

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 324**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013** **PCT/US2013/053393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014** **WO14022759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013** **E 13826362 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 2879710**

54 Título: **Usos médicos de agentes que modulan la activación de las células inmunitarias y métodos de detección correspondientes**

30 Prioridad:

03.08.2012 US 201261742137 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2020

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215-5450, US y
CHILDREN'S HOSPITAL BOSTON (50.0%)

72 Inventor/es:

FREEMAN, GORDON, J.;
SHARPE, ARLENE, H.;
XIAO, YANPING;
FRANCISCO, LOISE;
DEKRUYFF, ROSEMARIE y
UMETSU, DALE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 771 324 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

Usos médicos de agentes que modulan la activación de las células inmunitarias y métodos de detección correspondientes

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/742,137, presentada el 3 de agosto de 2012.

Antecedentes de la Invención

Para que las células inmunitarias, tales como los linfocitos T, respondan a proteínas extrañas, las células presentadoras de antígenos (APC) deben proporcionar dos señales a los linfocitos T en reposo (Jenkins, M. y Schwartz, R. (1987) J. Exp. Med. 165:302-319; Mueller, D. L. et ál. (1990) J. Immunol. 144:3701-3709). La primera señal, que confiere especificidad a la respuesta inmunitaria, se transduce a través del receptor de linfocitos T (TCR) después del reconocimiento del péptido antigénico extraño presentado en el contexto del complejo de histocompatibilidad principal (MHC). La segunda señal, denominada coestimulación, induce la proliferación de los linfocitos T y los vuelve funcionales (Lenschow et ál. (1996) Annu. Rev. Immunol. 14:233). La coestimulación no es específica de los antígenos ni se encuentra restringida por el MHC, y se cree que es proporcionada por uno o más polipéptidos de la superficie celular expresados por las APC (Jenkins, M. K. et ál. (1988) J. Immunol. 140:3324-3330; Linsley, P. S. et ál. (1991) J. Exp. Med. 173:721-730; Gimmi, C. D., et ál. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579; Young, J. W. et ál. (1992) J. Clin. Invest. 90:229-237; Koulouva, L. et ál. (1991) J. Exp. Med. 173:759-762; Reiser, H. et ál. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:271-275; van-Seventer, G. A. et ál. (1990) J. Immunol. 144:4579-4586; LaSalle, J. M. et ál. (1991) J. Immunol. 147:774-80; Dustin, M. I. et ál. (1989) J. Exp. Med. 169:503; Armitage, R. J. et ál. (1992) Nature 357:80-82; Liu, Y. et ál. (1992) J. Exp. Med. 175:437-445).

Dichas células inmunitarias tienen receptores que transmiten señales inmunomoduladoras (por ejemplo, coestimuladoras y coinhibidoras). Por ejemplo, los linfocitos T tienen receptores de linfocitos T y el complejo CD3, los linfocitos B tienen receptores de linfocitos B, y las células mieloides tienen receptores Fc. Además, las células inmunitarias presentan receptores que transmiten señales que proporcionan señales coestimuladoras, o receptores que transmiten señales que inhiben la señalización mediada por receptores. Por ejemplo, CD28 transmite una señal coestimuladora a los linfocitos T. Después del enlace del receptor, el enlace de CD28 da como resultado una señal coestimuladora caracterizada, por ejemplo, por la regulación por aumento del receptor IL-2 α , IL-2 β , e IL-2 γ , el aumento de la transcripción del ARN mensajero de IL-2, y el aumento de la expresión de genes de citocinas (incluidos IL-2, IFN- γ , GM-CSF, y TNF- α). La transmisión de una señal coestimuladora permite que la célula evolucione a través del ciclo celular y, por lo tanto, aumente la proliferación de linfocitos T (Greenfield et ál. (1998) Crit. Rev. Immunol. 18:389). La unión de un receptor en un linfocito T que transmite una señal coestimuladora a la célula (por ejemplo, enlace de un receptor coestimulador que produce la secreción de citocinas y/o proliferación del linfocito T) por parte de una molécula de la familia B7, tal como B7-1 o B7-2, da como resultado la coestimulación. Por lo tanto, la inhibición de una interacción entre una molécula de la familia B7, tal como B7-1 o B7-2, y un receptor que transmite una señal coestimuladora sobre una célula inmunitaria da como resultado una modulación por disminución de la respuesta inmunitaria, la falta de respuesta específica, denominada anergia celular, eliminación y/o agotamiento clonal. La inhibición de esta interacción puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de fragmentos Fab anti-CD28, anticuerpos contra B7-1 o B7-2, o mediante el uso de una forma soluble de un receptor al que puede unirse una molécula miembro de la familia B7 como inhibidor competitivo (por ejemplo, CTLA41g).

También se han identificado receptores inhibidores que se unen a moléculas coestimuladoras en las células inmunitarias. La activación de CTLA4, por ejemplo, transmite una señal negativa a un linfocito T. El acoplamiento de CTLA4 inhibe la producción de IL-2 y puede inducir la detención del ciclo celular (Krummel y Allison (1996) J. Exp. Med. 183:2533). Además, los ratones que carecen de CTLA4 desarrollan la enfermedad linfoproliferativa (Tivol, et ál. (1995) Immunity 3:541; Waterhouse et ál. (1995) Science 270:985). El bloqueo de CTLA4 con anticuerpos puede bloquear una señal inhibidora, mientras que la agregación de CTLA4 con anticuerpo transmite una señal inhibidora. Por lo tanto, dependiendo del receptor al que se une una molécula coestimuladora por ejemplo (un receptor coestimulador tal como CD28 o un receptor inhibidor tal como CTLA4, determinadas moléculas B7, incluida B7-4, pueden promover la coestimulación o inhibición de los linfocitos T.

PD-1 es un miembro de la familia de moléculas de inmunoglobulinas (Ishida et ál. (1992) EMBO J. 11:3887; Shinohara et ál. (1994) Genomics 23:704). PD-1 se identificó previamente mediante el uso de un enfoque basado en clonación por sustracción diseñado para identificar moduladores de muerte celular programada (Ishida et ál. (1992) EMBO J. 11:3887-95; Woronicz et ál. (1995) Curr. Top. Microbial. Immunol. 200:137). Se cree que PD-1 tiene una función importante en la supervivencia de los linfocitos, por ejemplo, durante la selección clonal (Honjo (1992) Science 258:591; Agata et ál. (1996) Int. Immunology. 8:765; Nishimura et ál. (1996) Int. Immunology 8:773). PD-1 también estuvo implicado como un regulador de las respuestas de los linfocitos B (Nishimura (1998) Int. Immunology 10:1563). A diferencia de CTLA4, que solo se encuentra en los linfocitos T, PD-1 también se encuentra en los linfocitos B y las células mieloides. El descubrimiento anterior de que PD-1 se une a ligandos de PD-1, tales como PD-L1 y PD-L2, colocó a PD-1 en una familia de receptores inhibidores con CTLA4. Mientras que el acoplamiento de un receptor coestimulador da como resultado una señal coestimuladora en una célula inmunitaria, el acoplamiento

de un receptor inhibidor, por ejemplo, CTLA4 o PD-1 (por ejemplo, mediante reticulación o agregación 15), produce la transmisión de una señal inhibidora en una célula inmunitaria, lo que da como resultado una modulación por disminución de las respuestas de las células inmunitarias y/o anergia celular. Mientras que la transmisión de una señal inhibidora produce la modulación por disminución en las respuestas de las células inmunitarias (y una modulación por disminución resultante en la respuesta inmunitaria general), la prevención de una señal inhibidora en las células, tales como células inmunitarias, produce la modulación por aumento de las respuestas de las células inmunitarias (y una modulación por aumento resultante de una respuesta inmunitaria).

Actualmente, se desconoce si existen ligandos y receptores coinhibidores, especialmente debido a que dichas moléculas conocidas implicadas en la mediación de señales coinhibidoras y la regulación por disminución resultante de las respuestas inmunitarias (por ejemplo, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, etc.) no se consideran para el espectro completo de respuestas inmunoinhibidoras resultantes. Por consiguiente, existe una necesidad de identificar ligandos y/o receptores coinhibidores que tienen funciones fisiológicamente importantes en la regulación de las respuestas inmunitarias.

Compendio de la Invención

En un aspecto, la invención se refiere a un agente para uso en el tratamiento del asma asociado con una tolerancia alterada de las vías respiratorias, y/o esclerosis múltiple, en el que el agente inhibe la interacción de PD-L2 con RGMb, en donde el agente se pone en contacto con una célula que expresa PD-L2 o una célula que expresa RGMb para regular por aumento la respuesta inmunitaria, en donde el agente es un anticuerpo de bloqueo que se une a RGMb y/o un agente de bloqueo que se une a PD-L2.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, o (d) una proteína PD-L2 con una proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre PD-L2 y RGMb.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la actividad de señalización que se produce a partir de la interacción entre PD-L2 y RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas y modular la proliferación celular.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ensayo basado en células *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre PD-L2 y RGMb.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ensayo sin células para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto un PD-L2 con una proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre el PD-L2 y la proteína RGMb o parte biológicamente activa de esta.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ensayo basado en células *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la actividad de señalización que se produce a partir de la interacción entre PD-L2 y RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas y modular la proliferación celular.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que RGMb es un receptor para el ligando de PD-1, PD-L2. Los polipéptidos de PD-L2 se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos y pueden transmitir señales de regulación por disminución a las células inmunitarias. Por ejemplo, se conoce que el ligando PD-L2 que se une a PD-1 transmite una señal negativa. En la presente memoria se demuestra que RGMb transmite de manera similar una señal negativa a las células (por ejemplo, células inmunitarias o cancerosas) al interactuar con PD-L2. Por lo tanto, la interacción entre RGMb y PD-L2 da como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria.

En un aspecto, se proporciona un método para modular una respuesta inmunitaria que comprende poner en contacto una célula que expresa PD-L2 o una célula que expresa RGMb con un agente que modula la interacción de PD-L2 con RGMb para modular de ese modo la respuesta inmunitaria. En una realización, la célula que expresa PD-L2 y/o la célula que expresa RGMb es una célula humana. En otra realización, la célula que expresa PD-L2 y/o la célula que expresa RGMb es una célula inmunitaria, tal como un linfocito T, un linfocito B o una célula mieloide. En incluso otra realización, la respuesta inmunitaria se regula por aumento (por ejemplo, al utilizar un agente seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo de bloqueo que se une a RGMb, una forma no activadora de RGMb, una forma soluble de RGMb, una proteína de fusión de RGMb, una molécula de ácido nucleico que bloquea la traducción o transcripción de RGMb, un antagonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo de bloqueo que reconoce PD-L2, una forma no activadora de PD-L2, una forma soluble de PD-L2, una proteína de fusión de PD-L2, una molécula de ácido nucleico que bloquea la traducción o transcripción de RGMb y/o PD-L2, un antagonista de PD-L2 de molécula pequeña, una forma no activadora de un ligando de RGMb natural, una forma soluble de un ligando de RGMb natural, y una proteína de fusión de un ligando de RGMb natural). En aun otra realización, el anticuerpo de bloqueo que se une a PD-L2 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-L2 que bloquean la interacción entre PD-L2 y RGMb sin bloquear la interacción entre PD-L2 y PD-1; y anticuerpos anti-PD-L2 que bloquean la interacción entre PD-L2 y RGMb y la interacción entre PD-L2 y PD-1. En otra realización, se reduce la anergia, el agotamiento y/o la eliminación clonal en la célula inmunitaria. En incluso otra realización, el método comprende, además, poner en contacto la célula o la célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que regulan por aumento una respuesta inmunitaria. En aun otra realización, la respuesta inmunitaria se regula por disminución (por ejemplo, mediante el uso de un agente seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo de activación que se une a RGMb, un agonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo de activación que se une a PD-L2, un agonista de PD-L2 de molécula pequeña, y una anticuerpo de activación que se une a PD-1 e inhibe la interacción entre PD-L2 y PD-1). En otra realización, el anticuerpo de activación que se une a PD-L2 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-L2 que promueven la interacción entre PD-L2 y RGMb sin promover la interacción entre PD-L2 y PD-1; y anticuerpos anti-PD-L2 que promueven la interacción entre PD-L2 y RGMb y la interacción entre PD-L2 y PD-1. En incluso otra realización, el anticuerpo de bloqueo que se une a PD-1 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la interacción entre PD-L2 y PD-1 sin bloquear la interacción entre PD-L1 y PD-1; y anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la interacción entre PD-L2 y PD-1 y la interacción entre PD-L1 y PD-1. En aun otra realización, se induce la anergia, el agotamiento y/o la eliminación clonal en la célula inmunitaria. En otra realización, el método comprende, además, poner en contacto la célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que regulan por disminución una respuesta inmunitaria. En incluso otra realización, la etapa de poner en contacto se produce *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar a un sujeto con una afección que podría beneficiarse de la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria, que comprende administrar al sujeto un agente que inhibe la interacción entre RGMb y PD-L2 de modo que se trate la afección podría beneficiarse de la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria. En una realización, el agente se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de bloqueo que se une a RGMb, una forma no activadora de RGMb, una forma soluble de RGMb, una proteína de fusión de RGMb, una molécula de ácido nucleico que bloquea la traducción o transcripción de RGMb, un antagonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo de bloqueo que reconoce PD-L2, una forma no activadora de PD-L2, una forma soluble de PD-L2, una proteína de fusión de PD-L2, una molécula de ácido nucleico que bloquea la traducción o transcripción de RGMb y/o PD-L2, un antagonista de PD-L2 de molécula pequeña, una forma no activadora de PD-1, una forma soluble de PD-1, una proteína de fusión de PD-1, y un antagonista de PD-1 de molécula pequeña. En otra realización, el anticuerpo de bloqueo que se une a PD-L2 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-L2 que bloquean la interacción entre PD-L2 y RGMb sin bloquear la interacción entre PD-L2 y PD-1; y anticuerpos anti-PD-L2 que bloquean la interacción entre PD-L2 y RGMb y la interacción entre PD-L2 y PD-1. En incluso otra realización, se reduce la anergia, el agotamiento y/o la eliminación clonal en la célula inmunitaria. En aun otra realización, el método comprende, además, poner en contacto la célula o la célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que regulan por aumento una respuesta inmunitaria. En otra realización, la afección que podría beneficiarse de la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en cáncer, una infección viral, una infección bacteriana, una infección por protozoarios, una infección por helmintos, asma asociado con una tolerancia alterada de las vías respiratorias, una enfermedad neurológica, esclerosis múltiple y una enfermedad inmunosupresora.

En incluso otro aspecto, se proporciona un método para tratar a un sujeto con una afección que podría beneficiarse de la regulación por disminución de una respuesta inmunitaria, que comprende administrar al sujeto un agente que estimula la señalización mediada por PD-L2 a través de un RGMb en una célula inmunitaria del sujeto de modo que se trate una afección podría beneficiarse de la regulación por disminución de la respuesta inmunitaria. En una realización, el agente se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo de activación que se une a RGMb, un agonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo de activación que se une a PD-L2, un agonista de PD-L2 de molécula pequeña, un anticuerpo de bloqueo que se une a PD-1 e inhibe la interacción entre PD-L2 y PD-1, una molécula de ácido nucleico que bloquea la traducción o transcripción de PD-1, y un antagonista de PD-1 de molécula pequeña. En otra realización, el anticuerpo de activación que se une a PD-L2 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-L2 que promueven la interacción entre PD-L2 y RGMb sin promover la interacción entre PD-L2 y PD-1; y anticuerpos anti-PD-L2 que promueven la interacción entre PD-L2 y RGMb y la interacción entre PD-L2 y PD-1. En incluso otra realización, el anticuerpo de bloqueo que se une a PD-1 se selecciona del grupo

que consiste en anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la interacción entre PD-L2 y PD-1 sin bloquear la interacción entre PD-L1 y PD-1; y anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la interacción entre PD-L2 y PD-1 y la interacción entre PD-L1 y PD-1. En aun otra realización, se induce la anergia, el agotamiento y/o la eliminación clonal en la célula inmunitaria. En otra realización, el método comprende, además, poner en contacto la célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que regulan por disminución una respuesta inmunitaria. En otra realización, la afección que podría beneficiarse de la regulación por disminución de la respuesta inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una alergia (por ejemplo, alergias a los alimentos), un trasplante, enfermedad de injerto contra el hospedador, respuesta de hipersensibilidad, un trastorno autoinmunitario, un trastorno que requiere un aumento de la función o producción de linfocitos T CD4+, un trastorno que requiere un aumento de la eficiencia de la vacunación, un trastorno que requiere un aumento de la función o producción de linfocitos T reguladores y un trastorno que requiere un aumento de la eficiencia de la vacunación.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 o una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; (c) una célula que expresa PDL-2 con una célula que expresa RGMb, o (d) una proteína PD-L2 con una proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre PD-L2 y RGMb. En una realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, y una célula mieloide.

En otro aspecto, se proporciona un método para seleccionar compuestos que modulan la actividad de señalización que se produce a partir de la interacción entre PD-L2 y RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; (c) una célula que expresa PDL-2 con una célula que expresa RGMb, o (d) un PD-L2 o proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas y modular la proliferación celular. En una realización, el compuesto de prueba tiene un efecto seleccionado del grupo que consiste en (a) regulación por aumento de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por disminución de la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (b) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (c) regulación por aumento de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por disminución de la fosforilación de PKC- θ ; (d) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación de PKC- θ ; (e) regulación por aumento de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación de SHP-2; y (f) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por disminución de la fosforilación de SHP-2. En otra realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, y una célula mieloide.

En incluso otro aspecto, se proporciona un ensayo basado en células para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 o una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PDL-2 con una célula que expresa RGMb, con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre PD-L2 y RGMb. En una realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, y una célula mieloide.

En aun otro aspecto, se proporciona un ensayo sin células para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto un PD-L2 o una proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre el PD-L2 o la proteína RGMb o parte biológicamente activa de esta.

En otro aspecto, se proporciona un ensayo basado en células para seleccionar compuestos que modulan la actividad de señalización que se produce a partir de la interacción entre PD-L2 y RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PDL-2 con una célula que expresa RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas y modular la proliferación celular. En una realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, y una célula mieloide.

En incluso otro aspecto, se proporciona un ensayo basado en células para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 y RGMb que comprende poner en contacto un PD-L2 o proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas y modular la proliferación celular.

En aun otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-RGMb, o fragmento de unión al antígeno de este, que inhibe la interacción entre RGMb y PD-L2. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal depositado como un clon de hibridoma y al cual se le asigna un número de acceso. En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende: a) una secuencia de cadena pesada con al menos aproximadamente 95 % de identidad con una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3, o b) una secuencia de cadena ligera con al menos aproximadamente 95 % de identidad con una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3. En incluso otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende: a) una secuencia de CDR de cadena pesada con al menos aproximadamente 95 % de identidad con una secuencia de CDR de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3, o b) una secuencia de CDR de cadena ligera con al menos aproximadamente 95 % de identidad con una secuencia de CDR de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3. En aun otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende: a) una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3; o b) una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3. En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende: a) una secuencia de CDR de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3, o b) una secuencia de CDR de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3. En incluso otra realización, el anticuerpo anti-RGMb, o fragmento de unión al antígeno de este, es monoclonal, quimérico, humanizado, compuesto, de roedor, de ser humano. En aun otra realización, el anticuerpo anti-RGMb, o fragmento de unión al antígeno de este, reduce o inhibe al menos una actividad relacionada con la ausencia del anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión al antígeno de este, seleccionada del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas, y modular la proliferación celular. En otra realización, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión al antígeno de este, está etiquetado de forma detectable, comprende un dominio efector, comprende un dominio Fc, y/o se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fv, Fav, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.

En otro aspecto, se proporciona una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

En incluso otro aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que se hibrida, en condiciones rigurosas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3, o una secuencia con al menos 95 % de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3.

En aun otro aspecto, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado descrito en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado descrito en la presente memoria, un vector descrito en la presente memoria, expresa un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente memoria, o es accesible de acuerdo con un depósito descrito en la presente memoria.

En incluso otro aspecto, se proporciona un dispositivo o kit que comprende un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente memoria, dicho dispositivo o kit comprende opcionalmente una etiqueta para detectar al menos un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, o un complejo que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para producir un anticuerpo descrito en la presente memoria, dicho método comprende las etapas de: (i) cultivar una célula hospedadora transformada que se ha transformado mediante un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el anticuerpo descrito en la presente memoria en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo; y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia o el nivel de un polipéptido RGMb, dicho método comprende obtener una muestra y detectar dicho polipéptido en una muestra mediante el uso de al menos un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, descrito en la presente memoria. En una realización, el al menos un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de este, forma un complejo con un polipéptido RGMb y el complejo es detectado en forma de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), de forma inmunoquímica, o mediante el uso de un ensayo de flujo intracelular.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1R muestran que RGMb se une a PD-L2, pero no a PD-L1 u otras moléculas relacionadas. Las Figuras 2A-2G muestran que los anticuerpos anti-RGMb se unen a RGMb, pero no a RGMa o RGMc.

Las Figuras 3A-3H muestran las capacidades de bloqueo de los anticuerpos anti-RGMb, anticuerpos anti-PD-L2, RGMb-Ig y proteínas de fusión de PD-1-Ig.

