra que mostraron un contenido de proteína. Estos resultados indican que la forma soluble de la proteína descrita en esta memoria es capaz de trimerizar.

En los ejemplos: la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la figura 1 se denominará ligando D7 soluble y la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la figura 2 se denominará ligando D7.

5 Ejemplo 1: Uso del ligando D7 soluble en un cribado para identificar compuestos que modulan la interacción entre el ligando D7 y su receptor.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Se recubren placas Costar RIA/EIA de alta avidéz con 2 µg/ml de IgG de cabra anti-humano (Sigma 13382) en PBS durante la noche. El anticuerpo de recubrimiento se retira, y se bloquean las placas durante al menos 2 horas en PBS/BSA al 2% (p/v). Posteriormente las placas se lavan tres veces con PBS/ Tween20 al 0.1% (v/v).

10 Se añaden 100 µl del receptor Fc (1 µg/ml) en PBS/ BSA al 1% (p/v)/Tween 200 al 0,1% (v/v), y las placas se incuban durante 1 hora. Las placas se lavan cinco veces con PBS/ Tween20 al 0.1% (v/v).

Se añaden diluciones de biotina-ligando D7 soluble en PBS/BSA al 1% / Tween 20 al 0,1%, y las placas se incuban durante 1 hora. Las placas se lavan cinco veces con PBS/ Tween20 al 0.1% (v/v).

15 Se añada fosfatasa alcalina estreptavidina (1:1000) (Amersham RPN1234), y las placas se incuban durante 1 hora. Las placas se lavan cinco veces con PBS/Tween20 al 0.1% (v / v).

La unión se detecta usando soluciones amplificadoras de Life Technologies (19589-019).

Ejemplo 2: Un cribado basado en células para identificar compuestos que modulan la interacción entre el ligando D7 soluble y su receptor

20 Un protocolo general para el uso de un cribado basado en células para identificar compuestos que modulan la interacción entre el ligando D7 soluble y su receptor es el siguiente:

Una línea de células B que se sabe que une y responde al ligando D7, se trata con el ligando D7 humano soluble recombinante del ejemplo (por ejemplo, FLAG-shD7 como en el ejemplo a continuación) durante un tiempo definido. Las células se recogen, y se comprueba la respuesta (la respuesta posiblemente puede ser, proliferación, apoptosis, activación de NF-κB o producción de citoquinas). El ensayo permite determinar si la adición de compuestos inhibe la inducción de una respuesta en las células diana.

25 Un ejemplo específico es el siguiente:

Un ligando D7 soluble regula al alza CD40

30 Se cultivo la línea celular L3055 del linfoma de Burkitt sobre una capa de alimentación de células de fibroblastos fetales humanos (HFF515) en medio L3 (RPMI 1640 + 10% de suero Supreme + antibióticos). Las células HEK293 se cultivaron en OMEM suplementado con suero fetal de ternera al 10% y antibióticos. Las células L3055 se trataron con el medio de control (cuatro partes de medio L3 más una parte del sobrenadante de las células HEK 293T) o con medio sD7 (cuatro partes de medio L3 más una parte del sobrenadante celular de las células HEK293T recogida 24 horas después de la transfección transitoria con sD7) o con IL -4 (medio de control más 200 U/ml de IL-4 recombinante humana [Sigma]) y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Las células se recogieron y se lavaron una vez en tampón de unión, después se tiñeron con anti-CD40 de ratón anti-humano conjugado con FITC (Transduction Laboratories) a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron dos veces en el tampón de unión antes del análisis por citometría de flujo. Se observó la inducción de CD40 tras el tratamiento con sD7 durante 72 horas en comparación con el control. Este ensayo se repite en presencia de una molécula que inhibe o aumenta la inducción de la respuesta en las células diana, y se comparan los resultados. Se puede demostrar claramente la inhibición/incremento de la respuesta. El resultado final de la regulación al alza de CD40 es que las células B reciben la señal para el crecimiento y la diferenciación. Por lo tanto, este experimento apoya una función del ligando D7 en la gestión de la respuesta inmune, y en enfermedades del sistema inmune tales como la inflamación.

35 Ejemplo 3: Síntesis y purificación del ligando D7 soluble

45 Se genera el ácido nucleico que codifica el ligando D7 soluble humano (aminoácidos 133 a 285) por PCR utilizando el marco de lectura abierto de longitud completa clonado como molde.

El ácido nucleico que codifica el ligando D7 soluble humano se clonó en el vector pFLAG-CMV-1 (Kodak) (que contiene un promotor CMV, una secuencia líder de preprotripsina, un epítipo amino-terminal FLAG y una secuencia de adición de poliA de la hormona de crecimiento humana) para formar la construcción pFLAG -CMV-1-hsD7.

50 Se volvieron a suspender 5 x 10<sup>6</sup> células HEK 293T en 250 µl de citomix (KCl 120 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,6; Hepes 25 mM, pH 7,6; EGTA 2 mM, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; ATP 2 mM; glutatión 5 mM; pH ajustado con KOH) que contenía 25 µg de pFLAG-CMV-1-hsD7. La transfección se llevó a cabo mediante el uso de un Gene Pulser de BioRad (960 µF, 270V).