Las Figuras 4A-4C muestran que PD-L2 y BMP-2/4 se unen a sitios cercanos pero distintos en RGMb y ambos pueden unirse de forma simultánea a RGMb y se propuso un modelo para la interacción de RGMb:PD-L2.

Las Figuras 5A-5G muestran la expresión de RGMb en macrófagos de ratón y la estructura de la proteína RGMb.

Las Figuras 6A-6C muestran la expresión intracelular y en la superficie celular de RGMb por parte de líneas de células cancerosas humanas.

Las Figuras 7A-7D muestran la expresión intracelular de RGMb por parte de células hematopoyéticas primarias de ratón.

Las Figuras 8A-8D muestran que el bloqueo de la interacción de RGMb:PD-L2 inhibe la inducción de tolerancia respiratoria.

Las Figuras 9A-9I muestran que el bloqueo de la interacción de RGMb:PD-L2 perjudica la expansión de los linfocitos T en antígenos durante el desarrollo de la tolerancia respiratoria.

Las Figuras 10A-10J muestran la expresión de RGMb, PD-L2, BMP, BMPR y moléculas relacionadas en subconjuntos de células pulmonares, células epiteliales de las vías respiratorias y células 300. De izquierda a derecha, cada cuadro de datos de cada gráfico corresponde a la posición correspondiente de la leyenda de arriba hacia abajo (por ejemplo, los cuadros de datos de izquierda a derecha en la Figura 10A corresponden a PD-1, PD-L1 y PD-L2).

La Figura 11 muestra un gráfico de la puntuación clínica de EAE con el transcurso del tiempo para ratones tratados con el anticuerpo anti-RGMb 9D1 y tratados con control.

La Figura 12 muestra el protocolo del modelo de dosis baja de tolerancia oral utilizado para demostrar que el bloqueo de RGMb inhibe la inducción de la tolerancia oral.

La Figura 13 muestra que el tratamiento de ratones con mAb anti-RGMb 9D1 impide el desarrollo de la tolerancia oral, lo que da como resultado un aumento de la proliferación y las respuestas de citocinas en comparación con ratones con tolerancia tratados con mAb de control.

Descripción detallada de la Invención

I. Definiciones

Los artículos «un» y «una» se usan en la presente memoria para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, al menos a uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

El término «receptor de activación» incluye receptores de células inmunitarias que se unen a antígenos, antígenos en complejo (por ejemplo, en el contexto de polipéptidos MHC), o se unen a anticuerpos. Dichos receptores de activación incluyen receptores de linfocitos T (TCR), receptores de linfocitos B (BCR), receptores de citocinas, receptores de LPS, receptores de complemento, y receptores Fc.

Los receptores de linfocitos T están presentes en los linfocitos T y se asocian con polipéptidos CD3. Los receptores de linfocitos T son estimulados por antígenos en el contexto de polipéptidos MHC (así como por reactivos de activación de linfocitos T policlonales). La activación de linfocitos T mediante TCR produce varios cambios, por ejemplo, fosforilación de proteínas, cambios en lípidos de la membrana, flujos de iones, alteraciones de nucleótidos cíclicos, cambios en la transcripción de ARN, cambios en la síntesis de proteínas y cambios en el volumen celular.

Los receptores de linfocitos B están presentes en los linfocitos B. Los receptores de antígenos de linfocitos B son un complejo entre la membrana de Ig (mIg) y otros polipéptidos transmembrana (por ejemplo, Igα e Igβ). La función de transducción de señales de mIg se activa mediante la reticulación de polipéptidos receptores por parte de antígenos oligoméricos y multiméricos. Los linfocitos B también pueden activarse mediante anticuerpos anti-inmunoglobulina. Tras la activación de BCR, se producen varios cambios en los linfocitos B que incluyen la fosforilación de tirosina.

Los receptores Fc se encuentran en muchas células que participan en las respuestas inmunitarias. Los receptores Fc (FcR) son receptores de la superficie celular para la parte Fc de polipéptidos de inmunoglobulina (Ig). Entre los FcR humanos que se han identificado hasta ahora se encuentran aquellos que reconocen IgG (denominados Fcγ R), IgE (Fcε R1), IgA (Fcα), e IgM/A polimerizada (Fcμ R). Los FcR se encuentran en los siguientes tipos de células: Fcε R I (mastocitos), Fcε R.II (varios leucocitos), Fcα R (neutrófilos), y Fcμ R (epitelio glandular, hepatocitos) (Hogg, N. (1988) Immunol. Today 9:185-86). Los FcγR ampliamente estudiados son centrales en las defensas inmunitarias celulares y son responsables de estimular la liberación de mediadores de inflamación y enzimas hidrolíticas implicadas en la patogénesis de la enfermedad autoinmunitaria (Unkeless, J. C. et ál. (1988) Annu. Rev. Immunol. 6:251-81). Los FcγR proporcionan un enlace crucial entre las células efectoras y los linfocitos que secretan Ig, dado que los FcγR de macrófagos/monocitos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos citolíticos naturales (NK) confieren un elemento de reconocimiento específico mediado por IgG. Los leucocitos humanos tienen al menos tres receptores diferentes para IgG: hFcγ RI (encontrado en monocitos/macrófagos), hFcγ RII (en monocitos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, posiblemente linfocitos B y la línea celular K562) y Fcγ III (en linfocitos NK, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos).

Con respeto a los linfocitos T, la transmisión de una señal coestimuladora a un linfocito T implica una vía de señalización que no es inhibida por la ciclosporina A. Además, una señal coestimuladora puede inducir la secreción de citocinas (por ejemplo, IL-2 y/o IL-10) en un linfocito T y/o puede impedir la inducción de la falta de respuesta al antígeno, la inducción de anergia o la inducción de la muerte celular (eliminación) en los linfocitos T.

El término «actividad» cuando se usa con respecto a un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido PD-L2, PD-L1, PD-1 o RGMb, incluye actividades que son inherentes a la estructura de la proteína. Por ejemplo, con respecto al ligando de PD-1, el término «actividad» incluye la capacidad de modular la coestimulación de células inmunitarias (por ejemplo, mediante la modulación de una señal coestimuladora en una célula inmunitaria activada), o modular la inhibición mediante la modulación de una señal inhibidora en una célula inmunitaria (por ejemplo, mediante el acoplamiento de un receptor natural en una célula inmunitaria). Los expertos en la técnica reconocerán que cuando una forma de activación del polipéptido del ligando de PD-1 se une a un receptor inhibidor, se genera una señal inhibidora en la célula inmunitaria.

El término «nivel de expresión alterado» de un marcador se refiere a un nivel de expresión o cantidad de copias de un marcador en una muestra de prueba, por ejemplo, una muestra derivada de un sujeto que padece cáncer, que es mayor o menor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión o la cantidad de copias y es, preferiblemente, al menos dos veces, y más preferiblemente, tres, cuatro, cinco o diez o más veces el nivel de expresión o la cantidad de copias del marcador o región cromosómica en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano que no padece la enfermedad asociada) y, preferiblemente, el nivel de expresión o cantidad de copias promedio del marcador o región cromosómica en diversas muestras de control. El nivel de expresión alterado es mayor o menor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión o la cantidad de copias y es, preferiblemente, al menos dos veces, y más preferiblemente, tres, cuatro, cinco o diez o más veces el nivel de expresión o la cantidad de copias del marcador en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano que no padece la enfermedad asociada) y, preferiblemente, el nivel de expresión o cantidad de copias promedio del marcador en diversas muestras de control.

El término «actividad alterada» de un marcador se refiere a una actividad de un marcador que aumenta o disminuye en un estado de una enfermedad, por ejemplo, en una muestra de cáncer, en comparación con la actividad del marcador en una muestra de control normal. La actividad alterada de un marcador puede ser, por ejemplo, el resultado de la expresión alterada del marcador, un nivel de proteína alterado del marcador, una estructura alterada del marcador o, por ejemplo, una interacción alterada con otras proteínas implicadas en la misma vía que el marcador, o una vía diferente, o una interacción alterada con activadores o inhibidores transcripcionales.

La «cantidad» de un marcador, por ejemplo, la expresión o cantidad de copias de un marcador o MCR, o el nivel de proteína de un marcador, en un sujeto es «significativamente» mayor o menor que la cantidad normal de un marcador, si la cantidad del marcador es mayor o menor, respectivamente, que el nivel normal en una cantidad mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la cantidad y, preferiblemente, al menos dos veces, y más preferiblemente, tres, cuatro, cinco o diez o más veces esa cantidad. De manera alternativa, la cantidad del marcador en el sujeto puede considerarse «significativamente» mayor o menor que la cantidad normal si la cantidad es al menos aproximadamente dos, y preferiblemente, al menos aproximadamente tres, cuatro o cinco veces mayor o menor, respectivamente, que la cantidad normal del marcador.

A menos que se especifique de otro modo en la presente memoria, los términos «anticuerpo» y «anticuerpos» comprenden formas de origen natural de anticuerpos (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos, así como fragmentos y derivados de todos los anteriores, donde los fragmentos y derivados tienen al menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpos pueden comprender una proteína o un resto químico conjugado con un anticuerpo.

El término «anticuerpo», tal como se usa en la presente, también incluye una «parte de unión al antígeno» de un anticuerpo (o simplemente una «parte de anticuerpo»). La expresión «parte de unión al antígeno», tal como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno diana. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término «parte de unión al antígeno» de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et ál., (1989) Nature 341:544-546) que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, se pueden unir mediante el uso de métodos recombinantes mediante un enlazador sintético que permite convertirlos en una cadena proteica simple en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar polipéptidos monovalentes (conocidos como Fv de cadena simple (scFv); véase, por ejemplo, Bird et ál. (1988) Science 242:423-426; y Huston et ál. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

85:5879-5883; y Osbourn et ál. 1998, Nature Biotechnology 16: 778). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena simple estén comprendidos dentro del término «parte de unión al antígeno» de un anticuerpo. Cualquier secuencia VH y VL del scFv específico puede estar unida a secuencias genómicas o un ADNc humano de inmunoglobulina con región constante para generar la expresión de vectores que codifican moléculas IgG completas u otros isotipos. VH y VL también se pueden utilizar en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de anticuerpos de cadena simple, tales como los diacuerpos, también están comprendidas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica simple, pero mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et ál. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et ál. (1994) Structure 2:1121-1123).

Además, un anticuerpo o parte de unión al antígeno de este puede ser parte de polipéptidos de inmunoadhesión más grandes formados por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de dichos polipéptidos de inmunoadhesión incluyen el uso de la región núcleo de estreptavidina para elaborar un polipéptido scFv tetramérico (Kipriyanov, S.M. et ál. (1995) Human Antibodies and Hybridomas, 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina de extremo C para elaborar polipéptidos scFv bivalentes y biotinilados (Kipriyanov, S.M. et ál. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Se pueden preparar partes de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, digestión de papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, partes de anticuerpos y polipéptidos de inmunoadhesión mediante el uso de técnicas de ADN recombinante estándar, tal como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos o singénicos; o formas modificadas de estos (por ejemplo, humanizados, quiméricos, etc.). Los anticuerpos también pueden ser completamente humanos. Los términos «anticuerpos monoclonales» y «composición de anticuerpo monoclonal», tal como se usan en la presente memoria, se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpo que contienen una sola especie de sitio de unión al antígeno capaz de inmunorreactar con un epítipo particular de un antígeno, mientras que los términos «anticuerpos policlonales» y «composición de anticuerpo policlonal» se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión al antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta, típicamente, una afinidad de unión única con respecto a un antígeno específico con el cual inmunorreacciona. Además, los anticuerpos pueden ser «humanizados», lo que incluye anticuerpos elaborados por una célula no humana que tiene regiones variables y constantes que han sido alteradas para parecerse más a anticuerpos elaborados por una célula humana. Por ejemplo, al alterar la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos no humanos para incorporar aminoácidos que se encuentran en secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. El término «anticuerpo humanizado», tal como se usa en la presente, también incluye anticuerpos en los que se injertaron, en secuencias marco humanas, secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón.

El término polipéptido de ácido nucleico «antisentido» comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico «sentido» que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena de codificación de un polipéptido de ADNc de cadena doble, complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la cadena de codificación de un gen. Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico antisentido puede unirse mediante hidrógeno a un polipéptido de ácido nucleico sentido.

El término «fluido corporal» se refiere a fluidos que se excretan o secretan del cuerpo, así como a fluidos que normalmente no lo hacen (por ejemplo, líquido amniótico, humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, cerumen o cerilla, fluido de cowper o fluido preeyaculatorio, quilo, quimo, heces, eyaculación femenina, fluido intersticial, fluido intracelular, linfa, menstruación, leche materna, moco, líquido pleural, fluido peritoneal, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, fluido sinovial, lágrimas, orina, lubricación vaginal, humor vítreo, vómito).

Los términos «cáncer», «tumor» o «trastorno hiperproliferativo» se refieren a la presencia de células que poseen características típicas de células que provocan cáncer, tales como una proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, velocidad rápida de crecimiento y proliferación, y determinados rasgos morfológicos característicos. Las células cancerosas a menudo se encuentran en forma de tumor, pero dichas células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden ser una célula cancerosa no tumorigénica, tal como una célula de leucemia. Los cánceres incluyen, de modo no taxativo, cáncer de linfocitos B, por ejemplo, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de cadena pesada tales como, por ejemplo, enfermedad de la cadena alfa, enfermedad de la cadena gamma y enfermedad de la cadena mu, gammapatía monoclonal benigna y

amiloidosis inmunocítica, melanomas, cáncer de mamas, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer colorrectal, cáncer de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata refractario a hormonas metastásico), cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial o uterino, cáncer de la cavidad bucal o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículos. cáncer del tracto biliar, cáncer de apéndice o intestino delgado, cáncer de la glándula salival, cáncer de la glándula tiroides, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de los tejidos hematológicos y similares. Otros ejemplos no taxativos de tipos de cánceres aplicables a los métodos abarcados por la presente invención incluyen sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, cáncer de hígado, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer óseo, tumor cerebral, cáncer de testículos, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica); y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, y enfermedad de cadena pesada. En algunas realizaciones, el cáncer cuyo fenotipo se determina mediante el método de la invención es un cáncer epitelial tal como, de modo no taxativo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer ginecológico, cáncer renal, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer bucal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de piel. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón o cáncer de colon. En incluso otras realizaciones, el cáncer epitelial es cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales no papilar, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de ovario (por ejemplo, carcinoma de ovario seroso), o cáncer de mama. Los cánceres epiteliales pueden caracterizarse de diversas otras formas que incluyen, de modo no taxativo, serosos, endometrioides, mucinosos, de células claras, de brenner o no diferenciados. En algunas realizaciones, la presente invención se usa en el tratamiento, el diagnóstico y/o el pronóstico de linfoma o sus subtipos que incluyen, de modo no taxativo, linfoma de células del manto.

El término «la/las CDR» se refiere a una región determinante de complementariedad (CDR) de las cuales tres conforman el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3) y tres conforman el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3). Las CDR contribuyen con la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden las regiones de andamiaje o marco. Los límites y longitudes de CDR de definición exactos son sujetos a una clasificación diferente y a sistemas de numeración. Por lo tanto, las CDR pueden contemplarse en Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de límites. A pesar de los límites diferentes, cada uno de estos sistemas tiene algún grado de solapamiento en lo que constituye las denominadas «regiones hipervariables» dentro de las secuencias variables. Por lo tanto, las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas difieren en longitud y las áreas de límites con respecto a la región marco adyacente. En algunas realizaciones, las CDR descritas en la presente memoria se determinan de acuerdo con segmentos enumerados de secuencias de polipéptidos y ácidos nucleicos de región variable de cadena pesada y cadena ligera (véase, por ejemplo, la Tabla 3). Véase también Kabat, Chothia, y/o MacCallum et ál., (Kabat et ál., en «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5.^a edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, 1992; Chothia et ál. (1987) J. Mol. Biol. 196, 901; y MacCallum et ál., J. Mol. Biol. (1996) 262, 732, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad mediante referencia).

El término «región codificante» se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que comprenden codones que se traducen en residuos de aminoácidos, mientras que el término «región no codificante» se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo, las regiones no traducidas 3' y 5').

El término «complementario» se refiere al concepto general de complementariedad de secuencia entre regiones de dos cadenas de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico. Se conoce que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno específicos («emparejamiento de bases») con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela con respecto a la primera región si el residuo es timina o uracilo. De manera similar, se conoce que un residuo de citosina de una primera cadena de ácido nucleico puede realizar el emparejamiento de bases con un residuo de una segunda cadena de ácido nucleico que es antiparalela con respecto a la primera cadena si el residuo es guanina. Una primera región de ácido nucleico es complementaria a una segunda región del mismo ácido nucleico o uno distinto si, cuando las dos regiones se disponen de forma antiparalela, al menos un residuo de nucleótido de la primera región puede realizar el emparejamiento de bases con un residuo de la segunda región. Preferiblemente, la primera región comprende una primera parte y la segunda región comprende una segunda parte, mediante la cual,

cuando la primera y segunda parte se disponen de forma antiparalela, al menos aproximadamente 50 %, y preferiblemente, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % de los residuos de nucleótido de la primera parte pueden realizar el emparejamiento de bases con residuos de nucleótido en la segunda parte. Más preferiblemente, todos los residuos de nucleótidos de la primera parte pueden realizar el emparejamiento de bases con residuos de nucleótido en la segunda parte.

Tal como se usa en la presente memoria, el término «anticuerpo compuesto» se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables que comprenden secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal o no germinal de dos o más regiones variables no relacionadas. Adicionalmente, el término «anticuerpo humano compuesto» se refiere a un anticuerpo que tiene regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal o no germinal humana y regiones variables que comprenden secuencias de la línea germinal o no germinal humana de dos o más regiones variables humanas no relacionadas. Un anticuerpo humano compuesto es útil como un componente eficaz en un agente terapéutico de acuerdo con la presente invención dado que disminuye la antigenicidad del anticuerpo humano compuesto en el cuerpo humano.

El término «coestimular», tal como se usa en referencia a células inmunitarias activadas, incluye la capacidad de un polipéptido coestimulador de proporcionar una segunda señal mediada por un receptor no activador (por ejemplo, una «señal coestimuladora») que induce la proliferación o función efectora. Por ejemplo, una señal coestimuladora puede provocar secreción de citocinas, por ejemplo, en un linfocito T que ha recibido una señal mediada por el receptor de linfocitos T. Las células inmunitarias que han recibido una señal mediada por el receptor de células, por ejemplo, mediante un receptor de activación se denominan en la presente memoria «células inmunitarias activadas».

El término «receptor coestimulador» incluye receptores que transmiten una señal coestimuladora a una célula inmunitaria, por ejemplo, CD28. Tal como se usa en la presente memoria, el término «receptores inhibidores» incluye receptores que transmiten una señal negativa a una célula inmunitaria (por ejemplo, CTLA4 o PD-1). Una señal inhibidora transducida por un receptor puede producirse incluso si un receptor coestimulador (tal como CD28) no se encuentra presente en la célula inmunitaria y, por lo tanto, no es simplemente una función de competencia entre receptores inhibidores y receptores coestimuladores para la unión de polipéptidos coestimuladores (Fallarino et ál. (1998) J. Exp. Med. 188:205). La transmisión de una señal inhibidora a una célula inmunitaria puede dar como resultado la falta de respuesta o anergia o muerte celular programada en la célula inmunitaria. Preferiblemente, la transmisión de una célula inhibidora funciona a través de un mecanismo que no implica apoptosis. Tal como se usa en la presente memoria, el término «apoptosis» incluye la muerte celular programada que puede caracterizarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. La muerte celular apoptótica puede caracterizarse, por ejemplo, por el encogimiento celular, la formación de ampollas en la membrana y la condensación de cromatina que culminan en la fragmentación celular. Las células que experimentan apoptosis también presentan un patrón característico de escisión de ADN internucleosómico. Dependiendo de la forma del polipéptido que se une a un receptor, una señal puede ser transmitida (por ejemplo, por una forma multivalente de polipéptido PD-L2 o una forma de PD-L2 que se une a receptores Fc que da como resultado la reticulación del receptor) o una señal puede ser inhibida (por ejemplo, por una forma monovalente soluble de un PD-L2 o una forma de PD-L2 que carece de receptores Fc), por ejemplo, mediante competencia con formas de activación de PD-L2 para unirse al receptor. Sin embargo, existen casos en los cuales un polipéptido soluble puede ser estimulador. Los efectos de un agente modulador se pueden demostrar fácilmente mediante el uso de ensayos de detección habituales tal como se describe en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, el término «región Fc» se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. A pesar de que los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana usualmente está definida de forma que se extienda desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta su extremo carboxilo. Las regiones Fc de la secuencia natural para su uso en los anticuerpos de la presente invención incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humana.

Tal como se usa en la presente memoria, «receptor de Fc» o «FcR» describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y, de manera alternativa, formas con corte y empalme de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un «receptor de activación») y FcγRIIB (un «receptor inhibidor»), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de estos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en el inmunorreceptor de tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en el inmunorreceptor tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático, (véase M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997). Los FcR se analizan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et ál., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas et ál., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluidos los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término «FcR» en la presente memoria.