Después de la transfección, las células se dejaron en hielo durante 10 min, a continuación se transfirieron a un matraz de cultivo de tejido de 75 cm<sup>2</sup> que contiene 15 ml de medio (DMEM, FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina (5 µg/ml) y estreptomina (5 µg/ml)). El medio que contiene el ligando secretado se recogió 48 horas después y se aplicó a una columna de cromatografía de afinidad que contenía el anticuerpo anti-FLAG M2 conjugado con agarosa (Kodak).

Se lavó con una solución salina tamponada con Tris (pH 7,4) y las fracciones se eluyeron en tampón citrato 0,1 M (pH 2,5). Las fracciones se neutralizaron inmediatamente con 0,2 volúmenes de Tris.HCl 1M (pH 7,6).

Se identificaron las fracciones que contienen un ligando D7 humano soluble unido al epítipo FLAG (FLAG-hsD7) mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo anti-FLAG M2. Estas fracciones se agruparon y se concentraron usando una columna Centricon Plus-20 (NWML 5000) (Millipore). El ligando FLAG-hsD7 se almacenó a -70°.

#### Ejemplo 4: Síntesis y purificación del ligando D7

El marco de lectura abierta del ligando D7 humano se clona en el vector pcDNA3 (que contiene un promotor CMV y una señal de adición de poliA de la hormona de crecimiento bovino) para formar la construcción pcDNA3-HD7. El plásmido pcDNA3-HD7 se transfecta transitoriamente por electroporación en células HEK 293T (protocolo como en el ejemplo 3).

Las células se recogieron después de 48 h, y se homogeneizaron usando un homogeneizador Dounce en tres volúmenes de tampón de extracción de proteínas (Hepes 25 mM pH 7,4, Triton-X-100 al 0,5%, 1 tableta de cóctel inhibidor de proteasa "completo" (Boehringer Mannheim) por 50 ml de tampón). El ligando D7 se purifica mediante cromatografía de afinidad usando el anticuerpo anti-D7 conjugado con agarosa.

#### Ejemplo 5: Análisis de transferencia de Northern de la distribución tisular del ligando D7.

El ADNc que codifica para el ligando D7 humano se escindió de pcDNA3-HD7 (véase el ejemplo 4) con las enzimas de restricción BamH1 y Xba1. Este fragmento de ADNc se etiquetó con <sup>32</sup>P dCTP usando el sistema "ready-prime" de Amersham según el protocolo de los fabricantes. Una alícuota de 5µl de esta mezcla, se mezcló con 10 ml de solución ExpressHyb (Clontech 8015-1) y la mezcla resultante se incubó con una de las siguientes transferencias de Clontech: Ratón (7762-1), Human-1 (# 7760), línea celular de cáncer humano (# 7757) o sistema inmune humano II (# 7768-1); durante 2 horas a 65° C con agitación. A continuación se retiró la solución de la sonda y la transferencia se lavó sucesivamente con SSC x 2 (citrato sódico salino), SDS al 0,05% a temperatura ambiente durante tres períodos de 20 minutos. Esto fue seguido de un lavado con SSC al 0,1%, SDS al 0,1% a temperatura ambiente. A continuación, la transferencia se expuso a una película Kodak XAR-5 a -70° C durante 48 horas.

Los resultados del análisis de transferencia de Northern demuestran que el ARN del ligando D7 se expresa en corazón, pulmón, bazo, riñón y músculo esquelético, pero no en el cerebro, tanto en ratones (figura 11A) como en humanos (figura 11B). Una transferencia de tejidos relacionados con el sistema inmune demuestra una fuerte expresión del ARN del ligando D7 en bazo, ganglio linfático, timo, apéndice, médula ósea y leucocitos de sangre periférica (fig12A) lo que apoya su papel potencial como un regulador de las funciones del sistema inmune. El análisis de transferencia de Northern de una variedad de líneas celulares tumorales humanas muestra la expresión del ARN del ligando D7 en células HL-60 de leucemia promielocítica, pero no en una gama de otras líneas de células tumorales (figura 12B). La presencia del ligando D7 en una línea celular leucémica también es compatible con el hecho de que el ligando D7 está implicado en la regulación y trastornos del sistema inmune.

#### Ejemplo 6: Detección de la superficie celular de unión de FLAG-sD7

Se incubaron 10<sup>6</sup> células con 50 ng de ligando FLAG-hsD7 (véase el ejemplo 3) en un tampón de unión (PBS/FCS al 2,5%/azida de sodio al 0,1%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar una vez en tampón de unión, las células se incubaron con 1µg de anticuerpo anti-FLAG M2 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez en tampón de unión, luego se incubaron con 150 µg de anticuerpos anti-ratón conjugado con ficoeritrina durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados en tampón de unión, se realizó una citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo de mesa Coulter XL y se recogieron los datos de 10<sup>4</sup> células viables.

Los resultados de uno de estos experimentos se muestran en la figura 13. No se detectó ninguna señal significativa cuando se trataba alguna de las líneas ensayadas con el anticuerpo anti-FLAG M2 y con el anticuerpo secundario conjugado con R-ficoeritrina solamente, pero después de un tratamiento previo con FLAG-sD7, la señal mostraba claramente que FLAG-hsD7 se une a la línea celular de linfoma B RPMI 8866. Los experimentos con otras líneas celulares han mostrado que FLAG-hsD7 se une a otras dos líneas de células B (RPMI 8226 y Raji), pero no se une a las líneas de células T H9 y Jurkat, o las líneas de estirpe mielomonocítica HL-60, U937 o THP-1. Estos resultados muestran que el dominio extracelular del ligando D7 humano se une a las células B, lo que apoya su posible función en la regulación del sistema inmune, y también sugiere que la expresión del receptor D7 se restringe a las células B.

#### Ejemplo 7: Detección de la unión a la superficie celular de Flag-sD7 en sangre completa.

La sangre completa de voluntarios sanos se diluyó 1:10 con citrato de sodio al 3,8% (p/v). Se utilizaron 100 µl en cada ensayo de unión. La unión a la superficie celular de FLAG-sD7 se detectó como en el ejemplo 6, excepto que el segundo anticuerpo era una IgG anti-ratón conjugada Alexa 488 (Molecular Probes) y, después del lavado, las células se incubaron con 1µg de anti CD3 humano de ratón conjugado con PE (Becton Dickinson) o con anti CD19 humano de ratón conjugado con PE (Coulter-Immunotech). Este experimento confirma la especificidad de unión de FLAG-sD7 demostrada en el Ejemplo 6. En la figura 13 se puede observar que, aunque estaban presentes tanto células B como células T, FLAG-sD7 se une solo a las células B CD19<sup>+</sup> (figura 14 A), y no a las células T CD3<sup>+</sup> (figura 14 B). Esto confirma la especificidad de unión a las células B observada con las líneas celulares, y sugiere de nuevo que la expresión del receptor D7 se restringe a las células B.

10 Ejemplo 8: FLAG-sD7 es capaz de trimerizar.

Se fraccionó FLAG-sD7 recombinante purificada en una columna de Superose 12 (Pharmacia). Las proteínas se eluyeron en PBS y las fracciones (1 ml) se analizaron por inmunotransferencia usando el anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma). La columna se calibró con proteínas estándar: apoferritina (443 kDa), b-amilasa (200 kDa), ADH (150 kDa), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12,5 kDa). La figura 15 A muestra la elución de la columna. La figura 15 B muestra las fracciones que contenían los picos observados en la figura 15A aplicados en un SDS-PAGE. Los marcadores del SDS-PAGE se encuentran en el lado izquierdo, lo que indica que la proteína desnaturalizada se mueve hasta aproximadamente los 22 kDa. Los marcadores en la parte superior del gel son las proteínas estándar utilizadas para calibrar la columna y muestran que FLAG-sD7 eluye en las fracciones de filtración en gel correspondientes a un peso molecular de aproximadamente 70-25 kDa. Estos experimentos demuestran que FLAG-sD7 es capaz de ensamblarse correctamente como un homotrímero, con un peso molecular de aproximadamente 3 x 22 kDa.

Ejemplo 9: Mapeo FISH del ligando D7.

Los linfocitos aislados de sangre humana se cultivaron en un medio esencial mínimo (a-MEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10% y fitohemaglutinina a 37°C durante 68-72 horas. Los cultivos de linfocitos se trataron con BrdU (0,18 mg/ml Sigma) para sincronizar la población celular. Las células sincronizadas se lavaron tres veces con un medio sin suero para liberar el bloque y se volvieron a cultivar a 37°C durante 6 horas en a-MEM con timidina (2,5 µg/ml Sigma). Las células se recogieron y se prepararon portaobjetos utilizando procedimientos estándar, que incluyen un tratamiento hipotónico, fijación y sacado con aire.

Los portaobjetos se pusieron en el horno a 55° C durante 1 hora. Tras el tratamiento con ARNasa, los portaobjetos se desnaturalizaron en formamida al 70% en 2xSSC durante 2 minutos a 70° C, seguido de una deshidratación con etanol. La sonda de ADN D7-27, que es la longitud completa del ADNc de D7 como se muestra en la figura 4, más 150 nucleótidos de la región 5' no traducida y 50 nucleótidos de la región 3' no traducida, se biotiniló con dATP y las sondas se desnaturalizaron a 75° C durante 5 min en una mezcla de hibridación que consiste en formamida al 50% y sulfato de dextrano al 10%.

Las sondas se cargaron en los portaobjetos cromosómicos desnaturalizados. Después de hibridar durante la noche, los portaobjetos se lavaron, detectaron y amplificaron. Las señales FISH y las bandas DAPI se registraron por separado tomando fotografías, y se logró la asignación de los datos de mapeo FISH con las bandas cromosómicas, mediante la superposición de las señales FISH con las bandas de cromosomas DAPI. Las bandas DAPI mostraban que la señal se localiza en el cromosoma humano 13, y los resultados de FISH lo localizan además en la región q33.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que es específico para una proteína trimérica seleccionada del grupo que consiste en:
    - a) una proteína trimérica que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y
    - b) una proteína trimérica que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos idéntica en un 98% a la SEQ ID NO: 1 y capaz de unirse a las células B;
- 5 para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, artritis reumatoide, inflamación o cáncer; en donde dicho anticuerpo es un antagonista de la unión de dicha proteína trimérica a su receptor en la línea celular RPMI 8866 del linfoma B
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, donde dicha proteína se expresa en una célula de mamífero.
  - 10 3. El anticuerpo según la reivindicación 2, donde la célula de mamífero es una célula HEK293T o HeLa.
  4. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un anticuerpo monoclonal.
  5. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones el cual es un anticuerpo quimérico o humanizado.
  6. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones donde dicho anticuerpo es un antagonista de la unión de una proteína trimérica que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a las líneas de células B
- 15 RPMI8866, RPMI8226 y Raji.