Una molécula se encuentra «fijada» o «adherida» a un sustrato si está asociada de forma covalente o no covalente al sustrato, de modo que el sustrato pueda enjuagarse con un fluido (por ejemplo, citrato salino estándar, pH 7,4) sin

que una fracción sustancial de la molécula se disocie del sustrato.

Las «variantes con función conservadora» son aquellas en las cuales se cambió un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación total y la función del polipéptido, inclusive, de modo no taxativo, el
5
reemplazo de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace mediante hidrógeno, ácido, básico, hidrofóbico, aromático, y similares). Los aminoácidos que no sean aquellos indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de similitud de
10
secuencias de proteínas o aminoácidos entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de 70 % a 99 %, tal como se determina de acuerdo con un esquema de alineación, tal como el método de agrupamiento, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una «variante de función conservadora» también incluye un polipéptido que tiene al menos 60 % de identidad de aminoácido tal como se
15
determina mediante los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente, al menos 75 %, más preferiblemente, al menos 85 %, incluso más preferiblemente, al menos 90 %, y aun más preferiblemente, 95 %, y tiene las mismas propiedades o funciones, o sustancialmente similares, que la proteína natural u original con la que se compara.

Tal como se usa en la presente memoria, el término «anticuerpo heterólogo» se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una
20
secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante que corresponde a la que se encuentra en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico y que es generalmente de una especie diferente a la del animal no humano transgénico.

El término «homólogo», tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la similitud de secuencia de
25
nucleótidos entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico o entre regiones de dos cadenas de ácido nucleico diferentes. Cuando una posición de residuo de nucleótido en ambas regiones está ocupada por el mismo residuo de nucleótido, las regiones son homólogas en esa posición. Una primera región es homóloga a una segunda región si al menos una posición de residuo de nucleótido de cada región está ocupada por el mismo residuo. La
30
homología entre dos regiones se expresa en términos de la proporción de posiciones de residuos de nucleótidos de las dos regiones que están ocupadas por el mismo residuo de nucleótidos. A modo de ejemplo, una región que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-ATTGCC-3' y una región que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-TATGGC-3' comparten 50 % de homología. Preferiblemente, la primera región comprende una primera parte y la segunda región
35
comprende una segunda parte, mediante la cual, al menos aproximadamente 50 %, y preferiblemente, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % de las posiciones de residuos de nucleótidos de cada una de las partes están ocupadas por el mismo residuo de nucleótidos. Más preferiblemente, todas las posiciones de residuos de nucleótidos de cada una de las partes están ocupadas por el mismo residuo de nucleótidos.

Se pretende que el término «célula hospedadora» se refiera a una célula en la cual se introduce un ácido nucleico de la invención, tal como un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos «célula hospedadora» y
40
«célula hospedadora recombinante» se utilizan de forma indistinta en la presente memoria. Se entenderá que dichos términos no solo se refieren a la célula del sujeto en particular, sino también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas ocasionadas por mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero igualmente puede estar incluida dentro del alcance del término tal como se usa en la presente memoria.

Se pretende que el término «anticuerpo humanizado», tal como se usa en la presente memoria, incluya anticuerpos elaborados por una célula no humana que tiene regiones variables y constantes que han sido alteradas para
45
parecerse más a anticuerpos elaborados por una célula humana. Por ejemplo, al alterar la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos no humanos para incorporar aminoácidos que se encuentran en secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden incluir
50
residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. El término «anticuerpo humanizado», tal como se usa en la presente memoria, también incluye anticuerpos en los que se injertaron, en secuencias marco humanas, secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos «región hipervariable», «HVR» o «HV» se refieren a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a secuencia y/o que forman bucles
55
estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel extraordinario al conferir una especificidad delicada a los anticuerpos. (Véase, por ejemplo, Xu et ál. (2000) Immunity 13, 37-45; Johnson y Wu en Methods in Molecular Biology 248, 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). Ciertamente, los anticuerpos camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de una cadena ligera (véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et ál. (1993) Nature 363:446-448 (1993) y Sheriff et ál. (1996) Nature Struct. Biol. 3, 733-736). El
60
término «célula inmunitaria» se refiere a las células que tienen una función importante en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias tienen origen hematopoyético e incluyen linfocitos tales como linfocitos B y linfocitos T;

linfocitos citolíticos naturales; células mieloides tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

El término «respuesta inmunitaria» incluye respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T y/o mediadas por linfocitos B que están influenciadas por la modulación de la coestimulación de linfocitos T. Las respuestas inmunitarias ilustrativas incluyen respuestas de los linfocitos T, por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad celular. Además, el término respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que están afectadas indirectamente por la activación de linfocitos T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células respondedoras de citocina, por ejemplo, macrófagos.

El término «inhibir» incluye la disminución, limitación o bloqueo, por ejemplo, de una acción, función o interacción particular. Por ejemplo, se «inhibe» el cáncer si se alivia, termina, enlentece o previene al menos un síntoma del cáncer tal como el crecimiento hiperproliferativo. Tal como se usa en la presente memoria, también se «inhibe» el cáncer si se reduce, enlentece, retrasa o previene la recurrencia o metástasis del cáncer.

El término «señal inhibidora» se refiere a una señal transmitida a través de un receptor inhibidor (por ejemplo, CTLA4 o PD-1) para un polipéptido en una célula inmunitaria. Dicha señal antagoniza una señal a través de un receptor de activación (por ejemplo, a través de un polipéptido TCR, CD3, BCR o Fc) y puede dar como resultado, por ejemplo, la inhibición de la segunda generación mensajera; una inhibición de la proliferación; una inhibición de la función efectora en la célula inmunitaria, por ejemplo, reducción de la fagocitosis, reducción de la producción de anticuerpos, reducción de la citotoxicidad celular, o la falta de producción de mediadores por parte de la célula inmunitaria (tal como citocinas (por ejemplo, IL-2) y/o mediadores de respuestas alérgicas); o el desarrollo de anergia.

El término «interacción», cuando se refiere a una interacción entre dos moléculas, se refiere al contacto físico (por ejemplo, unión) de las moléculas entre sí. Generalmente, dicha interacción da como resultado una actividad (que produce un efecto biológico) de una o ambas de dichas moléculas. La actividad puede ser una actividad directa de una o ambas moléculas (por ejemplo, transducción de señales). De manera alternativa, es posible impedir que una o ambas moléculas en la interacción se unan a su ligando y, por lo tanto, se mantengan inactivas con respecto a la actividad de unión del ligando (por ejemplo, unirse a su ligando y desencadenar o inhibir la coestimulación). La inhibición de dicha interacción da como resultado la interrupción de la actividad de una o más moléculas implicadas en la interacción. Potenciar dicha interacción es prolongar o aumentar la probabilidad de dicho contacto físico, y prolongar o aumentar la probabilidad de dicha actividad.

El término «proteína aislada» se refiere a una proteína sustancialmente libre de otras proteínas, material celular, medio de separación y medio de cultivo cuando se aísla de células o se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Una proteína «aislada» o «purificada», o parte biológicamente activa de esta se encuentra sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular a partir de la cual deriva el anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión «sustancialmente libre de material celular» incluye preparaciones de polipéptido, en las cuales la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las que se aísla o se produce de forma recombinante. En una realización, la expresión «sustancialmente libre de material celular» incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de proteína no deseada (también denominada en la presente memoria «proteína contaminante»), más preferiblemente, menos de aproximadamente 20 % de proteína no deseada, incluso más preferiblemente, menos de aproximadamente 10 % de proteína no deseada, y aun más preferiblemente, menos de aproximadamente 5 % de proteína no deseada. Cuando se produce de forma recombinante un anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión o parte biológicamente activa de esta, también se prefiere que se encuentre sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo represente menos de aproximadamente 20 %, más preferiblemente, menos de aproximadamente 10 %, y aun más preferiblemente, menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación de proteína.

El término «isotipo» se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) codificada por los genes de la región constante de cadena pesada.

El término « K_D » se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular. La afinidad de unión de los anticuerpos de la invención descrita puede medirse o determinarse mediante ensayos de anticuerpo-antígeno estándar, por ejemplo, ensayos competitivos, ensayos de saturación o inmunoensayos estándar tales como ELISA o RIA.

El término «modular» incluye la regulación por aumento y la regulación por disminución, por ejemplo, potenciar o inhibir una respuesta.

El término polipéptido de ácido nucleico de «origen natural» se refiere a un polipéptido de ADN o ARN que tiene una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

El nivel de expresión «normal» de un marcador es el nivel de expresión del marcador en las células de un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, no afectado por un cáncer. Una «sobreexpresión» o un «nivel de expresión significativamente mayor» de un marcador se refieren a un nivel de expresión en una muestra de prueba que es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión y es preferiblemente al menos dos veces, y más preferiblemente 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 veces mayor o más que la actividad o el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano que no tiene la enfermedad asociada al marcador), y preferiblemente, el nivel de expresión promedio del marcador en diversas muestras de control. Un «nivel de expresión significativamente menor» de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de prueba que es al menos dos veces, y más preferiblemente 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 veces menor o menos que el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano que no tiene la enfermedad asociada al marcador), y preferiblemente, el nivel de expresión promedio del marcador en diversas muestras de control.

El término «PD-1» se refiere a un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina que funciona como un receptor coinhibidor que tiene a PD-L1 y PD-L2 como ligandos conocidos. PD-1 se identificó previamente mediante el uso de un enfoque basado en clonación por sustracción para seleccionar proteínas involucradas en la muerte celular apoptótica. PD-1 es un miembro de la familia de moléculas CD28/CTLA-4 en función de su capacidad para unirse a PD-L1. Al igual que CTLA4, PD-1 se induce rápidamente en la superficie de los linfocitos T en respuesta a anti-CD3 (Agata et ál. 25 (1996) *Int. Immunol.* 8:765). Sin embargo, en contraste con CTLA4, PD-1 también se induce en la superficie de los linfocitos B (en respuesta a anti-IgM). PD-1 también se expresa en un subconjunto de linfocitos y células mieloides activados (Agata et ál. (1996) *supra*; Nishimura et ál. (1996) *Int. Immunol.* 8:773).

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de un biomarcador de PD-1 humano representativo se encuentran disponibles al público en la base de datos GenBank con los números NM_005018.2 y NP_005009.2 y se muestran en la Tabla 1 (véase también Ishida et ál. (1992) 20 *EMBO J* 11:3887; Shinohara et ál. (1994) *Genomics* 23:704; patente estadounidense 5,698,520). PD-1 tiene una región extracelular que contiene un dominio de la superfamilia de inmunoglobulina, un dominio transmembrana, y una región intracelular que incluye un motivo inhibidor basado en el inmunorreceptor tirosina (ITIM) (Ishida et ál. (1992) *EMBO J.* 11 :3887; Shinohara et ál. (1994) *Genomics* 23:704; patente estadounidense 5,698,520). Estos rasgos también definen una familia más grande de polipéptidos, denominados receptores inmunoinhibidores, que también incluyen gp49B, PIR-B, y los receptores inhibidores citolíticos (KIRs) (Vivier y Daeron (1997) *Immunol. Today* 18:286). A menudo se supone que el motivo ITIM fosforilado de tirosilo de estos receptores interactúa con fosfatasa que contienen dominios SH2, lo que conduce a señales inhibidoras. Un subconjunto de estos receptores inmunoinhibidores se une a polipéptidos MHC, por ejemplo, los KIR, y CTLA4 se unen a B7-1 y B7-2. Se ha propuesto que existe una relación filogenética entre los genes MHC y B7 (Henry et ál. (1999) *Immunol. Today* 20(6):285-8). Se conocen las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de los ortólogos de PD-1 en organismos no humanos, y estas incluyen, por ejemplo, PD-1 de ratón (NM_008798.2 y NP_032824.1), PD-1 de rata (NM_001106927.1 y NP_001100397.1), PD-1 de perro (XM_543338.3 y XP_543338.3), PD-1 de vaca (NM_001083506.1 y NP_001076975.1), y PD-1 de pollo (XM_422723.3 y XP_422723.2).

Los polipéptidos PD-1 son receptores inhibidores capaces de transmitir una señal inhibidora a una célula inmunitaria para inhibir de ese modo la función efectora de la célula inmunitaria, o son capaces de promover la coestimulación (por ejemplo, mediante inhibición competitiva) de las células inmunitarias, por ejemplo, cuando se encuentran presentes en forma monomérica soluble. Los miembros preferidos de la familia de PD-1 comparten identidad de secuencia con PD-1 y se unen a uno o más miembros de la familia B7, por ejemplo, B7-1; B7-2, ligando de PD-1, y/u otros polipéptidos en células presentadoras de antígenos.

El término «actividad de PD-1» incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 para modular una señal inhibidora en una célula inmunitaria activada, por ejemplo, al acoplarse a un ligando de PD-1 natural en una célula presentadora de antígenos. PD-1 transmite una señal inhibidora a una célula inmunitaria de manera similar a CTLA4. La modulación de una señal inhibidora en una célula inmunitaria provoca la modulación de la proliferación de, y/o la secreción de citocinas por, una célula inmunitaria. Por lo tanto, el término «actividad de PD-1» incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 para unirse a sus uno o más ligandos naturales, la capacidad para modular las señales coestimuladoras o inhibidoras de la célula inmunitaria, y la capacidad para modular la respuesta inmunitaria.

El término «ligando de PD-1» se refiere a los compañeros de unión del receptor de PD-1 e incluye tanto a PD-L1 (Freeman et ál. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027) como a PD-L2 (Latchman et ál. (2001) *Nat. Immunol.* 2:261). Existen al menos dos tipos de polipéptidos de ligandos de PD-1 humanos. Las proteínas de ligandos de PD-1 comprenden una secuencia señal, y un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio transmembrana, y una cola citoplasmática corta. Tanto PD-L1 (véase Freeman et ál. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027 para los datos de secuencia) como PD-L2 (véase Latchman et ál. (2001) *Nat. Immunol.* 2:261 para los datos de secuencia) son miembros de la familia de polipéptidos B7. Tanto PD-L1 como PD-L2 se expresan en la placenta, el bazo, los ganglios linfáticos, el timo y el corazón. Solo PD-L2 se expresa en el páncreas, el pulmón y el hígado, mientras que solo PD-L1 se expresa en el hígado fetal. Ambos ligandos de PD-1 están regulados por aumento en monocitos activados y células dendríticas.

Los ligandos de PD-1 comprenden una familia de polipéptidos que tienen determinados rasgos estructurales y funcionales conservados. Se pretende que el término «familia», cuando se usa para hacer referencia a proteínas o moléculas de ácido nucleico, signifique dos o más proteínas o moléculas de ácido nucleico con un motivo o dominio estructural común y con una homología de secuencia de aminoácidos o nucleótidos suficiente, tal como se define en la presente memoria. Los miembros de dicha familia pueden ser de origen natural o no natural y pueden ser de la misma especie o de especies diferentes. Por ejemplo, una familia puede contener una primera proteína de origen humano, así como otras proteínas de origen humano diferentes, o de manera alternativa, puede contener homólogos de origen no humano. Los miembros de una familia también pueden tener características funcionales comunes. Los ligandos de PD-1 son miembros de la familia de polipéptidos B7. El término «familia B7» o «polipéptidos B7», tal como se usa en la presente memoria, incluye polipéptidos coestimuladores que comparten homología de secuencia con los polipéptidos B7, por ejemplo, con B7-1, B7-2, B7h (Swallow et ál. (1999) *Immunity* 11:423), y/o ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2). Por ejemplo, B7-1 y B7-2 humanos comparten aproximadamente 26 % de identidad de secuencia de aminoácidos cuando se comparan mediante el uso del programa BLAST en NCBI con los parámetros predeterminados (matriz Blosom62 con penalizaciones de hueco configuradas en existencia 11 y extensión 1 (véase el sitio web de NCBI). El término familia B7 también incluye variantes de estos polipéptidos que son capaces de modular la función de las células inmunitarias. La familia de moléculas B7 comparte una serie de regiones conservadas que incluyen dominios de señal, dominios IgV y dominios IgC. Los dominios IgV y los dominios IgC son dominios miembros de la superfamilia de Ig reconocidos en la técnica. Estos dominios corresponden a unidades estructurales que tienen patrones de plegamiento diferentes denominados pliegues de Ig. Los pliegues de Ig se componen de un sándwich de dos láminas β , cada una consiste en cadenas β antiparalelas de 5-10 aminoácidos con un enlace disulfuro conservado entre las dos láminas en la mayoría, pero no todos, los dominios IgC de Ig, TCR y moléculas MHC, y comparten los mismos tipos de patrones de secuencia y se denominan conjunto C1 dentro de la superfamilia de Ig. Otros dominios IgC se encuentran dentro de otros conjuntos. Los dominios IgV también comparten patrones de secuencias y se denominan dominios del conjunto V. Los dominios IgV son más largos que los dominios IgC y forman un par adicional de cadenas β .

Los polipéptidos B7 preferidos son capaces de proporcionar señales coestimuladoras o inhibitoras a las células inmunitarias para promover o inhibir de ese modo las respuestas de las células inmunitarias. Por ejemplo, los miembros de la familia B7 que se unen a receptores coestimuladores aumentan la activación y proliferación de los linfocitos T, mientras que los miembros de la familia B7 que se unen a receptores inhibitoras reducen la coestimulación. Además, el mismo miembro de la familia B7 puede aumentar o disminuir la coestimulación de linfocitos T. Por ejemplo, cuando se une a un receptor coestimulador, el ligando de PD-1 puede inducir la coestimulación de las células inmunitarias o puede inhibir la coestimulación de las células inmunitarias, por ejemplo, cuando se encuentra presente en forma soluble. Cuando se unen a un receptor inhibidor, los polipéptidos del ligando de PD-1 pueden transmitir una señal inhibitoria a una célula inmunitaria. Los miembros de la familia B7 preferidos incluyen B7-1, B7-2, B7h, PD-L1 o PD-L2 y fragmentos o derivados solubles de estos. En una realización, los miembros de la familia B7 se unen a uno o más receptores en una célula inmunitaria, por ejemplo, CTLA4, CD28, ICOS, PD-1 y/u otros receptores y, dependiendo del receptor, tienen la capacidad de transmitir una señal inhibitoria o una señal coestimuladora a una célula inmunitaria, preferiblemente, un linfocito T.

La modulación de una señal coestimuladora provoca la modulación de la función efectora de una célula inmunitaria. Por lo tanto, el término «actividad del ligando de PD-1» incluye la capacidad de un polipéptido del ligando de PD-1 para unirse a sus uno o más receptores naturales (por ejemplo, PD-1 o B7-1), la capacidad para modular las señales coestimuladoras o inhibitoras de la célula inmunitaria, y la capacidad para modular la respuesta inmunitaria.

El término «PD-L1» se refiere a un ligando de PD-1 específico. Se han identificado dos formas de moléculas PD-L1 humanas. Una forma es un polipéptido soluble PD-L1 de origen natural, es decir, con un dominio hidrofílico corto y sin dominio transmembrana, y se denomina en la presente memoria PD-L1S (se muestra en la Tabla 1 como la SEQ ID NO: 4). La segunda forma es un polipéptido asociado a células, es decir, con un dominio transmembrana y citoplasmático, denominado en la presente memoria PD-L1M (se muestra en la SEQ ID NO: 6). Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de los biomarcadores de PD-L1 humanos representativos con respecto a PD-L1M también se encuentran disponibles en la base de datos GenBank con los números NM_014143.3 y NP_054862.1. Las proteínas PD-L1 comprenden una secuencia señal y un dominio IgV y un dominio IgC. La secuencia señal de la SEQ ID NO: 4 se muestra de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 18. La secuencia señal de la SEQ ID NO: 6 se muestra de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 18. El dominio IgV de la SEQ ID NO: 4 se muestra de aproximadamente el aminoácido 19 a aproximadamente el aminoácido 134 y el dominio IgV de la SEQ ID NO: 6 se muestra de aproximadamente el aminoácido 19 a aproximadamente el aminoácido 134. El dominio IgC de la SEQ ID NO: 4 se muestra de aproximadamente el aminoácido 135 a aproximadamente el aminoácido 227 y el dominio IgC de la SEQ ID NO: 6 se muestra de aproximadamente el aminoácido 135 a aproximadamente el aminoácido 227. La cola hidrofílica del PD-L1 ejemplificado en la SEQ ID NO: 4 comprende una cola hidrofílica que se muestra de aproximadamente el aminoácido 228 a aproximadamente el aminoácido 245. El polipéptido de PD-L1 ejemplificado en la SEQ ID NO: 6 comprende un dominio transmembrana que se muestra de aproximadamente el aminoácido 239 a aproximadamente el aminoácido 259 de la SEQ ID NO: 6 y un dominio citoplasmático que muestra 30 aminoácidos de aproximadamente el aminoácido 260 a aproximadamente el aminoácido 290 de la SEQ ID NO: 6. Además, se

conocen las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de los ortólogos de PD-L1 en organismos no humanos, y estas incluyen, por ejemplo, PD-L1 de ratón (NM_021893.3 y NP_068693.1), PD-L1 de rata (NM_001191954.1 y NP_001178883.1), PD-L1 de perro (XM_541302.3 y XP_541302.3), PD-L1 de vaca (NM_001163412.1 y NP_001156884.1), y PD-L1 de pollo (XM_424811.3 y XP_424811.3).

El término «PD-L2» se refiere a otro ligando de PD-1 específico. PD-L2 es un miembro de la familia B7 expresado en diversas APC, que incluyen células dendríticas, macrófagos y mastocitos derivados de la médula ósea (Zhong et ál. (2007) Eur. J. Immunol. 37:2405). PD-L2 expresado en APC es capaz de inhibir la activación de linfocitos T a través del enlace de PD-1, y coestimular la activación de linfocitos T a través de un mecanismo independiente de PD-1 (Shin et ál. (2005) J. Exp. Med. 201:1531). Además, el enlace de PD-L2 expresado en células dendríticas da como resultado un aumento de la supervivencia y expresión de las citocinas de células dendríticas (Radhakrishnan et ál. (2003) J. Immunol. 37:1827; Nguyen et ál. (2002) J. Exp. Med. 196:1393). Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de biomarcadores de PD-L2 humanos representativos (por ejemplo, las SEQ ID NO: 7 y 8) se conocen en la técnica y también se encuentran disponibles al público en la base de datos GenBank con los números NM_025239.3 y NP_079515.2. Las proteínas PD-L2 se caracterizan por elementos estructurales comunes. En algunas realizaciones, las proteínas PD-L2 incluyen al menos uno o más de los siguientes dominios: un dominio de péptido señal, un dominio transmembrana, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Por ejemplo, los aminoácidos 1-19 de la SEQ ID NO: 8 comprenden una secuencia de señal. Tal como se usa en la presente memoria, una «secuencia señal» o un «péptido señal» sirve para dirigir un polipéptido que contiene dicha secuencia a una bicapa lipídica, y se escinde en polipéptidos secretados y unidos a la membrana, e incluye un péptido que contiene aproximadamente 15 o más aminoácidos que se produce en el extremo N de los polipéptidos secretados y unidos a la membrana y que contiene una gran cantidad de residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Por ejemplo, una secuencia señal contiene al menos aproximadamente 10-30 residuos de aminoácidos, preferiblemente, aproximadamente 15-25 residuos de aminoácidos, más preferiblemente, aproximadamente 18-20 residuos de aminoácidos e, incluso más preferiblemente, aproximadamente 19 residuos de aminoácidos, y tiene al menos aproximadamente 35-65 %, preferiblemente, aproximadamente 38-50 % e, incluso más preferiblemente, aproximadamente 40-45 % de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (por ejemplo, valina, leucina, isoleucina o fenilalanina). En otra realización, los residuos de aminoácidos 220-243 del polipéptido PD-L2 humano natural y los residuos de aminoácidos 201-243 del polipéptido maduro comprenden un dominio transmembrana. Tal como se usa en la presente memoria, el término «dominio transmembrana» incluye una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos de longitud que abarca la membrana plasmática. Más preferiblemente, un dominio transmembrana incluye aproximadamente al menos 20, 25, 30, 35, 40 o 45 residuos de aminoácidos y abarca la membrana plasmática. Los dominios transmembrana son ricos en residuos hidrofóbicos y normalmente tienen una estructura helicoidal alfa. En una realización preferida, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de los aminoácidos de un dominio transmembrana son hidrofóbicos, por ejemplo, leucinas, isoleucinas, tirosinas o triptófanos. Los dominios transmembrana se describen, por ejemplo, en Zagotta, W. N. et ál. (1996) Annu. Rev. Neurosci. 19: 235-263. En incluso otra realización, los residuos de aminoácidos 20-120 del polipéptido PD-L2 humano natural y los residuos de aminoácidos 1-101 del polipéptido maduro comprenden un dominio IgV. Los residuos de aminoácidos 121-219 del polipéptido PD-L2 humano natural y los residuos de aminoácidos 102-200 del polipéptido maduro comprenden un dominio IgC. Tal como se usa en la presente memoria, los dominios IgV e IgC se reconocen en la técnica como dominios miembros de la superfamilia Ig. Estos dominios corresponden a unidades estructurales que tienen patrones de plegamiento diferentes denominados pliegues de Ig. Los pliegues de Ig están compuestos por un sándwich de dos láminas β , donde cada una consiste en cadenas β antiparalelas de 5-10 aminoácidos con un enlace disulfuro conservado entre las dos láminas en la mayoría de los dominios, pero no en todos. Los dominios IgC de moléculas Ig, TCR y MHC comparten los mismos tipos de patrones de secuencias y se denominan conjunto CI dentro de la superfamilia Ig. Otros dominios IgC se encuentran dentro de otros conjuntos. Los dominios IgV también comparten patrones de secuencias y se denominan dominios del conjunto V. Los dominios IgV son más largos que los dominios C y forman un par adicional de cadenas. En aun otra realización, los residuos de aminoácidos 1-219 del polipéptido PD-L2 humano natural y los residuos de aminoácidos 1-200 del polipéptido maduro comprenden un dominio extracelular. Tal como se usa en la presente memoria, el término «dominio extracelular» representa los aminoácidos del extremo N que se extienden como una cola desde la superficie de una célula. Un dominio extracelular de la presente invención incluye un dominio IgV y un dominio IgC, y puede incluir un dominio de péptido señal. En incluso otra realización, los residuos de aminoácidos 244-273 del polipéptido PD-L2 humano natural y los residuos de aminoácidos 225-273 del polipéptido maduro comprenden un dominio citoplasmático. Tal como se usa en la presente memoria, el término «dominio citoplasmático» representa los aminoácidos del extremo N que se extienden como una cola hacia el citoplasma de una célula. Además, se conocen las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de los ortólogos de PD-L2 en organismos no humanos, y estas incluyen, por ejemplo, PD-L2 de ratón (NM_021396.2 y NP_067371.1), PD-L2 de rata (NM_001107582.2 y NP_001101052.2), PD-L2 de perro (XM_847012.2 y XP_852105.2), PD-L2 de vaca (XM_586846.5 y XP_586846.3), y PD-L2 de chimpancé (XM_001140776.2 y XP_001140776.1).

El término «actividad de PD-L2» o «actividad biológica de PD-L2» o «actividad funcional de PD-L2» se refiere a una actividad ejercida por una proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico de PD-L2 sobre una célula o tejido que responde a PD-L2, o sobre un compañero de unión del polipéptido PD-L2, según se determina *in vivo* o *in vitro*, de acuerdo con las técnicas estándar. En una realización, una actividad de PD-L2 es una actividad directa, tal como

una asociación con un compañero de unión de PD-L2. Tal como se usa en la presente memoria, una «molécula diana» o un «compañero de unión» es una molécula con la cual se une o interactúa un polipéptido PD-L2 en la naturaleza, de modo que se logre la función mediada por PD-L2. En una realización ilustrativa, una molécula diana de PD-L2 el receptor RGMb. De manera alternativa, una actividad de PD-L2 es una actividad indirecta, tal como la actividad de señalización celular mediada por la interacción del polipéptido PD-L2 con su compañero de unión natural, por ejemplo, RGMb. En la presente memoria se describen las actividades biológicas de PD-L2. Por ejemplo, los polipéptidos PD-L2 de la presente invención pueden tener una o más de las siguientes actividades: 1) unirse a y/o modular la actividad del receptor RGMb, PD-1, u otros compañeros de unión natural de PD-L2, 2) modular la señalización intracelular o intercelular, 3) modular la activación de las células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, y 4) modular la respuesta inmunitaria de un organismo, por ejemplo, un ratón u organismo humano.

El término «subtipos de células de sangre periférica» se refiere a los tipos de células que se encuentran normalmente en la sangre periférica que incluyen, de modo no taxativo, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T, monocitos, linfocitos NK, granulocitos y linfocitos B.

El término «anticuerpo humano recombinante» incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de estos (que se describe adicionalmente más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes, humanos y (d) anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por otros medios que implican corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal y/o no germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o mutagénesis somática *in vivo* cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana y se relacionan con ellas, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término «RGMb» se refiere a un miembro anclado de glicosilofatidilinositol (GPI) de la familia de moléculas de guía repulsiva. Samad et ál. en JBC Papers 2005, Vol. 280, 14122-14129 describen la interacción entre RGMb y los receptores Tipo I y Tipo II de la proteína morfogenética ósea (BMP). Sin embargo, la interacción entre RGMb y PD-L2 no se conocía previamente. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de biomarcadores de RGMb humanos representativos (por ejemplo, las SEQ ID NO: 9 y 10) se conocen en la técnica y también se encuentran disponibles al público en la base de datos GenBank con los números NM_025239.3 y NP_079515.2. Las proteínas RGMb se caracterizan por elementos estructurales comunes. En algunas realizaciones, las proteínas RGMb comprenden dominios conservados con homología con respecto a notch-3, fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa tipo II beta, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina-2, trombospondina, precursor del receptor 3 de efrina tipo B y Slit-2, los cuales se conocen por influir en la orientación axonal, el crecimiento de neuritas y otras funciones de desarrollo neuronal. El extremo C de RGMb también contiene un dominio hidrofóbico que indica un anclaje GPI extracelular de 21 aminoácidos. Además, se conocen las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de los ortólogos de RGMb en organismos no humanos, y estas incluyen, por ejemplo, RGMb de ratón (NM_178615.3 y NP_848730.2), RGMb de chimpancé (XM_517848.3 y XP_517848.2), RGMb de vaca (XM_002689413.1 y XP_002689459.1), RGMb de pollo (XM_42860.3 y XP_424860.3), y RGMb de pez cebra (NM_001001727.1 y NP_001001727.1).

El término «muestra», usado para la detección o determinación de la presencia o el nivel de al menos un biomarcador se refiere típicamente a sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, deposición (por ejemplo, heces), lágrimas y cualquier otro fluido corporal (por ejemplo, tal como se describió anteriormente en la definición de «fluidos corporales») o una muestra de tejido (por ejemplo, biopsia) tal como un intestino delgado, una muestra de colon o un tejido de resección quirúrgica. En determinados ejemplos, el método de la presente invención comprende, además, obtener la muestra del individuo antes de detectar o determinar la presencia o el nivel de al menos un marcador en la muestra.

El término «molécula pequeña» es un término de la técnica e incluye moléculas que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 1000 o un peso molecular menor que aproximadamente 500. En una realización, las moléculas pequeñas no comprenden exclusivamente enlaces peptídicos. En otra realización, las moléculas pequeñas no son oligoméricas. Los compuestos de moléculas pequeñas ilustrativos que pueden seleccionarse por actividad incluyen, de modo no taxativo, péptidos, miméticos peptídicos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, policétidos) (Cane et ál. 1998. Science 282:63), y bibliotecas de extractos de productos naturales. En otra realización, los compuestos son compuestos orgánicos no peptídicos pequeños. En una realización adicional, una molécula pequeña no es biosintética.

El término «unión específica» se refiere a la unión del anticuerpo con un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) aproximadamente menor que 10⁻⁷ M, tal como aproximadamente menor que

- 5 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento de ensayo BIACORE® mediante el uso de Gal1 humano como analito y el anticuerpo como ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad de al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, o 10,0 veces mayor o más que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto al antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones «un anticuerpo que reconoce un antígeno» y «un anticuerpo específico para un antígeno» se usan de forma indistinta en la presente memoria con el término «un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno».
- 10 El término «sujeto» se refiere a cualquier animal, mamífero o ser humano sano, o a cualquier animal, mamífero o ser humano afectado con una afección de interés (por ejemplo, cáncer). El término «sujeto» puede intercambiarse con «paciente».
- 15 El término «sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos» incluye preparaciones de anticuerpos, polipéptidos, péptidos o proteínas de fusión en las cuales la proteína se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la expresión «sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos» incluye preparaciones de anticuerpos, polipéptidos, péptidos o proteínas de fusión con menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos que no sean anticuerpos, polipéptidos, péptidos o proteínas de fusión, más preferiblemente, menos de aproximadamente 20 % de precursores químicos o productos químicos que no sean anticuerpos, polipéptidos, péptidos o proteínas de fusión, incluso más preferiblemente, menos de aproximadamente 10 % de precursores químicos o productos químicos que no sean anticuerpos, polipéptidos, péptidos o proteínas de fusión, y aun más preferiblemente, menos de aproximadamente 5 % de precursores químicos o productos químicos que no sean anticuerpos, polipéptidos, péptidos o proteínas de fusión.
- 20 Un «polinucleótido transcrito» o una «transcripción de nucleótido» es un polinucleótido (por ejemplo, ARNm ARNhn, ADNc, miARN maduro, pre-miARN, pri-miARN, miARN*, anti-miARN o un sitio de unión de miARN, o una variante de estos o un análogo de dicho ARN o ADNc), que es complementario u homólogo con respecto a la totalidad o una parte de un ARNm maduro elaborado mediante la transcripción de un marcador de la invención y procesamiento post-transcripcional normal (por ejemplo, corte y empalme), si corresponde, de la transcripción de ARN, y transcripción inversa de la transcripción de ARN.
- 25 El término «linfocito T» incluye linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. El término linfocito T también incluye los linfocitos T auxiliares tipo 1 y los linfocitos T auxiliares tipo 2. El término «célula presentadora de antígenos» incluye células presentadoras de antígenos profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígenos (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos).
- 30 Una «subexpresión» o «un nivel de expresión o una cantidad de copias significativamente menor» de un marcador (por ejemplo, RGMb, PD-L2 o un marcador de señalización corriente debajo de estos) se refiere a un nivel de expresión o una cantidad de copias que es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión o la cantidad de copias, pero es, preferiblemente, al menos dos veces, y más preferiblemente, tres, cuatro, cinco o diez o más veces menor que el nivel de expresión o la cantidad de copias del marcador en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de un sujeto sano que no padece cáncer) y, preferiblemente, el nivel de expresión o cantidad de copias promedio del marcador en diversas muestras de control.
- 35 El término «vector» se refiere a un ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un «plásmido», que se refiere a un bucle de ADN de cadena doble circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y, de esa forma, se replican junto con el genoma hospedador. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que se encuentran unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan en la presente memoria «vectores de expresión recombinante» o simplemente «vectores de expresión». En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen encontrarse en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, «plásmido» y «vector» se pueden utilizar de forma indistinta, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con deficiencia de replicación), que cumplen funciones equivalentes.
- 40 El término «tolerancia» o «falta de respuesta» incluye la refractividad de las células, tales como células inmunitarias, a la estimulación, por ejemplo, estimulación a través de un receptor de activación o citocina. La falta de respuesta puede ocurrir, por ejemplo, debido a la exposición a inmunosupresores o a la exposición a altas dosis de antígeno. Diversos métodos independientes pueden inducir la tolerancia. Un mecanismo se denomina «anergia» y se define
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

como un estado en el cual las células persisten *in vivo* como células que no responden, en lugar de diferenciarse en células con funciones efectoras. Dicha refractividad, en general, es específica del antígeno y persiste después de que cesó la exposición al antígeno de tolerancia. Por ejemplo, la anergia en los linfocitos T se caracteriza por la falta de producción de citocina, por ejemplo, IL-2. La anergia en los linfocitos T se produce cuando los linfocitos T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (un receptor de linfocitos T o una señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, una nueva exposición de las células al mismo antígeno (aun si la nueva exposición se produce en presencia de un polipéptido coestimulador) da como resultado la incapacidad de producir citocinas y, por ende, la incapacidad de proliferar. Los linfocitos T anérgicos pueden, sin embargo, proliferar si se cultivan con citocinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de los linfocitos T puede observarse también mediante la falta de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T, según se mide mediante un ensayo ELISA o de proliferación mediante el uso de una línea celular indicadora. De manera alternativa, se puede usar una construcción génica indicadora. Por ejemplo, los linfocitos T anérgicos no son capaces de iniciar la transcripción del gen IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen IL-2 5' o por un multímero de la secuencia API que puede encontrarse dentro del potenciador (Kang et ál. (1992) Science 257:1134). Otro mecanismo se conoce como «agotamiento». Un agotamiento de linfocitos T es un estado de disfunción de linfocitos T que surge durante muchas infecciones crónicas y el cáncer. Se define mediante una función efectora débil, una expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional diferente de aquel de los linfocitos T de memoria o efectores funcionales.

Existe una correspondencia conocida y evidente entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias de nucleótidos que pueden codificar la proteína, según lo define el código genético (que se muestra a continuación). Del mismo modo, existe una correspondencia conocida y evidente entre la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico particular y la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico, según lo define el código genético.

CÓDIGO GENÉTICO

Alanina (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
Arginina (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
Asparagina (Asn, N)	AAC, AAT
Ácido aspártico (Asp, D)	GAC, GAT
Cisteína (Cys, C)	TGC, TGT
Ácido glutámico (Glu, E)	GAA, GAG
Glutamina (Gln, Q)	CAA, CAG
Glicina (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidina (His, H)	CAC, CAT
Isoleucina (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
Leucina (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lisina (Lys, K)	AAA, AAG
Metionina (Met, M)	ATG
Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
Triptófano (Trp, W)	TGG
Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
Señal de terminación (final)	TAA, TAG, TGA

Una característica conocida e importante del código genético es su redundancia, por lo cual, para la mayoría de los aminoácidos usados para elaborar proteínas, puede emplearse más de un triplete de nucleótidos de codificación (ilustrados anteriormente). Por lo tanto, una cantidad de secuencias de nucleótidos diferentes pueden codificar una secuencia de aminoácidos dada. Dichas secuencias de nucleótidos se consideran funcionalmente equivalentes dado que dan como resultado la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (aunque determinados organismos pueden traducir algunas secuencias de forma más eficiente que otros). Además, ocasionalmente, una variante metilada de una purina o pirimidina pueden encontrarse en una secuencia de nucleótidos dada. Dichas metilaciones no afectan la relación de codificación entre el codón trinucleotídico y el aminoácido correspondiente.

En virtud de lo anterior, es posible usar la secuencia de nucleótidos de un ADN o ARN que codifica una proteína de fusión o un polipéptido de la invención (o cualquier parte de estos) para derivar la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión o el polipéptido, mediante el uso del código genético para traducir el ADN o ARN en una secuencia de aminoácidos. Del mismo modo, para una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión o el polipéptido, es posible deducir las secuencias de nucleótidos correspondientes que pueden codificar la proteína de fusión o el polipéptido, a partir del código genético (que, debido a su redundancia, producirá múltiples secuencias de ácido nucleico para cualquier secuencia de aminoácidos dada). Por lo tanto, debe considerarse que la descripción y/o divulgación en la presente memoria de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión o un

polipéptido también incluye la descripción y/o divulgación de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. De manera similar, debe considerarse que la descripción y/o divulgación de una secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión o un polipéptido en la presente memoria también incluye la descripción y/o divulgación de todas las secuencias de nucleótidos posibles que pueden codificar la secuencia de aminoácidos.

5

Finalmente, la información de la secuencia de ácido nucleico y aminoácidos para las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos útiles en la presente invención se conocen en la técnica y se encuentran disponibles en bases de datos disponibles al público tales como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Por ejemplo, en la Tabla 1 a continuación se proporcionan secuencias de ácido nucleico y aminoácidos ilustrativas derivadas de bases de datos de secuencias disponibles al público.