**FIG. 1**

Seq ID No. 1

RAVQGPEET

VTQDCLQLIAD**SETPTIQKGSYTFVPWLLS**

**FKRGSAALEEKENKILVKETGYFFIYGQVLY**

TDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTFR

•

CIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDGLQL

AIPRENAQ**ISLDGD**VTFFGALKLL

**FIG. 2**

Seq ID No. 2

MDDSTEREQSRLTSCLKKREE

MKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAAT

LLLALLSCCLTVVSFYQVAALQGDLASLRA

ELQGHHAEKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAG

•

LKIFEPPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGPEET

VTQDCLQLIAD**SETPTIQ**KGSYTFVP**WLLS**

**FKRGS**ALEEKENKIL**VKET**GYFFIYGQVLY

TDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFR

•

CIQNPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDGLQL

AIPRE**NAQISLDGD**VTFFGALKLL

FIG. 3

Seq ID No. 3

```

                                cgtgccggttcagggtccagaagaa
                                R A V Q G P E E
acagtcactcaagactgcttgcaactgattgcagacagtgaaacaccaactatacaaaaa
T V T Q D C L Q L I A D S E T P T I Q K
ggatcttacacatttggccatggcttctcagcttbaaaaggggaagtgccctagaagaa
G S Y T F V P W L L S F K R G S A L E E
aaagagaataaaaatattggtcaaagaaactgggttacttttttatatatggtcagggttta
K E N K I L V K E T G Y F F I Y G Q V L
tatactgataagacctacgccatgggacatctaattcagaggaagaagggtccatgtcttt
Y T D K T Y A M G H L I Q R K K V H V F
ggggatgaattgagtctggtgactttgtttcgatgtattcaaaatagcctgaaacacta
G D E L S L V T L F R C I Q N M P E T L
cccaataattcctgctattcagctggcattgcaaaactggaagaaggagatggactcaa
P N N S C Y S A G I A K L E E G D G L Q
cttgcaataccaagagaaatgcacaaatatactggatggagatgtcacatttttgggt
L A I P R E N A Q I S L D G D V T F F G
gcattgaaactgctgtga
A L K L L -

```

FIG. 4

Seq ID No. 4

atggatgactccacagaaagggagcagtcacgccttacttcttgccttaagaaaagagaa  
M D D S T E R E Q S R L T S C L K K R E  
gaaatgaaactgaaggagtgtgtttccatcctcccacggaaggaaagcccctctgtccga  
E M K L K E C V S I L P R K E S P S V R  
tcctccaaagacggaaagctgctggctgcaacottgctgctggcactgctgtcttctgtgc  
S S K D G K L L A A T L L L A L L S C C  
ctcacgggtggtgtctttctaccaggtggccgcccctgcaaggggacctggccagcctccgg  
L T V V S F Y Q V A A L Q G D L A S L R  
gcagagctgcagggccaccacgcggagaagctgccagcaggagcaggagcccccaggcc  
A E L Q G H H A E K L P A G A G A P K A  
ggcctggaggaagctccagctgtcaccgcgggactgaaaaatctttgaaccaccagctcca  
G L E E A P A V T A G L K I F E P P A P  
ggagaaggcaactccagtcagaacagcagaaaataagcgtgcccgttcagggccagaagaa  
G E G N S S Q N S R N K R A V Q G P E E  
acagtcactcaagactgcttgcactgattgcagacagtgaaacaccaactatacaaaaa  
T V T Q D C L Q L I A D S E T P T I Q K  
ggatcttacacatttgttccatggcttctcagctttaaaaggggaagtgccctagaagaa  
G S Y T F V P W L L S F K R G S A L E E  
aaagagaataaaaatattgtcaaagaaactgggttactttttatataatggtcagggttta  
K E N K I L V K E T G Y F F I Y G Q V L  
tatactgataagacctacgccatgggacatctaattcagaggaagaaggtccatgtcttt  
Y T D K T Y A M G H L I Q R K K V H V F  
gggatgaattgagtctggtgactttgtttcgatgtattcaaaatagcctgaaacacta  
G D E L S L V T L F R C I Q N M P E T L  
ccaataattcctgctattcagctggcattgcaaaactggaagaaggagatggactccaa  
P N N S C Y S A G I A K L E E G D G L Q  
cttgcaataccaagagaaatgcacaaatatcactggatggagatgtcacattttttggt  
L A I P R E N A Q I S L D G D V T F F G  
gcattgaaactgctgtga  
A L K L L -