10

Tabla 1

SEQ ID NO: 1 Secuencia de ADNc de PD-1 humano

cactctgggtg gggctgctcc aggc atg cag atc cca cag gcg ccc tgg cca	51
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro	
1 5	
gtc gtc tgg gcg gtg cta caa ctg ggc tgg cgg cca gga tgg ttc tta	99
Val Val Trp Ala Val Leu Gln Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu	
10 15 20 25	
gac tcc cca gac agg ccc tgg aac ccc ccc acc ttc tcc cca gcc ctg	147
Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu	
30 35 40	
ctc gtg gtg acc gaa ggg gac aac gcc acc ttc acc tgc agc ttc tcc	195
Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser	
45 50 55	
aac aca tgc gag agc ttc gtg cta aac tgg tac cgc atg agc ccc agc	243
Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser	
60 65 70	
aac cag acg gac aag ctg gcc gcc ttc ccc gag gac cgc agc cag ccc	291
Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro	
75 80 85	
ggc cag gac tgc cgc ttc cgt gtc aca caa ctg ccc aac ggg cgt gac	339
Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp	
90 95 100 105	
ttc cac atg agc gtg gtc agg gcc cgg cgc aat gac agc ggc acc tac	387
Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr	
110 115 120	
ctc tgt ggg gcc atc tcc ctg gcc ccc aag gcg cag atc aaa gag agc	435
Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser	
125 130 135	
ctg cgg gca gag ctc agg gtg aca gag aga agg gca gaa gtg ccc aca	483
Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr	
140 145 150	
gcc cac ccc agc ccc tca ccc agg tca gcc gcc cag ttc caa acc ctg	531
Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Ser Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu	
155 160 165	
gtg gtt ggt gtc gtg ggc gcc ctg ctg gcc agc ctg gtg ctg cta gtc	579
Val Val Gly Val Val Gly Glu Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val	
170 175 180 185	
tgg gtc ctg gcc gtc atc tgc tcc cgg gcc gca cga ggg aca ata gga	627
Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly	
190 195 200	
gcc agg cgc acc ggc cag ccc ctg aag gag gac ccc tca gcc gtg cct	675
Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro	
205 210 215	
gtg ttc tct gtg gac tat ggg gag ctg gat ttc cag tgg cga gag aag	723
Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys	
220 225 230	
acc ccg gag ccc ccc gtg ccc tgt gtc cct gag cag acg gag tat gcc	771
Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala	
235 240 245	
acc att gtc ttt cct agc gga atg gcc acc tca tcc ccc gcc cgc agg	819
Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg	
250 255 260 265	
ggc tca gct gac ggc cct cgg agt gcc cag cca ctg agg cct gag gat	867
Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp	
270 275 280	
gga cac tgc tct tgg ccc ctc tgaccggctt ccttgccac cagtgtctg cag	921
Gly His Cys Ser Trp Pro Leu	
285	

SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos de PD-1 humano

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

SEQ ID NO: 3 Secuencia de ácido de ADN de PD-L1S humano

gcttcccgag	gctccgcacc	agccgcgctt	ctgtccgcct	gcagggcatt	ccagaaag	58
atg agg ata ttt gct gtc ttt ata ttc atg acc tac tgg cat ttg ctg	106					
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu						
1		5		10		15
aac gca ttt act gtc acg gtt ccc aag gac cta tat gtg gta gag tat	154					
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr						
	20			25		30
ggt agc aat atg aca att gaa tgc aaa ttc cca gta gaa aaa caa tta	202					
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu						
	35			40		45
gac ctg gct gca cta att gtc tat tgg gaa atg gag gat aag aac att	250					
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile						
	50			55		60
att caa ttt gtg cat gga gag gaa gac ctg aag gtt cag cat agt agc	298					
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser						
	65			70		75
tac aga cag agg gcc cgg ctg ttg aag gac cag ctc tcc ctg gga aat	346					
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn						
	85			90		95
gct gca ctt cag atc aca gat gtg aaa ttg cag gat gca ggg gtg tac	394					
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr						
	100			105		110
cgc tgc atg atc agc tat ggt ggt gcc gac tac aag cga att act gtg	442					
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val						
	115			120		125
aaa gtc aat gcc cca tac aac aaa atc aac caa aga att ttg gtt gtg	490					
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val						

ES 2 771 324 T3

```

      130              135              140
gat cca gtc acc tct gaa cat gaa ctg aca tgt cag gct gag ggc tac 538
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145              150              155              160
ccc aag gcc gaa gtc atc tgg aca agc agt gac cat caa gtc ctg agt 586
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
      165              170              175
ggt aag acc acc acc acc aat tcc aag aga gag gag aag ctt ttc aat 634
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
      180              185              190
gtg acc agc aca ctg aga atc aac aca aca act aat gag att ttc tac 682
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
      195              200              205
tgc act ttt agg aga tta gat cct gag gaa aac cat aca gct gaa ttg 730
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
      210              215              220
gtc atc cca ggt aat att ctg aat gtg tcc att aaa ata tgt cta aca 778
Val Ile Pro Gly Asn Ile Leu Asn Val Ser Ile Lys Ile Cys Leu Thr
      225              230              235              240
ctg tcc cct agc acc tagcatgatg tctgcctatc atagtcattc agtgattgtt 833
Leu Ser Pro Ser Thr
      245
gaataaatga atgaatgaat aacactatgt ttacaaaata tctcctaatt cctcacctcc 893
attcatccaa accatattgt tacttaataa acattcagca gatatttatg gaataaaaaa 953
aaaaaaaaaa aaaaaa 968

```

SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos de PD-L1S humano

```

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

```

SEQ ID NO: 5 Secuencia de ácido de ADNc de PD-L1M humano

```

cgaggetccg caccagccgc gcttctgtcc gcctgcaggg cattccagaa agatgagg 58
                                     Met Arg
                                     1
ata ttt gct gtc ttt ata ttc atg acc tac tgg cat ttg ctg aac gca 106
Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala
5 10 15
ttt act gtc acg gtt ccc aag gac cta tat gtg gta gag tat ggt agc 154
Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
20 25 30
aat atg aca att gaa tgc aaa ttc cca gta gaa aaa caa tta gac ctg 202
Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
35 40 45 50
gct gca cta att gtc tat tgg gaa atg gag gat aag aac att att caa 250
Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
55 60 65
ttt gtg cat gga gag gaa gac ctg aag gtt cag cat agt agc tac aga 298
Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
70 75 80
cag agg gcc cgg ctg ttg aag gac cag ctg tcc ctg gga aat gct gca 346
Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
85 90 95
ctt cag atc aca gat gtg aaa ttg cag gat gca ggg gtg tac cgc tgc 394
Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
100 105 110
atg atc agc tat ggt ggt gcc gac tac aag cga att act gtg aaa gtc 442
Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
115 120 125 130
aat gcc cca tac aac aaa atc aac caa aga att ttg gtt gtg gat cca 490
Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
135 140 145
gtc acc tct gaa cat gaa ctg aca tgt cag gct gag ggc tac ccc aag 538
Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
150 155 160
gcc gaa gtc atc tgg aca agc agt gac cat caa gtc ctg agt ggt aag 586
Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
165 170 175
acc acc acc acc aat tcc aag aga gag gag aag ctt ttc aat gtg acc 634
Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
180 185 190
agc aca ctg aga atc aac aca aca act aat gag att ttc tac tgc act 682
Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
195 200 205 210
ttt agg aga tta gat cct gag gaa aac cat aca gct gaa ttg gtc atc 730
Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
215 220 225
cca gaa cta cct ctg gca cat cct cca aat gaa agg act cac ttg gta 778
Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
230 235 240
att ctg gga gcc atc tta tta tgc ctt ggt gta gca ctg aca ttc atc 826
Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
245 250 255
ttc cgt tta aga aaa ggg aga atg atg gat gtg aaa aaa tgt ggc atc 874
Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
260 265 270
caa gat aca aac tca aag aag caa agt gat aca cat ttg gag gag acg 922
Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
275 280 285 290
taatccagca ttggaacttc tgatcttcaa gcagggatcc tcaacctgtg gtttaggggt 982
tcacgggggc tgagcgtgac aagaggaagg aatgggcccg tgggatgcag gcaatgtggg 1042
acttaaaagg cccaagcact gaaaatggaa cctggcgaaa gcagaggagg agaatgaaga 1102
aagatggagt caaacaggga gcctggaggg agaccttgat actttcaaat gcctgagggg 1162
ctcatcgacg cctgtgacag ggagaaagga tacttttgaa caaggagcct ccaagcaaat 1222

```

```

catccattgc tcatcctagg aagaacgggtt gagaatccct aatttgaggg tcagttccctg 1282
cagaagtgcc ctttgcctcc actcaatgcc tcaatttggt ttctgcatga ctgagagtct 1342
cagtgttggg aacgggacagt atttatgtat gagtttttcc tatttatttt gagtctgtga 1402
ggtcttcttg tcatgtgagt gtggttgtga atgatttctt ttgaagatat attgtagtag 1462
atgttacaat ttgtgcgcca aactaaactt gctgcttaat gatttgcctc catctagtaa 1522
aacatggagt atttgtaaaa aaaaaaaaaa a                                     1553

```

SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos de PD-L1M humano

```

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

```

SEQ ID NO: 7 Secuencia de ácido de ADNc de PD-L2 humano

```

atg atc ttc ctc ctg cta atg ttg agc ctg gaa ttg cag ctt cac cag 48
Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1      5      10      15
ata gca gct tta ttc aca gtg aca gtc cct aag gaa ctg tac ata ata 96
Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20     25     30
gag cat ggc agc aat gtg acc ctg gaa tgc aac ttt gac act gga agt 144
Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
35     40     45
cat gtg aac ctt gga gca ata aca gcc agt ttg caa aag gtg gaa aat 192
His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50     55     60

```

ES 2 771 324 T3

```

gat aca tcc cca cac cgt gaa aga gcc act ttg ctg gag gag cag ctg 240
Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80
ccc cta ggg aag gcc tgc ttc cac ata cct caa gtc caa gtg agg gac 288
Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
85 90 95
gaa gga cag tac caa tgc ata atc atc tat ggg gtc gcc tgg gac tac 336
Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
100 105 110
aag tac ctg act ctg aaa gtc aaa gct tcc tac agg aaa ata aac act 384
Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
115 120 125
cac atc cta aag gtt cca gaa aca gat gag gta gag ctc acc tgc cag 432
His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
130 135 140
gct aca ggt tat cct ctg gca gaa gta tcc tgg cca aac gtc agc gtt 480
Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
145 150 155 160
cct gcc aac acc agc cac tcc agg acc cct gaa ggc ctc tac cag gtc 528
Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175
acc agt gtt ctg cgc cta aag cca ccc cct ggc aga aac ttc agc tgt 576
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190
gtg ttc tgg aat act cac gtg agg gaa ctt act ttg gcc agc att gac 624
Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205
ctt caa agt cag atg gaa ccc agg acc cat cca act tgg ctg ctt cac 672
Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
210 215 220
att ttc atc ccc tcc tgc atc att gct ttc att ttc ata gcc aca gtg 720
Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240
ata gcc cta aga aaa caa ctc tgt caa aag ctg tat tct tca aaa gac 768
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255
aca aca aaa aga cct gtc acc aca aca aag agg gaa gtg aac agt gct 816
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270
atc 819
Ile

```

SEQ ID NO: 8 Secuencia de aminoácidos de PD-L2 humano

```

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

```

Ala	Thr	Gly	Tyr	Pro	Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Trp	Pro	Asn	Val	Ser	Val
145					150					155					160
Pro	Ala	Asn	Thr	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val
				165					170					175	
Thr	Ser	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Pro	Pro	Gly	Arg	Asn	Phe	Ser	Cys
			180					185					190		
Val	Phe	Trp	Asn	Thr	His	Val	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp
		195					200					205			
Leu	Gln	Ser	Gln	Met	Glu	Pro	Arg	Thr	His	Pro	Thr	Trp	Leu	Leu	His
	210					215					220				
Ile	Phe	Ile	Pro	Ser	Cys	Ile	Ile	Ala	Phe	Ile	Phe	Ile	Ala	Thr	Val
225					230					235					240
Ile	Ala	Leu	Arg	Lys	Gln	Leu	Cys	Gln	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Asp
				245					250					255	
Thr	Thr	Lys	Arg	Pro	Val	Thr	Thr	Thr	Lys	Arg	Glu	Val	Asn	Ser	Ala
			260					265					270		
Ile															

SEQ ID NO: 9 Secuencia de ADNc de RGMb humano

```

1 atgataagga agaagaggaa gcaagagcgc ccccccggcc catgcccag ccacggggccc
61 agaccgcgca cggcgccgc gccgcgcgc tcgcgggagc ccacgagacc tgcattggagc
121 ggcattgggt tgagagcagc accttcacgc gccgcgcgc cgcgcgcgca ggttgagcag
181 cgcgcgcgca cggcgctctg ccccccggcc ctggagctgc tgcctgctgc gctgttcagc
241 ctgcggctgc tccacgcagg tgactgcgaa cagccagccc aatgtcgaat ccagaaatgc
301 accacggaat tgcgtgcctt gacttctcac ctgaactctg ccgttgacgg ctttgactct
361 gagtttttga aggccttgcc tgcctatgct ggctgcaccc agcgaacttc aaaagcctgc
421 cgtgggcaacc tggatatacca ttctgcgcgt ttgggtatca gtgacctcat gagccagagg
481 aattgttcca aggatggacc cactatctct accaaccocg aagtgaacca tgatccttgc
541 aactatcaca gccacgcctg agccagggaa cacaggagag gggaccagaa cctccacgt
601 tacctttttt gtggcttggt tggagatcct cactcagaa ctttcaagga taacttccaa
661 acatgcgcaa tagaaggggc ctggccactc atagataata attatctttc agttcaagtg
721 acaaacgtac ctgtggtccc tggatccagt gctactgcta caaataagat cactattatc
781 ttcaaagccc accatgagtg tacagatcag aaagtctacc aagctgtgac agatgacctg
841 cccgcgcgct ttgtggatgg caccaccagt ggtggggaca gcgatgccaa gagcctgctg
901 atcgtggaaa gggagagtg ccactatgtg gagatgcacg cccgctatat agggaccaca
961 gtgttttctg gccaggtggg tgcctacctg acccttgcca tccgtatgcc tgaagaacctg
1021 gccatgtcct acgaggagag ccaggacctg cagctgtgag tgaacggctg ccccttgagt
1081 gaacgcctcg atgacgggca gggccagggt tctgccatcc tgggacacag cctgcctcgc
1141 acctccttgg tgcaggcctg gcctgtctac acactggaga ctgccaacac tcaatgccat
1201 gagaagatgc cagtgaagga catctatttc cagtcctgtg tcttcgacct gctcaccact
1261 ggtgatgcca acttttactgc cgcagcccac agtgccttgg aggatgtgga ggcctgcac
1321 ccaaggaagg aacgctggca cattttccc agcagtggca atgggaactc ccgtggaggc
1381 agtgatttgt ctgtcagctt aggaactcac tgccttgatc ttatcgtgtt tttgtag

```

SEQ ID NO: 10 Secuencia de aminoácidos de RGMb humano

```

1 mirkkkrksa ppgpcrshgp rpatapappp speptrpawt qmgiraapss aaaaaaeveq
61 rrspglcpgp llllllllfs lgllhagdcq qpqorigkq ttidfvalts hlnsavgfde
121 efckalraya gctqrtskac rgnlvysav lgisdllmsq ncskdqptss tnpevthdpc
181 nyhshagare hrrgdqapp ylfeglfqdp hlrtfkdnfq tckvegawpl idnnylsvqv
241 tnvpvvpqss atatnkitii fkahhectdq kvvgavtdcl paafvdgtts ggdcdaksir
301 iveresghyv emharyigt vfvrvqgryl tclairpedl amsyeesqdl qlcvngcpis
361 eriddgqqqv sailghslpr tslvqawpgy tletantqch ekmpvkdiyf qscvfdlltt
421 gdanftaaah saledvealh prkerwhifp ssngtprgg sdlsvsiglt clilivfl

```

10 II. Agentes que modulan la activación de células inmunitarias

En la presente memoria se demuestra que PD-L2 se une a RGMb y PD-1, aunque la unión de RGMb a PD-L2 es más débil que la de PD-L2 a PD-1. Por lo tanto, los agentes de la presente invención descritos en la presente memoria que modulan la interacción entre RGMb y PD-1, ya sea de forma directa o indirecta, pueden regular por aumento o por disminución el sistema inmunitario y, por lo tanto, regular por aumento o por disminución una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, la interacción entre RGMb y PD-L2 da como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria. Los agentes que modulan dicha interacción pueden hacerlo de forma directa o indirecta.

La interacción entre un polipéptido RGMb y un polipéptido PD-L2 da como resultado la transmisión de una señal inmunitaria coinhibidora. Por lo tanto, en una realización, los agentes que bloquean directamente la interacción entre RGMb y PD-L2 (por ejemplo, anticuerpos de bloqueo anti-RGMb y/o anti-PD-L2) pueden prevenir la señalización inhibidora y regular por aumento una respuesta inmunitaria. De manera alternativa, los agentes que bloquean indirectamente la interacción entre RGMb y PD-L2 pueden prevenir la señalización inhibidora y regular por aumento una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, PD-L2, al unirse a un polipéptido PD-1 reduce indirectamente la concentración efectiva del polipéptido PD-L2 disponible para unirse a RGMb. Los agentes ilustrativos para regular por aumento una respuesta inmunitaria incluyen anticuerpos contra RGMb o PD-L2 que bloquean la interacción entre RGMb y PD-L2; una forma no activadora de RGMb o PD-L2 (por ejemplo, un polipéptido negativo dominante), péptidos o moléculas pequeñas que bloquean la interacción entre RGMb y PD-L2; proteínas de fusión (por ejemplo, la parte extracelular de RGMb o PD-L2 fusionada a la parte Fc de un anticuerpo o inmunoglobulina) que se unen a RGMb o PD-L2 e inhiben la interacción entre RGMb y PD-L2; moléculas de ácido nucleico que bloquean la traducción o transcripción de RGMb y/o PD-L2; una forma no activadora de un ligando de RGMb natural, una forma soluble de un ligando de RGMb natural, y una proteína de fusión del ligando de RGMb natural. Los ligandos de RGMb naturales se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, los receptores BMP2, BMP4 y BMP (Samad et ál. (2005) J. Biol. Chem. 280:14122-1412).

En otra realización, los agentes que promueven la unión de un polipéptido RGMb con un polipéptido PD-L2 promueven una señal inhibidora hacia una célula inmunitaria. Los agentes que modulan dicha interacción pueden hacerlo de forma directa o indirecta. Por lo tanto, en una realización, los agentes que potencian directamente la interacción entre RGMb y PD-L2 (agonistas de RGMb y/o agonistas de PD-L2) pueden promover la señalización inhibidora y regular por disminución una respuesta inmunitaria. De manera alternativa, los agentes que bloquean la unión de PD-L2 a PD-1 aumentan la concentración de PD-L2 disponible para unirse a RGMb. Los agentes ilustrativos para la regulación por disminución de una respuesta inmunitaria incluyen anticuerpos contra RGMb o PD-L2 que activan o promueven la interacción entre RGMb y PD-L2; péptidos o moléculas pequeñas que activan o promueven la interacción entre RGMb y PD-L2; y anticuerpos de bloqueo que se unen a PD-1 e inhiben la interacción entre PD-1 y PD-L2.

Los agentes útiles en los métodos de la presente invención incluyen anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, miméticos peptídicos, ligandos naturales y derivados de ligandos naturales, que pueden unirse y/o activar o inhibir los biomarcadores de proteínas de la invención, que incluyen los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos; ARN interferente, aptámeros de ácido nucleico antisentido, etc. que pueden regular por disminución la expresión y/o actividad de los biomarcadores de la invención, que incluyen los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos.

En una realización, moléculas de ácido nucleico aisladas que se hibridan específicamente o codifican uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o partes biológicamente activas de estos. Tal como se usa en la presente memoria, se pretende que el término «molécula de ácido nucleico» incluya moléculas de ADN (es decir ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (es decir, ARNm) y análogos de ADN o ARN generados mediante el uso de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena simple o de cadena doble, pero preferiblemente, es ADN de cadena doble. Una molécula de ácido nucleico «aislada» es una molécula separada de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico «aislado» carece de las secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas correspondientes a los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual deriva el ácido nucleico (es decir, una célula de linfoma). Además, una molécula de ácido nucleico «aislada», tal como una molécula de ADNc, puede carecer sustancialmente de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Es posible aislar una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido que tiene la secuencia de nucleótidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 50 %, preferiblemente, al menos aproximadamente 60 %, más preferiblemente, al menos aproximadamente 70 %, aun más preferiblemente, al menos aproximadamente 80 %, incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 90 %, y aun más preferiblemente, al menos aproximadamente 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente 98 %) homóloga con la secuencia de nucleótidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o una parte de estos (es decir, 100, 200, 300, 400, 450, 500 o más nucleótidos), mediante el uso de técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada en la presente memoria. Por ejemplo, es posible aislar un ADNc humano a partir de una línea de células humanas (de Stratagene, LaJolla, CA, o Clontech, Palo Alto, CA) mediante el uso de la totalidad o una parte de la molécula de ácido nucleico, o un fragmento de esta, como una sonda de hibridación y técnicas de hibridación estándar (es decir, tal como se describe en Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además, es posible aislar una molécula de ácido nucleico que comprende la totalidad o una

parte de la secuencia de nucleótidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 50 %, preferiblemente, al menos aproximadamente 60 %, más preferiblemente, al menos aproximadamente 70 %, aun más preferiblemente, al menos aproximadamente 80 %, incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 90 %, y aun más preferiblemente, al menos aproximadamente 95 % o más homóloga con la secuencia de nucleótidos, o fragmento de esta, mediante la reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de cebadores de oligonucleótidos diseñados en función de la secuencia de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos, o la secuencia de nucleótidos homóloga. Por ejemplo, el ARNm puede aislarse de células musculares (es decir, mediante el procedimiento de extracción con guanidinio-tiocianato de Chirgwin et ál. (1979) *Biochemistry* 18: 5294-5299) y el ADNc puede prepararse mediante el uso de transcriptasa inversa (es decir, transcriptasa inversa de Moloney MLV disponible en Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa AMV disponible en Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación por PCR pueden diseñarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse mediante el uso de ADNc o, de manera alternativa, ADN genómico, como una plantilla, y cebadores de oligonucleótidos adecuados de acuerdo con técnicas de amplificación por PCR estándar. El ácido nucleico amplificado de este modo se puede clonar en un vector adecuado y caracterizarse mediante un análisis de la secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de nucleótidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden prepararse mediante técnicas de síntesis estándar, es decir, mediante el uso de un sintetizador de ADN automático.

Las sondas basadas en las secuencias de nucleótidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden usarse para detectar o confirmar las transcripciones deseadas o secuencias genómicas que las codifican o proteínas homólogas. En realizaciones preferidas, la sonda comprende, además, un grupo de etiquetas unido a ella, es decir, el grupo de etiquetas puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas pueden usarse como parte de un kit de pruebas de diagnóstico para identificar las células o el tejido que expresan uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, tal como al medir un nivel de uno o más ácidos nucleicos biomarcadores en una muestra de células de un sujeto, es decir, detectar los niveles de ARNm de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

También se contemplan las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas correspondientes a uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 de diferentes especies. Por ejemplo, el ADNc de rata o mono puede identificarse en función de la secuencia de nucleótidos de una secuencia humana y/o de ratón y dichas secuencias se conocen en la técnica. En una realización, las una o más moléculas de ácido nucleico de la invención codifican una proteína o parte de esta que incluye una secuencia de aminoácidos que es suficientemente homóloga con una secuencia de aminoácidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, de modo que la proteína o parte de esta modula (por ejemplo, potencia) una o más de las siguientes actividades biológicas: a) unión al biomarcador; b) modulación de la cantidad de copias del biomarcador; c) modulación del nivel de expresión del biomarcador; y d) modulación del nivel de actividad del biomarcador.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión «suficientemente homóloga» se refiere a proteínas o partes de estas que tienen secuencias de aminoácidos que incluyen una cantidad mínima de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar que un residuo de aminoácido en uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento de este) con respecto a una secuencia de aminoácidos del biomarcador, o fragmento de este, de modo que la proteína o parte de esta modula (por ejemplo, potencia) una o más de las siguientes actividades biológicas: a) unión al biomarcador; b) modulación de la cantidad de copias del biomarcador; c) modulación del nivel de expresión del biomarcador; y d) modulación del nivel de actividad del biomarcador.

En otra realización, la proteína es al menos aproximadamente 50 %, preferiblemente, al menos aproximadamente 60 %, más preferiblemente, al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más, homóloga con respecto a la secuencia de aminoácidos completa del biomarcador, o un fragmento de este.

Las partes de las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de los uno o más biomarcadores enumerados en las Tablas 1-9 son, preferiblemente, partes biológicamente activas de la proteína. Tal como se usa en la presente memoria, se pretende que el término «parte biológicamente activa» de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 incluya una parte, por ejemplo, un dominio/motivo que tiene una o más de las actividades biológicas de la proteína de longitud completa.

Es posible llevar a cabo ensayos de unión estándar, por ejemplo, inmunoprecipitaciones y ensayos de dos híbridos de levadura, tal como se describen en la presente memoria, o ensayos funcionales, por ejemplo, experimentos de sobreexpresión o iARN, para determinar la capacidad de la proteína o un fragmento biológicamente activo de esta para mantener una actividad biológica de la proteína de longitud completa.

La invención comprende, además, moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de estos debido a la degeneración del código

genético y, por lo tanto, codifican la misma proteína que codifica la secuencia de nucleótidos, o fragmento de esta. En otra realización, una molécula de ácido nucleico de la invención tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de estos, o una proteína con una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más, homóloga con respecto a la secuencia de aminoácidos de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de estos. En otra realización, un ácido nucleico que codifica un polipéptido consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de un fragmento de interés de longitud completa que es menor que 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, o 70 aminoácidos de longitud.

Los expertos en la técnica apreciarán que los polimorfismos de la secuencia de ADN que provocan cambios en las secuencias de aminoácidos de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden existir dentro de una población (por ejemplo, una población de mamíferos y/o seres humanos). Dichos polimorfismos genéticos pueden existir entre individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Tal como se usan en la presente memoria, los términos «gen» o «gen recombinante» se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, preferiblemente, una proteína de mamífero, por ejemplo, de ser humano. Dichas variaciones alélicas naturales, típicamente, pueden dar como resultado una varianza de 1-5 % en la secuencia de nucleótidos de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Se pretende que el alcance de la invención comprenda cualesquiera y todas dichas variaciones y polimorfismos de aminoácidos resultantes en los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, provocados por la variación alélica natural, y que no alteran la actividad funcional de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 proteínas de otras especies.

Además de las variantes alélicas naturales de los uno o más biomarcadores enumerados en la secuencia de la Tabla 1 que pueden existir en la población, el experto en la técnica apreciará, además, que pueden introducirse cambios mediante mutación en la secuencia de nucleótidos, o un fragmento de esta, provocando de ese modo cambios en la secuencia de aminoácidos de los uno o más biomarcadores codificados enumerados en la Tabla 1, sin alterar la capacidad funcional de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos provocan que puedan hacerse sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos «no esenciales» en la secuencia, o fragmento de esta. Un residuo de aminoácido «no esencial» es un residuo que puede alterarse con respecto a la secuencia de tipo salvaje de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, sin alterar la capacidad funcional de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, mientras que se requiere un residuo de aminoácido «esencial» para la actividad de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Sin embargo, es posible que otros residuos de aminoácidos (por ejemplo, los que no están conservados o solo semiconservados entre ratones y humanos) no sean esenciales para la actividad y, por lo tanto, es probable que sean susceptibles de alteración sin alterar la actividad de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

El término «identidad u homología de secuencia» se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptido o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad de monómero de aminoácido o base, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas o idénticas en cuanto a secuencia en esa posición. El porcentaje de homología o identidad de secuencia entre dos secuencias es depende de la cantidad de posiciones coincidentes u homólogas idénticas compartidas por las dos secuencias dividida entre la cantidad de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son iguales, entonces las dos secuencias son 60 % homólogas o tienen 60 % de identidad de secuencia. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten 50 % de homología o identidad de secuencia. Generalmente, se realiza una comparación cuando dos secuencias están alineadas para proporcionar una homología máxima. A menos que se especifique de otro modo, las «regiones de bucle», por ejemplo, las que surgen de eliminaciones o inserciones en una de las secuencias se consideran faltas de coincidencia.

La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede lograrse mediante el uso de un algoritmo matemático. Preferiblemente, la alineación puede realizarse mediante el uso del método Clustal. Los múltiples parámetros de alineación incluyen penalización por Hueco=10, penalización por Longitud del Hueco=10. Para las alineaciones de ADN, los parámetros de alineación por pares pueden ser Htuple=2, penalización por Hueco=5, Ventana=4, y Diagonales guardadas=4. Para las alineaciones de proteínas, los parámetros de alineación por pares pueden ser Ktuple=1, penalización por Hueco=3, Ventana=5, y Diagonales guardadas=5.

En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en línea), mediante el uso de una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En aun otra realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el uso

del programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en línea), mediante el uso de una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se determina mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en línea) con una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización de brecha de 4.

Puede crearse una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína homóloga con respecto a uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de estos, mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos, o fragmento de esta, o una secuencia de nucleótidos homóloga, de modo que se introducen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos se realizan en uno o más residuos de aminoácido no esenciales predeterminados. Una «sustitución de aminoácidos conservadora» es una sustitución en la que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se definen las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predeterminado en uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 se reemplaza, preferiblemente, con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. De manera alternativa, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de la totalidad o una parte de la secuencia de codificación de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, tal como mediante mutagénesis de saturación y los mutantes resultantes pueden analizarse para determinar una actividad descrita en la presente memoria para identificar mutantes que retienen la actividad deseada. Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y la actividad de la proteína puede determinarse, por ejemplo, mediante el uso de los ensayos descritos en la presente memoria.

Los niveles de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden evaluarse mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos para detectar la expresión de una proteína o molécula transcrita. Los ejemplos no taxativos de dichos métodos incluyen métodos inmunológicos para la detección de proteínas, métodos de purificación de proteínas, ensayos de función o actividad de proteínas, métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

En realizaciones preferidas, los niveles de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 se determinan al medir la transcripción génica (por ejemplo, ARNm), al medir la cantidad de proteína traducida o al medir la actividad de un producto génico.

Los niveles de expresión pueden controlarse de diversas formas que incluyen la detección de los niveles de ARNm, niveles de proteínas o actividad de proteínas, cualquiera de los cuales puede medirse mediante el uso de técnicas estándar. La detección puede implicar la cuantificación del nivel de expresión génica (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, proteína, o actividad enzimática) o, de manera alternativa, puede ser una evaluación cualitativa del nivel de expresión génica, en particular, en comparación con un nivel de control. El tipo de nivel detectado será evidente según el contexto.

En una realización particular, el nivel de expresión de ARNm puede determinarse mediante formatos *in situ* e *in vitro* en una muestra biológica mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Se pretende que el término «muestra biológica» incluya tejidos, células, fluidos biológicos y aislados de estos, aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Muchos métodos de detección de expresión usan ARN aislado. Para los métodos *in vitro*, se puede utilizar cualquier técnica de aislamiento de ARN que no se seleccione en contra del aislamiento de ARNm para la purificación de ARN a partir de células (véase, por ejemplo, Ausubel et ál., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York 1987-1999). De manera adicional, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de muestras de tejido mediante el uso de técnicas conocidas para los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de un solo paso de Chomczynski (1989, patente estadounidense n.º 4,843,155).

El ARNm aislado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, de modo no taxativo, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sonda. Un método de diagnóstico preferido para la detección de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula (sonda) de ácido nucleico que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen que se detecta. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una parte de este, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse

específicamente en condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención se describen en la presente memoria. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que se expresa uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

En un formato, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, al pasar el ARNm aislado por un gel de agarosa y transferir el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, las una o más sondas se inmovilizan en una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con las una o más sondas, por ejemplo, en una matriz de chip de ADN, por ejemplo, una matriz de chip de ADN Affymetrix™. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la detección del nivel de expresión de ARNm de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión de ARNm en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental establecida en Mullis, 1987, patente estadounidense n.º 4,683,202), reacción en cadena de ligasa (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-Beta replicasa (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197), replicación de círculo rodante (Lizardi et al., patente estadounidense n.º 5,854,033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en cantidades muy pequeñas. Tal como se usan en la presente memoria, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridarse a las regiones 5' o 3' de un gen (más y menos cadenas, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre ellas. En general, los cebadores de amplificación tienen de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, dichos cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para métodos *in situ*, el ARNm no necesita aislarse de las células antes de la detección. En dichos métodos, se prepara/procesa una muestra de célula o tejido mediante el uso de métodos histológicos conocidos. La muestra luego se inmoviliza en un soporte, típicamente un portaobjetos de vidrio, y luego se pone en contacto con una sonda que puede hibridarse con ARNm de los uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

Como alternativa a realizar determinaciones en función del nivel de expresión absoluto, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Los niveles de expresión se normalizan al corregir el nivel de expresión absoluto mediante la comparación de su expresión con la expresión de un gen no biomarcador, por ejemplo, un gen constitutivo que se expresa de forma constitutiva. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes constitutivos tales como el gen de actina o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra de un sujeto, con otra muestra, por ejemplo, una muestra normal, o entre muestras de fuentes diferentes.

El nivel o actividad de una proteína correspondiente a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 también puede detectarse y/o cuantificarse al detectar o cuantificar el polipéptido expresado. El polipéptido puede detectarse y cuantificarse mediante una serie de medios conocidos por los expertos en la técnica. Estos pueden incluir métodos bioquímicos analíticos tales como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía de hiperdifusión, y similares, o varios métodos inmunológicos, tales como reacciones de precipitina en gel o líquido, inmunodifusión (única o doble), inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescente, transferencia de Western y similares. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos de detección de proteínas/anticuerpos para su uso en la determinación de si las células expresan el biomarcador de interés.

La presente invención proporciona, además, formas de polipéptidos solubles, purificas y/o aisladas de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos. Además, se entenderá que cualquiera y todos los atributos de los polipéptidos descritos en la presente memoria, tales como los porcentajes de identidad, las longitudes de los polipéptidos, los fragmentos de polipéptidos, las actividades biológicas, anticuerpos, etc., pueden combinarse en cualquier orden o combinación con respecto a cualquier biomarcador enumerado en la Tabla 1, y combinaciones de estos.

En un aspecto, un polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos de longitud completa que corresponde a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o una secuencia de aminoácidos de longitud completa con 1 a aproximadamente 20 sustituciones de aminoácidos conservadoras. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de los descritos en la presente memoria también puede ser al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90,

91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 99,5 % idéntica a la secuencia de longitud completa de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, que se describen en la presente memoria, se conocen en la técnica, o un fragmento de estos. En otro aspecto, la presente invención contempla una composición que comprende un polipéptido aislado que corresponde a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, y menos de aproximadamente 25 %, o de manera alternativa, 15 %, o de manera alternativa, 5 % de polipéptidos o macromoléculas biológicas contaminantes.

La presente invención proporciona, además, composiciones relacionadas con la producción, detección o caracterización de dichos polipéptidos, o fragmentos de estos, tales como ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras, y similares. Dichas composiciones pueden servir como compuestos que modulan la expresión y/o actividad de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

Es posible usar un polipéptido aislado o un fragmento de este (o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido) que corresponde a uno o más biomarcadores de la invención, que incluyen los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos, como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a dicho inmunógeno, mediante el uso de técnicas estándar para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Un péptido antigénico comprende al menos 8 residuos de aminoácidos y abarca un epítipo presente en la molécula de longitud completa respectiva, de modo que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunitario específico con la molécula de longitud completa respectiva. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos. En una realización, dichos epítipos pueden ser específicos de una molécula de polipéptido de una especie, tal como un ratón o ser humano (es decir, un péptido antigénico que se extiende en una región de la molécula de polipéptido que no se conserva en la especie se usa como un inmunógeno; dichos residuos no conservados pueden determinarse mediante el uso de una alineación tal como la que se proporciona en la presente memoria).

En una realización, un anticuerpo se une de forma sustancialmente específica a PD-L2 e inhibe o potencia la interacción de PD-L2 con RGMb sin inhibir o potenciar la interacción de PD-L2 con PD-1. En otra realización, un anticuerpo se une de forma sustancialmente específica a PD-L2 e inhibe o potencia la interacción de PD-L2 con RGMb y la interacción de PD-L2 con PD-1. En una realización preferida, un anticuerpo se une a un polipéptido PD-L2 y bloquea la interacción entre PD-L2 y RGMb sin bloquear la interacción entre PD-L2 y PD-1. En otra realización preferida, un anticuerpo se une a un polipéptido PD-L2 y bloquea la interacción entre PD-L2 y RGMb, y PD-L2 y PD-1. En incluso otra realización, un anticuerpo se une de forma sustancialmente específica a RGMb e inhibe o potencia la interacción de PD-L2 con RGMb.

Por ejemplo, un inmunógeno de polipéptido se usa típicamente para preparar anticuerpos al inmunizar a un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica adecuada puede contener, por ejemplo, una molécula expresada de forma recombinante o sintetizada químicamente, o fragmento de esta, para la cual se generará la respuesta inmunitaria. La preparación puede incluir, además, un adyuvante tal como el adyuvante de Freund completo o incompleto, o agente inmunoestimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación inmunogénica induce la respuesta de un anticuerpo policlonal al péptido antigénico contenido en esta.

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse tal como se describió anteriormente al inmunizar a un sujeto adecuado con un inmunógeno de polipéptido. La titulación del anticuerpo de polipéptido en el sujeto inmunizado puede monitorearse con el transcurso del tiempo mediante técnicas estándar, tal como con un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) mediante el uso de polipéptido inmovilizado. Si se desea, el anticuerpo dirigido contra el antígeno puede aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas conocidas tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción de IgG. En un momento adecuado luego de la inmunización, por ejemplo, cuando las titulaciones de anticuerpo son más altas, las células que producen anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (véase también, Brown et ál. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et ál. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et ál. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:2927-31; Yeh et ál. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos más reciente (Kozbor et ál. (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del hibridoma EBV (Cole et ál. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales es conocida (véase, en términos generales, Kenneth, R. H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Geffer, M. L. et ál. (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). En resumen, una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) se fusiona con linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno, tal como se describió anteriormente, y los sobrenadantes del cultivo de las células de hibridoma resultantes se analizan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno del polipéptido, preferiblemente, de forma específica.

Es posible aplicar cualquiera de los diversos protocolos conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas con el fin de generar un anticuerpo monoclonal contra uno o más biomarcadores de la invención, que

incluyen los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento de estos (véase, por ejemplo, Galfre, G. et ál. (1977) *Nature* 266:55052; Gefter et ál. (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; Kenneth (1980) *supra*). Además, el experto en la técnica apreciará que existen muchas variaciones de dichos métodos que también pueden ser útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas murinos pueden prepararse al fusionar linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular immortalizada de ratón. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina («medio HAT»). Es posible usar cualquiera de una serie de líneas celulares de mieloma como compañero de fusión de acuerdo con las técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma se encuentran disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón mediante el uso de polietilenglicol («PEG»). Las células de hibridoma que producidas por la fusión luego se seleccionan mediante el uso de medio HAT que mata las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de forma no productiva (los esplenocitos no fusionados se mueren luego de varios días ya que no se transforman). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan mediante la selección de sobrenadantes del cultivo de hibridomas para los anticuerpos que se unen a un polipéptido dado, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo ELISA estándar.

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal específico para uno de los polipéptidos descritos anteriormente puede identificarse y aislarse mediante la selección de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos) con el polipéptido adecuado para aislar de ese modo a los miembros de la biblioteca de inmunoglobulina que se unen al polipéptido. Los kits para generar y seleccionar las bibliotecas de presentación de fagos se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, en Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, n.º de catálogo 27-9400-01; y Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, n.º de catálogo 240612). Además, es posible encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente útiles para su uso en la generación y selección de una biblioteca de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en Ladner et ál. patente estadounidense n.º 5,223,409; Kang et ál. publicación internacional n.º WO 92/18619; Dower et ál. publicación internacional n.º WO 91/17271; Winter et ál. publicación internacional WO 92/20791; Markland et ál. publicación internacional n.º WO 92/15679; Breitling et ál. publicación internacional WO 93/01288; McCafferty et ál. publicación internacional n.º WO 92/01047; Garrard et ál. publicación internacional n.º WO 92/09690; Ladner et ál. publicación internacional n.º WO 90/02809; Fuchs et ál. (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1369-1372; Hay et ál. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et ál. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et ál. (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et ál. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et ál. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et ál. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard et ál. (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1373-1377; Hoogenboom et ál. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas et ál. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; y McCafferty et ál. (1990) *Nature* 348:552-554.

Dado que en la técnica se conoce que los dominios de CDR3 de cadena pesada y ligera tienen una función particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo con un antígeno, los anticuerpos monoclonales recombinantes de la presente invención preparados tal como se estableció anteriormente comprenden, preferiblemente, las CDR3 de cadena pesada y ligera de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, que incluyen las secuencias de la Tabla 3 o partes de estas). Los anticuerpos pueden comprender, además, las CDR2 de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, que incluyen las secuencias de la Tabla 3 o partes de estas). Los anticuerpos pueden comprender, además, las CDR1 de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, que incluyen las secuencias de la Tabla 3 o partes de estas). En otras realizaciones, los anticuerpos pueden comprender cualquier combinación de CDR.

Las regiones CDR1, 2, y/o 3 de los anticuerpos modificados genéticamente descritos anteriormente pueden comprender las secuencias de aminoácidos exactas de las regiones variables de la presente invención (por ejemplo, que incluyen las secuencias de la Tabla 3, o partes de estas) que se describen en la presente memoria. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que puede ser posible cierta desviación de las secuencias de CDR exactas de CDR mientras que aún se conserva la capacidad del anticuerpo para unirse a RGMb o PD-L2 de forma eficaz (por ejemplo, modificaciones de secuencia conservadoras). Por consiguiente, en otra realización, el anticuerpo modificado genéticamente puede estar compuesto por una o más CDR que son, por ejemplo, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % idénticas a una o más CDR de la presente invención (por ejemplo, que incluyen las secuencias de la Tabla 3, o partes de estas).

Los aspectos estructurales de los anticuerpos humanos o no humanos (por ejemplo, un anticuerpo RGMb anti-ratón/anti-humano de rata descrito en la presente memoria) pueden usarse para crear anticuerpos humanos estructuralmente relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la presente invención, tal como la unión a PD-L2 y/o RGMb. Otra propiedad funcional incluye la inhibición de la unión de los anticuerpos originales humanos o no humanos conocidos en un ensayo ELISA de competición.

En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos monoclonales capaces de unirse a PD-L2 y/o RGMb humanos, que comprenden una cadena pesada en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o

100 % idéntica seleccionada del grupo de CDR de dominio variable de cadena pesada que se presentan en la Tabla 3.

De manera similar, también se proporcionan anticuerpos monoclonales capaces de unirse a PD-L2 y/o RGMb humanos, que comprenden una cadena ligera en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % idéntica seleccionada del grupo de CDR de dominio variable de cadena ligera que se presentan en la Tabla 3.

También se proporcionan anticuerpos monoclonales capaces de unirse a PD-L2 y/o RGMb humanos, que comprenden una cadena pesada en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % idéntica seleccionada del grupo de CDR de dominio variable de cadena pesada que se presentan en la Tabla 3; y que comprenden una cadena ligera en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % idéntica seleccionada del grupo de CDR de dominio variable de cadena ligera que se presentan en la Tabla 3.

Un experto en la técnica notará que dicho porcentaje de homología es equivalente y puede lograrse mediante la introducción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de una CDR dada.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden comprender una cadena pesada, mientras que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las CDR de dominio variable de cadena pesada que se presentan en la Tabla 3, y una cadena ligera, en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las CDR de dominio variable de cadena ligera que se presentan en la Tabla 3.