FIG. 5

Seq ID No. 5

IIQDCLQLI

ADSDTPTIRKGYTFVPWLLSFKRGNAL EEKENKIVVR

QTGYFFIYSQVLYTDPIFAMGHVIQRKKVHVFGDELSL

•  
VTLFRCIQNMPKTLPNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIP

RENAQISRNGDDTFFGALKLL

**FIG. 6**

Seq ID No. 6

MDESAKTLPPPCLCFCSEKGED

MKVGYPDITPQKEEGAWFGICRDGRLLAATLLALLSS

SFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSATPAAAGA

PELTAGVKLLTPAAPRPHNSSRGHRNRRRAFQGPEETEQ

DVDLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNIIQDCLQLI

ADSDTPTIRKGTYTFVPWLLSFKRGNALEEKENKIVVR

QTGYFFIYSQVLYTDPIFAMGHVIQRKKVHVFGDELSL

•

VTLFRCIQNMPKTLPNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIP

RENAQISRNGDDTFFGALKLL

# FIG. 7

Seq ID No. 7

```
atcattcaagactgtctgcagctgattgcagacagcgcacacgccg
  I I Q D C L Q L I A D S D T P
actatacgaaaaggaacttacacatttgttccatggcttctcagctttaaagaggaaat
  T I R K G T Y T F V P W L L S F K R G N
gccttggaggagaaagagaacaaaatagtggtgaggcaaacaggctatcttctcatctac
  A L E E K E N K I V V R Q T G Y F F I Y
agccaggttctatacacggaccccatcttggctatgggtcatgtcatccagaggaagaaa
  S Q V L Y T D P I F A M G H V I Q R K K
gtacacgtctttggggacgagctgagcctgggtgaccctgttccgatgtattcagaatag
  V H V F G D E L S L V T L F R C I Q N M
cccaaaacactgcccaacaattcctgctactcggctggcatcgcgaggctggaagaagga
  P K T L P N N S C Y S A G I A R L E E G
gatgagattcagcttgcaattcctcgggagaaatgcacagatttcacgcaacggagacgac
  D E I Q L A I P R E N A Q I S R N G D D
accttcttgggtgccctaaaactgctgtaa
  T F F G A L K L L -
```

FIG. 8

Seq ID No. 8

atggatgagtcctgcaaagaccctgccaccaccgtgcctctgtttttgctccgagaaagga  
M D E S A K T L P P P C L C F C S E K G  
gaagatatgaaagtgggatatgatcccatcactccgcagaaggaggagggtgcctgggtt  
E D M K V G Y D P I T P Q K E E G A W F  
gggatctgcagggatggaaggctgctggctgctaccctcctgctggccctgttgtccagc  
G I C R D G R L L A A T L L L A L L S S  
agtttcacagcgatgtccttgtaccagttggctgccttgcaagcagacctgatgaacctg  
S F T A M S L Y Q L A A L Q A D L M N L  
cgcattggagctgcagagctaccgaggttcagcaacaccagccgccgggggtgctccagag  
R M E L Q S Y R G S A T P A A A G A P E  
ttgaccgctggagtcactcctgacgccggcagctcctcgacccccacaactccagccgc  
L T A G V K L L T P A A P R P H N S S R  
ggccacaggaacagacgcgctttccagggaccagaggaacagaacaagatgtagacctc  
G H R N R R A F Q G P E E T E Q D V D L  
tcagctcctcctgcaccatgctgctggatgccgccattctcaacatgatgataatgga  
S A P P A P C L P G C R H S Q H D D N G  
atgaacctcagaaacatcattcaagactgtctgcagctgattgcagacagcgacacgccg  
M N L R N I I Q D C L Q L I A D S D T P  
actatacgaaaaggaacttacacatttggttccatggcttctcagctttaaagagggaat  
T I R K G T Y T F V P W L L S F K R G N  
gccttggaggagaaagagaacaaaatagtggtgaggcaaacaggctatttcttcatctac  
A L E E K E N K I V V R Q T G Y F F I Y  
agccaggttctatacacggaccccatcttggctatgggtcatgtcatccagaggaagaaa  
S Q V L Y T D P I F A M G H V I Q R K K  
gtacacgtctttggggacgagctgagcctgggtgacctgttccgatgtattcagaatag  
V H V F G D E L S L V T L F R C I Q N M  
cccaaaacactgcccaacaattcctgctactcggctggcatcggcaggctggaagaagga  
P K T L P N N S C Y S A G I A R L E E G  
gatgagattcagcttgcaattcctcgggagaatgcacagatttcacgcaacggagacgac  
D E I Q L A I P R E N A Q I S R N G D D  
accttctttgggtgcctaaaactgctgtaa  
T F F G A L K L L -

```

RATÓN 1 MDESAKTLPPCLCFCSEKGEDMKVGYDPITPQKEEGAWFGICRDGRLLA 50
      ||:| . | | .| |:||. :.| :||:||||
HUMANO 1 MDDSTER.EQSRLTSCCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGLLA 49
      .
      .
      .
51 ATLLALLSSSFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSATPAAAGAPE 100
      ||||| || | .| ||.|||| || .|| ||| : || ||||.
50 ATLLALLSCCLTVVSPFYQVAALQGDLASLRAELQGHHAEKLPAGAGAPK 99
      .
      .
      .
101 .....LTAGVKLLTPAAPRPHNSSRGHRNRRAFQGPEETE QDVDLSA 142
      .|||. |: | || |||. ||:| |||||
100 AGLEEPAVTAGLKIFEPPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGPEET..... 141
      .
      .
      .
143 PPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNIIQDCLQLIADSDTPTIRKGTYTFVPW 192
      : ||||| ||||: |||. ||. |||||
142 .....VTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPW 168
      .
      .
      .
193 LLSFKRGNAL EEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTDP IFAMGHVIQRKKVH 242
      |||||. ||||| |||. |: ||||| ||||| : |||. |||||
169 LLSFKRGSAL EEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVH 218
      .
      .
      .
243 VFGDELSLVTLFRCIQNMPKTL PNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIPRENA 292
      ||||| ||||| |||||. ||||| ||||| : ||||| : |||||
219 VFGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDGLQLAIPRENA 268
      .
      .
      .
293 QISRNGDDTFFGALKLL* 310
      ||| .|| |||||
269 QISLDGDVTFFGALKLL* 286