Dichos anticuerpos monoclonales pueden comprender una cadena ligera, en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, tal como se describe en la presente memoria; y/o una cadena pesada, en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, tal como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales capaces de unirse a Gall humana comprenden o consisten en CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, tal como se describe en la presente memoria.

El dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales de la presente invención puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de VH que se establece en la Tabla 3 y/o el dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales de la presente invención puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de VK que se establece en la Tabla 3.

La presente invención proporciona, además, fragmentos de dichos anticuerpos monoclonales que incluyen, de modo no taxativo, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, una cantidad de moléculas inmunoinhibidoras, tales como PD-L1, PD-1, CTLA-4, y similares, pueden unirse de forma biespecífica o multiespecífica.

También se contemplan otros fragmentos de los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por ejemplo, se proporcionan cadenas pesada y/o ligera de inmunoglobulina individual, en donde los dominios variables de estas comprenden al menos una CDR presentada en la Tabla 3. En una realización, la cadena pesada de inmunoglobulina comprende al menos una CDR que tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % idéntica seleccionada del grupo de CDR de dominio variable de cadena pesada o cadena ligera que se presentan en la Tabla 3. En otra realización, también se proporciona una cadena ligera de inmunoglobulina comprende al menos una CDR que tiene una secuencia al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % idéntica seleccionada del grupo de CDR de dominio variable de cadena ligera o cadena pesada que se describen en la presente memoria (por ejemplo, que se presentan en la Tabla 3).

En algunas realizaciones, la cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina comprende un dominio variable que comprende al menos uno de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3 que se describen en la presente memoria. Dichas cadenas pesadas de inmunoglobulina pueden comprender o consistir en al menos uno de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Dichas cadenas ligeras de inmunoglobulina pueden comprender o consistir en al menos uno de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3.

En otras realizaciones, una cadena pesada y/o ligera de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de dominio variable vH o vk, respectivamente, proporcionada en la Tabla 3.

La presente invención proporciona, además, polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominio variable vH, dominio variable vk, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-

H2 y CDR-H3, que se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos, las inmunoglobulinas y los polipéptidos de la invención pueden usarse en una forma aislada (por ejemplo, purificada) o estar contenidos en un vector, tal como una membrana o una vesícula lipídica (por ejemplo, un liposoma).

Se contemplan una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, es posible que sea conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente al injertar solo CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FR de VH y VL de un anticuerpo humano, se reduce la actividad de unión al antígeno en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que diversos residuos de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en las CDR sino también en FR, están asociados, de forma directa o indirecta, con la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, la sustitución de dichos residuos de aminoácidos con residuos de aminoácidos diferentes derivados de las FR del VH y VL del anticuerpo humano podría reducir la actividad de unión y puede corregirse al reemplazar los aminoácidos con residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Es posible realizar modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y aún así obtener una molécula funcional que codifica un anticuerpo y polipéptido con las características deseadas. Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de actividad. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína define la actividad funcional de la proteína, es posible realizar determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína y, por supuesto, en su secuencia de codificación de ADN, mientras se obtiene una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que es posible realizar diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

Al realizar los cambios en las secuencias de polipéptidos, se puede tomar en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. Generalmente, en la técnica se comprende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos que confiere la función biológica interactiva a una proteína. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le otorgó un índice hidropático en función de sus características de carga e hidrofobicidad, estos son: isoleucina (+4,5), valina (+4,2), leucina (+3,8), fenilalanina (+2,8), cisteína/cistina (+2,5), metionina (+1,9), alanina (+1,8), glicina (-0,4), treonina (-0,7), serina (-0,8), triptófano (-0,9), tirosina (-1,3), prolina (-1,6), histidina (-3,2), glutamato (-3,5), glutamina (<RTI 3,5), aspartato (-3,5), asparagina (-3,5), lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

En la técnica se conoce que determinados aminoácidos pueden sustituirse con otros aminoácidos con un valor o índice hidropático similar y aun así producir una proteína con actividad biológica similar, es decir, aun así obtener una proteína biológica equivalente a nivel funcional.

Tal como se indicó anteriormente, por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos pueden basarse, generalmente, en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Las sustituciones ilustrativas que toman en consideración varias de las características anteriores son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Otro tipo de modificación de aminoácidos del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glucosilación original del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la estabilidad. «Alterar» significa eliminar uno o más restos de carbohidrato que se hallan en el anticuerpo y/o agregar uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos está típicamente enlazada a N. «Enlazada a N» se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido menos prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra de forma conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de forma tal que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación unidos a N). Otro tipo de modificación covalente implica acoplar glucósidos al anticuerpo química o enzimáticamente. Estos procedimientos son ventajosos en el sentido de que no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tiene capacidades de glicosilación para la glicosilación enlazada a N o a O. En función del modo de acoplamiento utilizado, uno o más azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, dichos métodos se describen en WO87/05330.

Del mismo modo puede quitarse cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares con la excepción del azúcar de unión (N-acetilglicosamina o N-acetilgalactosamina) mientras el anticuerpo queda intacto. La desglicosilación química se describe en Sojhr et ál. (1987) y Edge et ál. (1981). La escisión enzimática de los restos de carbohidrato en anticuerpos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endoglicosidasas y exoglicosidasas según lo describen Thotakura et ál. (1987).

Otras modificaciones pueden implicar la formación de inmunoconjugados. Por ejemplo, en un tipo de modificación covalente, los anticuerpos o las proteínas están enlazados covalentemente a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma en la que se establece en las patentes estadounidenses n.º 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337.

La conjugación de anticuerpos u otras proteínas de la presente invención con agentes heterólogos puede realizarse mediante el uso de una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales que incluyen, de modo no taxativo, N-succinimidil (2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCL de dimetil adipimidao), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldeídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos de bis-flúor activos (tales 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, el ácido 1-isotiocianatobencil metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo (WO 94/11026).

En otro aspecto, la presente invención presenta anticuerpos conjugados con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco y/o un radioisótopo. Cuando están conjugados con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan «inmunotoxinas». Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, las destruye). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, de modo no taxativo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramcina (AMC)) y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yoduro radioactivo, para generar radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado, tal como el cáncer.

Es posible usar anticuerpos conjugados para diagnóstico o pronóstico para monitorear los niveles de polipéptidos en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento (es decir, el enlace físico) del anticuerpo con una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, P-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina (PE); un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H . Tal como se usa en la presente memoria, se pretende que el término «etiquetado», con respecto al anticuerpo, comprenda el etiquetado directo del anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, enlace físico) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) con el anticuerpo, así como el etiquetado indirecto del anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable.

Es posible utilizar los conjugados de anticuerpo de la presente invención para modificar una respuesta biológica dada. No debe interpretarse que el resto terapéutico se limita a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas puede incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de esta, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-gamma; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 («IL-1»), interleucina-2 («IL-2»), interleucina-6 («IL-6»), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos («GM-CSF»), factor estimulante de colonias de granulocitos («G-CSF») u otros factores de crecimiento o citocinas.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos son conocidos, véase, por ej., Arnon et ál.,

«Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et ál. (eds.), págs. 243 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et ál., «Antibodies For Drug Delivery», en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et ál. (eds.), págs. 623 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et ál. (eds.), págs. 475 506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et ál. (eds.), págs. 303 16 (Academic Press 1985), y Thorpe et ál., «The Preparation And Cytotoxic Properties Of AntibodyToxin Conjugates», Immunol. Rev., 62:119 58 (1982).

En algunas realizaciones, las conjugaciones pueden realizarse mediante el uso de un «enlazador escindible» que facilita la liberación del agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento en una célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador lábil a ácidos, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,208,020). De manera alternativa, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento puede elaborarse, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Adicionalmente, los anticuerpos de polipéptidos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos, que comprenden partes humanas y no humanas, que pueden elaborarse mediante el uso de técnicas estándar de ADN recombinante, se encuentran dentro del alcance de la invención. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de los métodos descritos en Robinson et ál. publicación de patente internacional PCT/US86/02269; Akira et ál. solicitud de patente europea 184,187; Taniguchi, M. solicitud de patente europea 171,496; Morrison et ál. solicitud de patente europea 173,494; Neuberger et ál. solicitud de PCT WO 86/01533; Cabilly et ál. patente estadounidense n.º 4,816,567; Cabilly et ál. solicitud de patente europea 125,023; Better et ál. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et ál. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et ál. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et ál. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214-218; Nishimura et ál. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et ál. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et ál. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi et ál. (1986) Biotechniques 4:214; patente estadounidense de Winter 5,225,539; Jones et ál. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeven et ál. (1988) Science 239:1534; y Beidler et ál. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

Además, los anticuerpos humanizados pueden elaborarse de acuerdo con protocolos estándar tales como los descritos en la patente estadounidense 5,565,332. En otra realización, las cadenas de anticuerpos o miembros de pares de unión específicos pueden producirse mediante recombinación entre vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una fusión de una cadena de polipéptidos de un miembro de un par de unión específico y un componente de un paquete de presentación genérico replicable y vectores que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican una segunda cadena de polipéptidos de un único miembro de un par de unión mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patentes estadounidenses 5,565,332, 5,871,907 o 5,733,743. El uso de anticuerpos intracelulares para inhibir la función de las proteínas en una célula también se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2638-2646; Biocca, S. et ál. (1990) EMBO J. 9:101-108; Werge, T. M. et ál. (1990) FEBS Lett. 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-7428; Marasco, W. A. et ál. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Biocca, S. et ál. (1994) Biotechnology (NY) 12:396-399; Chen, S-Y. et ál. (1994) Hum. Gene Ther. 5:595-601; Duan, L et ál. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-5079; Chen, S-Y. et ál. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-5936; Beerli, R. R. et ál. (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936; Beerli, R. R. et ál. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672; Mhashilkar, A. M. et ál. (1995) EMBO J. 14:1542-1551; Richardson, J. H. et ál. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; publicación de PCT n.º WO 94/02610 de Marasco et ál.; y publicación de PCT n.º WO 95/03832 de Duan et ál.).

Adicionalmente, es posible elaborar anticuerpos completamente humanos contra los biomarcadores de la invención, que incluyen los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos. Los anticuerpos completamente humanos pueden elaborarse en ratones que son transgénicos para genes de inmunoglobulina humana, por ejemplo, de acuerdo con Hogan, et ál., «Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Laboratory. En resumen, los ratones transgénicos se inmunizan con inmunógeno purificado. Las células del bazo se cosechan y fusionan con las células de mieloma para producir hibridomas. Los hibridomas se seleccionan en función de su capacidad para producir anticuerpos que se unen al inmunógeno. Los anticuerpos completamente humanos podrían reducir la inmunogenicidad de dichos anticuerpos en un ser humano.

En una realización, un anticuerpo para su uso en la presente invención es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de un único polipéptido de anticuerpo. La unión al antígeno puede ser simultánea o en secuencia. Los triomas e hibridomas híbridos son dos ejemplos de líneas celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos producidos por un hibridoma híbrido o un trioma se describen en la patente estadounidense 4,474,893. Los

anticuerpos biespecíficos se han construido por medios químicos (Staerz et ál. (1985) Nature 314:628, y Perez et ál. (1985) Nature 316:354) y tecnología de hibridoma (Staerz y Bevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:1453, y Staerz y Bevan (1986) Immunol. Today 7:241). Los anticuerpos biespecíficos también se describen en la patente estadounidense 5,959,084. Los fragmentos de anticuerpos biespecíficos se describen en la patente estadounidense 5,798,229.

Los agentes biespecíficos también pueden generarse mediante la elaboración de heterohibridomas mediante la fusión de hibridomas u otras células que producen diferentes anticuerpos, seguido por la identificación de clones que producen y coensamblan ambos anticuerpos. También pueden generarse mediante conjugación química o genética de cadenas completas de inmunoglobulinas o partes de estas tales como secuencias de Fab o Fv. El componente de anticuerpo puede unirse a un polipéptido o un fragmento de este de uno o más biomarcadores de la invención, que incluyen uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o un fragmento de estos. En una realización, el anticuerpo biespecífico podría unirse específicamente a un polipéptido, o un fragmento de este, y su compañero de unión natural, o un fragmento de este.

En otro aspecto de esta invención, pueden usarse péptidos o miméticos de péptidos para antagonizar o agonizar la actividad de uno o más biomarcadores de la invención, que incluyen uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento de estos. En una realización, las variantes de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, que funcionan como un agente modulador para la proteína de longitud completa respectiva, pueden identificarse mediante la detección en bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, para la actividad agonista. En una realización, se genera una biblioteca variada de variantes mediante mutagénesis combinatoria en el nivel de ácido nucleico y se codifica mediante una biblioteca génica variada. La biblioteca variada de variantes puede producirse, por ejemplo, mediante ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de modo que un conjunto degenerado de posibles secuencias de polipéptidos pueda expresarse como polipéptidos individuales que contienen el conjunto de secuencias de polipéptidos en ellos. Existen diversos métodos que pueden usarse para producir bibliotecas de variantes de polipéptidos a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede realizarse en un dispositivo de síntesis de ADN automático, y el gen sintético se liga luego en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite que se proporcionen en una mezcla todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de posibles secuencias de polipéptidos. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, S. A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et ál. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et ál. (1984) Science 198:1056; Ike et ál. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477).

Además, las bibliotecas de fragmentos de una secuencia de codificación de polipéptidos pueden usarse para generar una población variada de fragmentos de polipéptidos para la detección y selección posterior de las variantes de un polipéptido dado. En una realización, una biblioteca de fragmentos de secuencias de codificación puede generarse mediante el tratamiento de un fragmento de PCR de cadena doble de una secuencia de codificación de polipéptidos con una nucleasa en condiciones en donde la mella se produce solo una vez por polipéptido, la desnaturalización del ADN de cadena doble, la renaturalización del ADN para formar ADN de cadena doble que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos mellados, retirar las partes de cadena simple de los dúplex reformados mediante el tratamiento con nucleasa S1, y ligar la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos de varios tamaños del extremo N, el extremo C e internos de los polipéptidos.

En la técnica se conocen diversas técnicas para la detección de productos génicos de bibliotecas combinatorias elaboradas mediante mutaciones puntuales o truncamiento, y para la detección de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Dichas técnicas pueden adaptarse para una detección rápida de las bibliotecas génicas generadas mediante mutagénesis combinatoria de los polipéptidos. Las técnicas más utilizadas, que son susceptibles de un análisis de alto rendimiento, para detectar grandes bibliotecas de genes incluyen, típicamente, clonar la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y expresar los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Puede usarse mutagénesis con conjunto recursivo (REM), una técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con los ensayos de detección para identificar variantes de interés (Arkin y Youvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delagrave et ál. (1993) Protein Eng. 6(3):327-331). En una realización, pueden emplearse ensayos basados en células para analizar una biblioteca variada de polipéptidos. Por ejemplo, una biblioteca de vectores de expresión puede transfectarse en una línea celular que comúnmente sintetiza uno o más biomarcadores de la invención, que incluyen uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o un fragmento de estos. Las células transfectadas se cultivan luego, de modo que se produce el polipéptido de longitud completa y un polipéptido mutante particular, y puede detectarse el efecto de la expresión del mutante sobre la actividad del polipéptido de longitud completa en los sobrenadantes celulares, por ejemplo, mediante cualquiera de una serie de ensayos funcionales. Luego, el ADN de plásmido puede recuperarse de las células que califican para la inhibición, o de manera alternativa, para la potenciación de la actividad del polipéptido de longitud completa, y los clones individuales se caracterizan adicionalmente.

La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de polipéptido con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de polipéptido de interés o una variación de secuencia sustancialmente idéntica pueden generarse mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61:387, que se incorporan a la presente mediante referencia), por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína internos que tienen la capacidad de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria permitirán que los expertos en la técnica produzcan polipéptidos que corresponden a secuencias peptídicas y variantes de secuencias de estos. Dichos polipéptidos pueden producirse en células hospedadoras procariontas o eucariotas mediante la expresión de polinucleótidos que codifican la secuencia peptídica, frecuentemente como parte de un polipéptido más grande. De manera alternativa, dichos péptidos pueden sintetizarse mediante métodos químicos. Los métodos para la expresión de proteínas heterólogas en hospedadores recombinantes, síntesis química de polipéptidos y traducción *in vitro* se conocen en la técnica y se describen más detalladamente en Maniatis et ál. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), 2.^a Ed., Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger y Kimmel, *Methods in Enzymology*, Volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* 91:501; Chaiken I. M. (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11: 255; Kaiser et ál. (1989) *Science* 243:187; Merrifield, B. (1986) *Science* 232:342; Kent, S. B. H. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:957; y Offord, R. E. (1980) *Semisynthetic Proteins*, Wiley Publishing, que se incorporan a la presente mediante referencia).

Los péptidos pueden producirse, típicamente, mediante síntesis química directa. Los péptidos pueden producirse como péptidos modificados con restos no peptídicos unidos mediante enlace covalente en el extremo N y/o el extremo C. En determinadas realizaciones preferidas, se modifica el extremo carboxi o el extremo amino, o ambos. Las modificaciones más comunes de los grupos de extremo amino y carboxilo son la acetilación y la amidación, respectivamente. Las modificaciones del extremo amino tales como la acilación (por ejemplo, acetilación) o alquilación (por ejemplo, metilación) y las modificaciones del extremo carboxi tales como la amidación, así como otras modificaciones de extremo, que incluyen la ciclación, pueden incorporarse a las diversas realizaciones de la invención. Determinadas modificaciones del extremo amino y/o el extremo carboxi y/o extensiones peptídicas con respecto a la secuencia núcleo pueden proporcionar propiedades físicas, químicas, bioquímicas y farmacológicas ventajosas, tales como: mayor estabilidad, mayor potencia y/o eficacia, resistencia a las proteasas séricas, propiedades farmacocinéticas convenientes, y otras. Los péptidos descritos en la presente memoria pueden usarse de forma terapéutica para tratar una enfermedad, por ejemplo, al alterar la coestimulación en un paciente.

Los miméticos peptídicos (Fauchere, J. (1986) *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber y Freidinger (1985) *TINS* p.392; y Evans et ál. (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229, que se incorporan a la presente memoria mediante referencia) se desarrollan usualmente con la ayuda de modelado molecular computarizado. Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden utilizarse para producir un efecto profiláctico o terapéutico equivalente. Por lo general, los miméticos peptídicos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una actividad farmacológica o biológica), pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos con un enlace que se selecciona del grupo que consiste en: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, mediante métodos conocidos en la técnica y descritos más detalladamente en las siguientes referencias: Spatola, A. F. en «Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins» Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., *Vega Data* (March 1983), Vol. 1, Edición 3, «Peptide Backbone Modifications» (revisión general); Morley, J. S. (1980) *Trends Pharm. Sci.* págs. 463-468 (revisión general); Hudson, D. et ál. (1979) *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185 (-CH₂NH-, CH₂CH₂-); Spatola, A. F. et ál. (1986) *Life Sci.* 38:1243-1249 (-CH₂-S); Hann, M. M. (1982) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 307-314 (-CH-CH-, cis y trans); Almquist, R. G. et ál. (190) *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (-COCH₂-); Jennings-White, C. et ál. (1982) *Tetrahedron Lett.* 23:2533 (-COCH₂-); Szelke, M. et ál. *solicitud europea EP 45665* (1982) CA: 97:39405 (1982)(-CH(OH)CH₂-); Holladay, M. W. et ál. (1983) *Tetrahedron Lett.* (1983) 24:4401-4404 (-C(OH)CH₂-); y Hruby, V. J. (1982) *Life Sci.* (1982) 31:189-199 (-CH₂-S-); cada uno de los cuales se incorpora a la presente memoria mediante referencia. Un enlace no peptídico particularmente preferido es -CH₂NH-. Dichos miméticos peptídicos pueden tener ventajas significativas sobre las realizaciones de polipéptidos, que incluyen, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otros. El marcado de los miméticos peptídicos, usualmente, implica la unión covalente de uno o más marcadores, de forma directa o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida) con posiciones no interferentes en el mimético peptídico que se predice mediante datos cuantitativos de actividad estructural y/o modelado molecular. Dichas posiciones no interferentes generalmente son posiciones que no forman contactos directos con los macropolipéptidos a los que se une el mimético peptídico para producir el efecto terapéutico. La derivación (por ejemplo, marcado) de los miméticos peptídicos no debería interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del mimético peptídico.

La presente invención también abarca moléculas pequeñas que pueden modular (potenciar o inhibir) las interacciones, por ejemplo, entre los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 y sus compañeros de unión natural.

Las moléculas pequeñas de la presente invención pueden obtenerse mediante el uso de cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas de fase en solución o fase sólida paralelas espacialmente dirigibles, métodos de biblioteca sintéticos que requieren la deconvolución, el método de biblioteca «una microesfera-un compuesto», y métodos de biblioteca sintéticos que utilizan selección de cromatografía por afinidad. (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Los ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt et ál. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb et ál. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et ál. (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et ál. (1993) *Science* 261:1303; Carrell et ál. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell et ál. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 33:2061; y en Gallop et ál. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), o en microesferas (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacterias (Ladner USP 5,223,409), esporas (Ladner USP 409), plásmidos (Cull et ál. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla et ál. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner *supra.*). Los compuestos pueden analizarse en ensayos basados en células o no basados en células. Los compuestos pueden analizarse en grupos (por ejemplo, múltiples compuestos en cada muestra de prueba) o como compuestos individuales.