```

FIG. 9

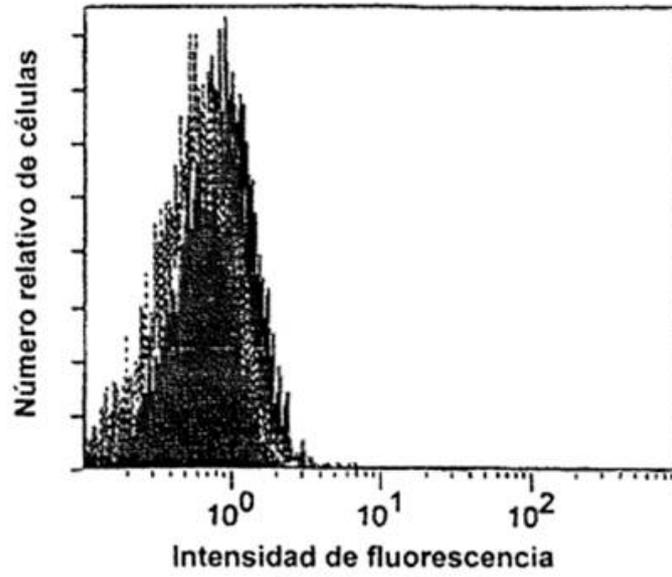


FIG. 10A

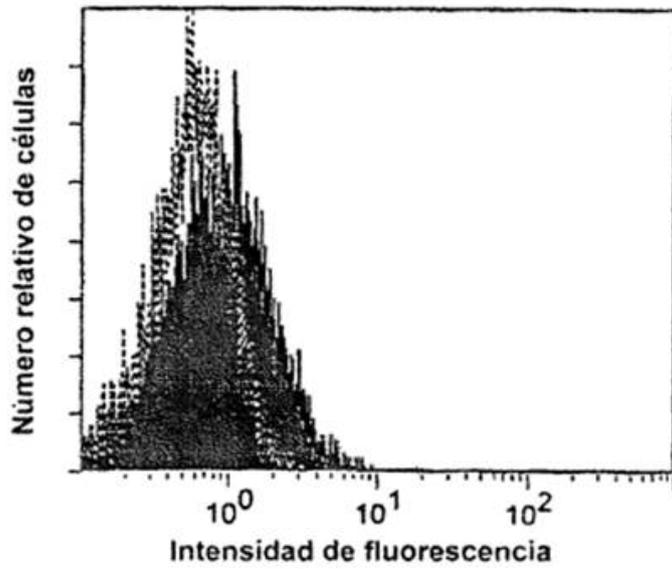


FIG. 10B

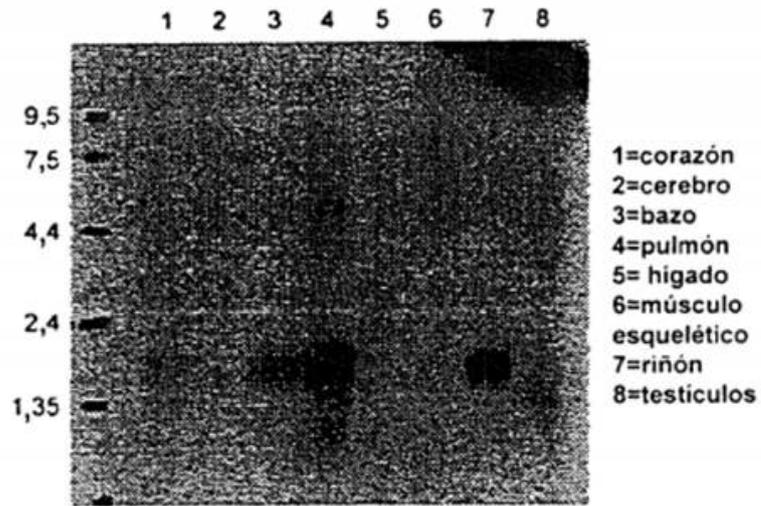


FIG. 11A

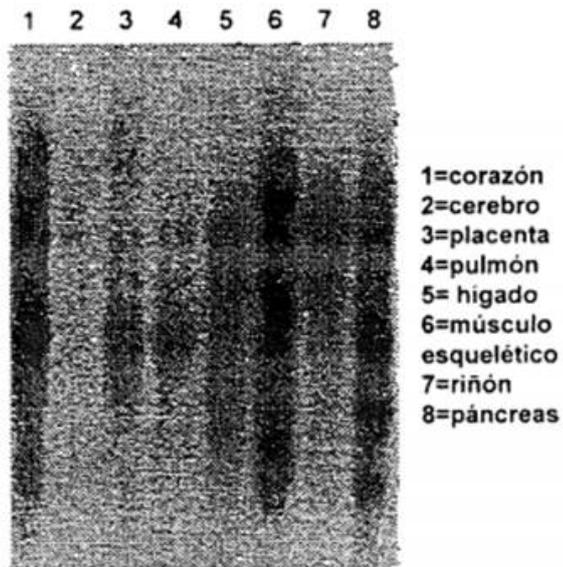


FIG. 11B

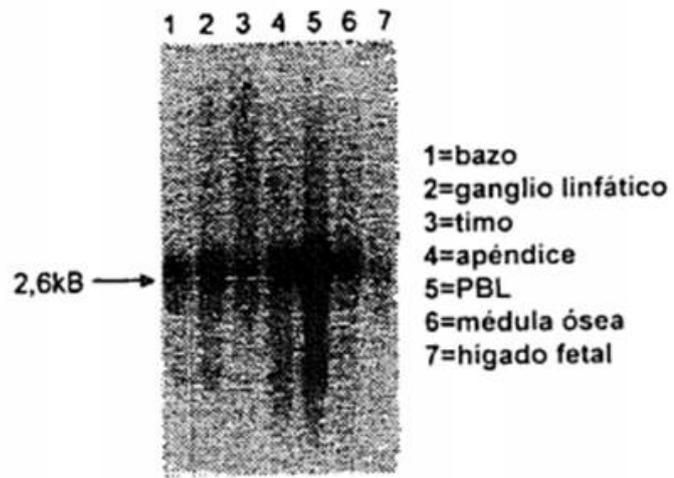


FIG. 12A

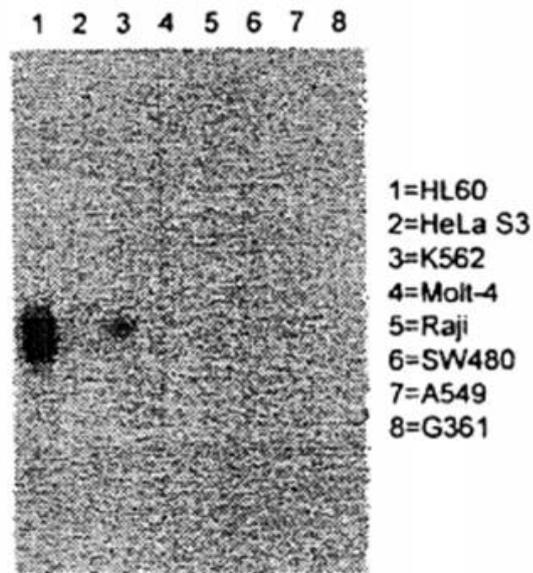


FIG. 12B

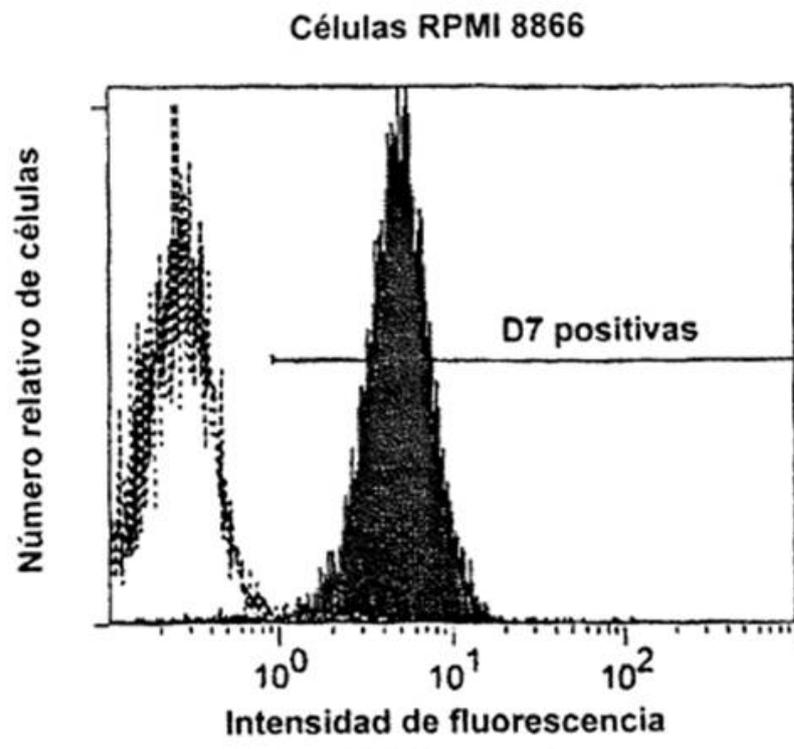


FIG. 13

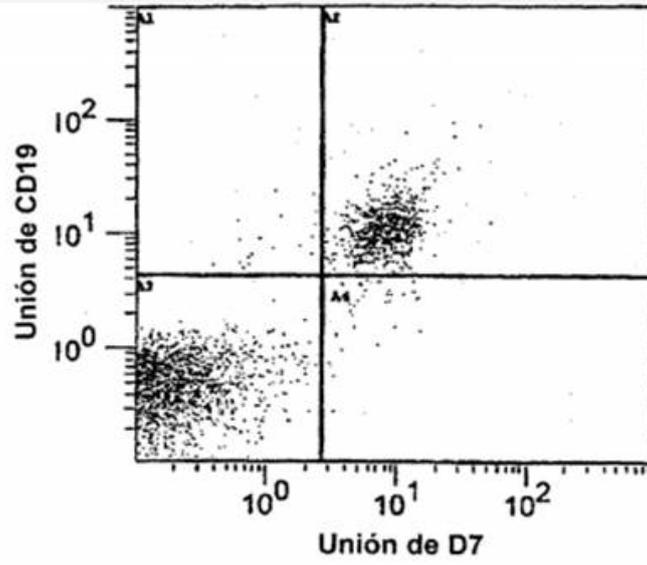


FIG. 14A

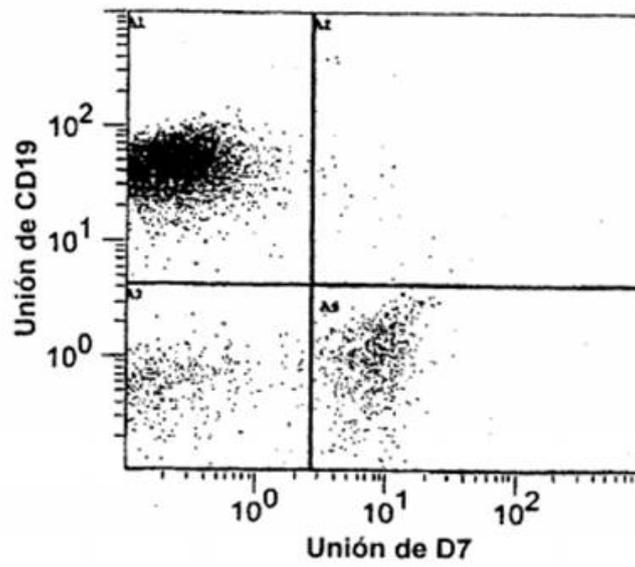


FIG. 14B

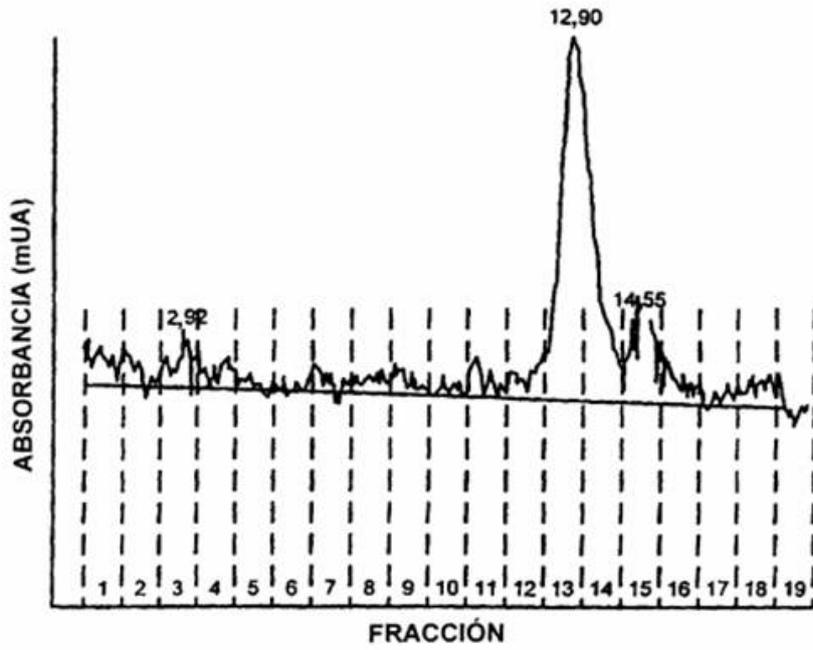


FIG. 15A

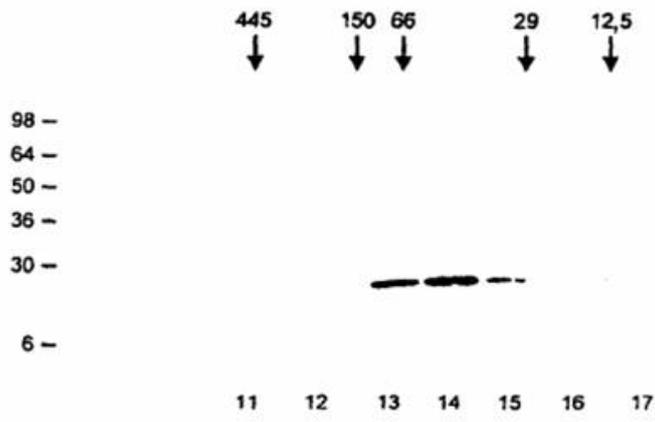


FIG. 15B