La invención también se refiere a proteínas quiméricas o de fusión de los biomarcadores de la invención, que incluyen los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos. Tal como se usa en la presente memoria, una «proteína quimérica» o «proteína de fusión» comprende uno o más biomarcadores de la invención, que incluyen uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento de estos, enlazados operativamente a otro polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga con respecto al biomarcador respectivo. En una realización preferida, la proteína de fusión comprende al menos una parte biológicamente activa de uno o más biomarcadores de la invención, que incluyen uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos. Dentro de la proteína de fusión, se pretende que el término «enlazada operativamente» indique que las secuencias de biomarcadores y las secuencias que no son de biomarcadores se fusionan en el marco entre sí, de manera que conservan las funciones que presentan cuando se expresan independientemente de la fusión. Las «otras» secuencias pueden fusionarse al extremo N o al extremo C de las secuencias de biomarcadores, respectivamente.

Dicha proteína de fusión puede producirse mediante la expresión recombinante de una secuencia de nucleótidos que codifica el primer péptido y una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo péptido. El segundo péptido puede corresponder, opcionalmente, a un resto que altera la solubilidad, afinidad, estabilidad o valencia del primer péptido, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina. En otra realización preferida, el primer péptido consiste en una parte de una molécula biológicamente activa (por ejemplo, la parte extracelular del polipéptido o la parte de unión al ligando). El segundo péptido puede incluir una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio C γ 1 humano o un dominio C γ 4 por ejemplo, las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgC γ 1 humano, o IgC γ 4 humano, véase por ejemplo, Capon et ál. patentes estadounidenses 5,116,964; 5,580,756; 5,844,095, y similares, que se incorporan a la presente memoria mediante referencia. Dichas regiones constantes pueden conservar las regiones que median la función efectora (por ejemplo, unión al receptor Fc) o pueden alterarse para reducir la función efectora. Una proteína de fusión resultante puede tener solubilidad, afinidad de unión, estabilidad y/o valencia alteradas (es decir, la cantidad de sitios de unión disponibles por polipéptido) en comparación con el primer péptido expresado independientemente, y puede aumentar la eficiencia de la purificación de la proteína. Las proteínas de fusión y los péptidos producidos por técnicas recombinantes pueden secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contiene la proteína o el péptido. Alternativamente, la proteína o el péptido pueden conservarse citoplasmáticamente, y las células pueden cosecharse, lisarse y la proteína puede aislarse. Un cultivo celular incluye, típicamente, células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son conocidos en la técnica. Las proteínas y los péptidos pueden aislarse de los medios de cultivo celular, las células hospedadoras, o ambos, mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas y péptidos. Las técnicas para transfectar células hospedadoras y purificar proteínas y péptidos se conocen en la técnica.

Preferiblemente, una proteína de fusión de la invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se ligan entre sí en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, mediante el uso de extremos romos o escalonados para la ligación, digestión de enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, llenado de extremos cohesivos, según corresponda, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada, y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen dispositivos de síntesis de ADN automáticos. De manera alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo mediante el uso de cebadores de anclaje que producen excedentes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que, posteriormente, pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et ál. John

Wiley e hijos: 1992).

Las proteínas de fusión de Ig particularmente preferidas incluyen la parte de dominio extracelular o dominio tipo región variable de RGMb, PD-L2, PD-1 humanos, u otros biomarcadores enumerados en la Tabla 1, unidos a una región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, la región Fc). La región constante de inmunoglobulina puede contener modificaciones genéticas que reducen o eliminan la actividad efectora inherente en la estructura de inmunoglobulina. Por ejemplo, el ADN que codifica la parte extracelular de un polipéptido de interés puede unirse al ADN que codifica las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgC γ 1 y/o IgG γ 4 modificadas mediante mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, tal como se indica en WO 97/28267.

En otra realización, la proteína de fusión contiene una secuencia de señal heteróloga en su extremo N. En determinadas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras de mamíferos), la expresión y/o secreción de un polipéptido puede aumentar a través del uso de una secuencia de señal heteróloga.

Las proteínas de fusión de la invención pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos en un sujeto. Dichos anticuerpos pueden usarse para purificar los polipéptidos naturales respectivos a partir de los cuales se generaron las proteínas de fusión, o en ensayos de detección para identificar polipéptidos que inhiben las interacciones entre uno o más polipéptidos de biomarcadores o un fragmento de estos y sus compañeros de unión natural, o un fragmento de estos.

También se proporcionan en la presente composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos que comprenden o son capaces de expresar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o más ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos, en donde dichos ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos en una célula se hibridan específicamente (por ejemplo, se unen) en condiciones celulares, con ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, ARN no codificantes tales como miARN, pre-miARN, pri-miARN, miARN*, anti-miARN, un sitio de unión a miARN, una variante y/o variante funcional de estos, ARNm celulares o un fragmento de estos). En una realización, la expresión de los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos en una célula puede potenciar o regular por aumento una o más actividades biológicas asociadas con los ácidos nucleicos pequeños de tipo salvaje, de origen natural o sintéticos correspondientes. En otra realización, la expresión de los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos en una célula puede inhibir la expresión o actividad biológica de los ácidos nucleicos celulares y/o proteínas, por ejemplo, mediante la inhibición de la transcripción, traducción y/o procesamiento de ácidos nucleicos pequeños, por ejemplo, de uno o más biomarcadores de la invención, que incluyen uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de estos. En una realización, los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos son ARN pequeños (por ejemplo, microARN) o complementos de ARN pequeños. En otra realización, los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos pueden tener cadena simple o doble y tienen al menos seis nucleótidos de longitud y tienen menos de 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, o 10 nucleótidos de longitud. En otra realización, composición puede comprender una biblioteca de ácidos nucleicos que comprenden o son capaces de expresar ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos, o grupos de dichos ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos. Un grupo de ácidos nucleicos puede comprender aproximadamente 2-5, 5-10, 10-20, 10-30 o más ácidos nucleicos que comprenden o son capaces de expresar ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de estos.

En una realización, la unión puede ser por complementariedad de pares de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de la unión a dúplex de ADN, mediante interacciones específicas en la ranura principal de la doble hélice. En general «antisentido» se refiere a la gama de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluye cualquier proceso que dependa de la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

En la técnica se sabe que pueden realizarse modificaciones a la secuencia de un miARN o un pre-miARN sin interrumpir la actividad del miARN. Tal como se usa en la presente memoria, el término «variante funcional» de una secuencia de miARN se refiere a una secuencia de oligonucleótidos que varía con respecto a la secuencia de miARN natural, pero conserva una o más características funcionales del miARN (por ejemplo, la inhibición de la proliferación de células cancerosas, inducción de la apoptosis de células cancerosas, mejora de la susceptibilidad de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos, inhibición específica de la diana de miARN). En algunas realizaciones, una variante funcional de un miARN conserva todas las características funcionales del miARN. En determinadas realizaciones, una variante funcional de un miARN tiene una secuencia de nucleobases que es al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la del miARN o precursor de este a lo largo de una región de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más nucleobases, o la variante funcional se hibrida con el complemento del miARN o precursor de este en condiciones de hibridación rigurosas. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la secuencia de nucleobases de una variante funcional es capaz de hibridarse con una o más secuencias diana del miARN.

Los miARN y sus secuencias de tallo-bucle correspondientes que se describen en la presente memoria pueden encontrarse en miRBase, una base de datos de búsqueda en línea de secuencias de miARN, que se encuentra en

internet en microrna.sanger.ac.uk. Las entradas en la base de datos de secuencias miRBase representan una parte de horquilla prevista en una transcripción de miARN (el tallo-bucle), con información sobre la ubicación y la secuencia de la secuencia de miARN maduro. Las secuencias de tallo-bucle de miARN en la base de datos no son miARN estrictamente precursores (pre-miARN), y pueden, en algunos casos, incluir los pre-miARN y alguna secuencia flanqueante de la supuesta transcripción primaria. Las secuencias de nucleobases de miARN descritas en la presente comprenden cualquier versión del miARN, que incluyen las secuencias descritas en la versión 10.0 de la base de datos de secuencias miRBase y las secuencias descritas en cualquier versión anterior de la base de datos de secuencias miRBase. Una versión de una base de datos de secuencias puede dar como resultado el cambio de nombre de determinados miARN. Una versión de una base de datos de secuencias puede dar como resultado una variación de una secuencia de miARN madura.

En algunas realizaciones, las secuencias de miARN de la invención pueden estar asociadas con una segunda secuencia de ARN que puede estar ubicada en la misma molécula de ARN o en una molécula de ARN separada con respecto a la secuencia de miARN. En dichos casos, la secuencia de miARN puede denominarse cadena activa, mientras que la segunda secuencia de ARN, que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de miARN, puede denominarse cadena complementaria. Las cadenas activa y complementaria se hibridan para crear un ARN de cadena doble que es similar a un precursor de miARN de origen natural. La actividad de un miARN puede optimizarse al maximizar la captación de la cadena activa y al minimizar la captación de la cadena complementaria por parte del complejo proteico de miARN que regula la traducción génica. Esto puede realizarse a través de la modificación y/o el diseño de la cadena complementaria.

En algunas realizaciones, la cadena complementaria se modifica de modo que el grupo químico distinto de un fosfato o hidroxilo esté en su extremo 5'. La presencia de la modificación en 5' elimina aparentemente la captación de la cadena complementaria y posteriormente favorece la captación de la cadena activa por parte del complejo proteico de miARN. La modificación en 5' puede ser cualquiera de una variedad de moléculas conocidas en la técnica, que incluyen NH₂, NHCOCH₃, y biotina. En otra realización, la captación de la cadena complementaria por parte de la vía de miARN se reduce al incorporar nucleótidos con modificaciones de azúcar en los primeros 2-6 nucleótidos de la cadena complementaria. Cabe señalar que dichas modificaciones de azúcar pueden combinarse con las modificaciones del extremo 5' descritas anteriormente para potenciar aún más las actividades de miARN.

En algunas realizaciones, la cadena complementaria está diseñada para que los nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria no sean complementarios a la cadena activa. Esto da como resultado ARN híbridos de cadena doble que son estables en el extremo 3' de la cadena activa, pero relativamente inestables en el extremo 5' de la cadena activa. Esta diferencia de estabilidad potencia la captación de la cadena activa por parte de la vía de miARN, mientras que reduce la captación de la cadena complementaria, potenciando de ese modo la actividad de miARN.

Las construcciones de ácidos nucleicos pequeños y/o antisentido de los métodos y las composiciones que se presentan en la presente memoria pueden administrarse, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario al menos a una única parte de los ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, ARN pequeños, ARNm y/o ADN genómico). De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico pequeñas pueden producir ARN que codifica ARNm, miARN, pre-miARN, pri-miARN, miARN*, anti-miARN o un sitio de unión a miARN, o una variante de estos. Por ejemplo, la selección de plásmidos adecuada para la expresión de miARN, los métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos en el plásmido, y los métodos para administrar el plásmido recombinante a las células de interés se encuentran dentro del alcance de la técnica. Véase, por ejemplo, Zeng et ál. (2002), *Molecular Cell* 9:1327-1333; Tuschl (2002), *Nat Biotechnol.* 20:446-448; Brummelkamp et ál. (2002), *Science* 296:550-553; Miyagishi et ál. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:497-500; Paddison et ál. (2002), *Genes Dev.* 16:948-958; Lee et ál. (2002), *Nat Biotechnol.* 20:500-505; y Paul et ál. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:505-508, cuyas descripciones se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia.

De manera alternativa, los ácidos nucleicos pequeños y/o construcciones antisentido son sondas de oligonucleótidos que se generan *ex vivo* y que, cuando se introducen en la célula, dan como resultado la hibridación con ácidos nucleicos celulares. Dichas sondas de oligonucleótidos son, preferiblemente, oligonucleótidos modificados que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas y, por lo tanto, son estables *in vivo*. Las moléculas de ácido nucleico ilustrativas para uso como ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido son análogos de fosforamidato, fosfotioato y metilfosfonato de ADN (véase también las patentes estadounidenses 5,176,996; 5,264,564; y 5,256,775). Adicionalmente, se han revisado los enfoques generales para la construcción de oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol et ál. (1988) *BioTechniques* 6:958-976; y Stein et ál. (1988) *Cancer Res* 48:2659-2668.

Los enfoques antisentido pueden implicar el diseño de oligonucleótidos (ya sea ADN o ARN) que sean complementarios a ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, complementarios a los biomarcadores enumerados en la Tabla 1). No se requiere complementariedad absoluta. En el caso de los ácidos nucleicos antisentido de cadena doble, puede analizarse una sola cadena del dúplex de ADN, o puede evaluarse la formación de tríplex. La capacidad de hibridarse dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto mayor es la longitud del ácido nucleico de hibridación, mayor es la cantidad de

emparejamientos incorrectos de bases con un ácido nucleico (por ejemplo, ARN) que puede contener y aun así formar un dúplex estable (o tríplex, según el caso). Un experto en la técnica puede determinar el grado tolerable de emparejamiento incorrecto mediante el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los oligonucleótidos complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo, la secuencia no traducida 5' que incluye hasta el codón de inicio AUG, deberían trabajar de forma más eficiente al inhibir la traducción. No obstante, recientemente, se ha demostrado que las secuencias complementarias a las secuencias no traducidas 3' de ARNm también son eficaces en la inhibición de la traducción de ARNm (Wagner, R. (1994) *Nature* 372:333). Por lo tanto, los oligonucleótidos complementarios a las regiones no codificantes no traducida 5' o 3' de genes podrían usarse en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de ARNm endógenos. Los oligonucleótidos complementarios a la región no traducida 5' del ARNm pueden incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones de codificación del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces, pero también podrían utilizarse de acuerdo con los métodos y las composiciones que se presentan en la presente. Si bien están diseñados para hibridarse con la región 5', 3' o codificante de los ARNm celulares, los ácidos nucleicos pequeños y/o ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud, y pueden tener menos de aproximadamente 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, o 10 nucleótidos de longitud.

Independientemente de la elección de la secuencia diana, se prefiere que los estudios *in vitro* se realicen primero para cuantificar la capacidad del oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión génica. En una realización, estos estudios utilizan controles que distinguen entre la inhibición de genes antisentido y los efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. En otra realización, estos estudios comparan los niveles del ácido nucleico diana o proteína con los de un ácido nucleico o proteína de control interno. Adicionalmente, se prevé que los resultados obtenidos mediante el uso del oligonucleótido antisentido se comparan con los obtenidos mediante el uso de un oligonucleótido de control. Se prefiere que el oligonucleótido de control tenga aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido de prueba y que la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo necesario para impedir la hibridación específica con la secuencia diana.

Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden ser mezclas de ADN o ARN o quiméricas o derivados o versiones modificadas de estos, de cadena simple o de cadena doble. Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden modificarse en el resto base, el resto de azúcar, o la estructura principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc., y pueden incluir otros grupos a tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirse a receptores de células hospedadoras), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et ál. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6553-6556; Lemaitre et ál. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:648-652; publicación de PCT n.º WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación de PCT n.º WO89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión activados por hibridación. (Véase, por ejemplo, Krol et ál. (1988) *BioTechniques* 6:958-976) o agentes de intercalación. (Véase, por ejemplo, Zon (1988), *Pharm. Res.* 5:539-549). Con este fin, los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido agente de reticulación activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación, etc.

Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un resto base modificado que se selecciona del grupo que incluye, de modo no taxativo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxietil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, a modo no taxativo, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En determinadas realizaciones, un compuesto comprende un oligonucleótido (por ejemplo, un miARN u oligonucleótido que codifica miARN) conjugado con uno o más restos que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido resultante. En dichas determinadas realizaciones, el resto es un resto de colesterol (por ejemplo, antagomires) o un resto lipídico de conjugado de liposomas. Los restos adicionales para la conjugación incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y tintes. En determinadas realizaciones, un grupo conjugado se une directamente al oligonucleótido. En determinadas realizaciones, un grupo conjugado se une al oligonucleótido mediante un resto de unión seleccionado de amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, enlaces dobles o triples), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), ácido 6-aminohexanocio (AHEX o AHA), alquilo C1-C10 sustituido, alquenilo C2-C10 sustituido

o no sustituido, y alquínilo C2-C10 sustituido o no sustituido. En dichas determinadas realizaciones, un grupo sustituido se selecciona de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alquénilo y alquínilo.

En dichas determinadas realizaciones, el compuesto comprende el oligonucleótido que tiene uno o más grupos estabilizantes que se unen a uno o ambos extremos del oligonucleótido para potenciar propiedades tales como, por ejemplo, estabilidad de nucleasa. En los grupos estabilizantes se incluyen estructuras de casquetes. Estas modificaciones de extremo protegen al oligonucleótido de la degradación de exonucleasas y pueden colaborar con la introducción y/o localización dentro de una célula. El casquete puede estar presente en el extremo 5' (casquete 5') o en el extremo 3' (casquete 3') o puede estar en ambos extremos. Las estructuras de casquete incluyen, por ejemplo, casquetes abásicos desoxi invertidos.

Las estructuras de casquete adecuadas incluyen un nucleótido 4',5'-metileno, un nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosilo), un nucleótido 4'-tio, un nucleótido carbocíclico, un nucleótido 1,5-anhidrohexitol, un nucleótido L, un nucleótido alfa, un nucleótido base modificado, un enlace fosforoditioato, un nucleótido treó-pentofuranosilo, un nucleótido 3',4'-seco acíclico, un nucleótido 3,4-dihidroxituloso acíclico, un nucleótido 3,5-dihidroxipentilo acíclico, un resto de nucleótido invertido 3'-3', un resto abásico invertido 3'-3', un resto de nucleótido invertido 3'-2', un resto abásico invertido 3'-2', un fosfato de 1,4-butanediol, un 3'-fosforamidato, un hexilfosfato, un aminohexilfosfato, un 3'-fosfato, un 3'-fosforotioato, un fosforoditioato, un resto metilfosfonato de puenteo, y un resto metilfosfonato no de puenteo 5'-amino-alquil fosfato, un 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato, un 6-aminohexil fosfato, un 1,2-aminodo-decil fosfato, a hidroxipropil fosfato, un resto de nucleótido invertido 5'-5', un resto abásico invertido 5'-5', un 5'-fosforamidato, un 5'-fosforotioato, un 5'-amino, un 5'-fosforamidato de puenteo y/o no de puenteo, un fosforotioato, y un resto 5'-mercapto.

Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido también pueden contener una estructura principal tipo péptido neutro. Dichas moléculas se denominan oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe et ál. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14670 y en Eglom et ál. (1993) Nature 365:566. Una ventaja de los oligómeros PNA es su capacidad para unirse al ADN complementario de forma esencialmente independiente de la resistencia iónica del medio debido a la estructura principal del ADN. En aun otra realización, los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido comprenden al menos una estructura principal de fosfato modificada seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo y un formacetal o análogo de los mismos.

En una realización adicional, los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido son oligonucleótidos α -anoméricos. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos de cadena doble específicos con ARN complementario donde, a diferencia de las b-unidades habituales, las cadenas corren en paralelo entre sí (Gautier et ál. (1987) Nucl. Acids Res. 15:6625-6641). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue et ál. (1987) Nucl. Acids Res. 15:6131-6148), o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et ál. (1987) FEBS Lett. 215:327-330).

Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido de los métodos y las composiciones que se presentan en la presente pueden sintetizarse mediante métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un dispositivo de síntesis de ADN automático (tal como los que se encuentran comercialmente disponibles en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, se pueden sintetizar oligonucleótidos de fosforotioato mediante el método de Stein et ál. (1988) Nucl. Acids Res. 16:3209, los oligonucleótidos de metilfosfonato pueden prepararse mediante el uso de soportes de polímero de vidrio con poros controlados (Sarin et ál. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc. Por ejemplo, un miARN aislado puede sintetizarse químicamente o producirse de forma recombinante mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. En algunos casos, los miARN se sintetizan químicamente mediante el uso de fosforamiditos de ribonucleósidos adecuadamente protegidos y un dispositivo de síntesis de ADN/ARN convencional. Los proveedores de moléculas de ARN sintético o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Proligo (Hamburg, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, Colo., E.E. U.U.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, Ill., E.E. U.U.), Glen Research (Sterling, Va., E.E. U.U.), ChemGenes (Ashland, Mass., E.E. U.U.), Cruachem (Glasgow, Reino Unido), y Exiqon (Vedbaek, Dinamarca).

Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden administrarse a las células *in vivo*. Se han desarrollado varios métodos para administrar ADN o ARN de ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido a las células; por ejemplo, las moléculas antisentido pueden inyectarse directamente en el sitio del tejido, o las moléculas antisentido modificadas, diseñadas para dirigirse a las células deseadas (por ejemplo, antisentido enlazadas a péptidos o anticuerpos que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados en la superficie de la célula diana) pueden administrarse sistemáticamente.

En una realización, los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden comprender o generarse a partir de ARN interferentes pequeños de cadena doble (ARNip), en los cuales las secuencias completamente complementarias a las secuencias de ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, ARNm) median la degradación, o en los cuales las secuencias incompletamente complementarias a las secuencias de ácidos nucleicos celulares (por

ejemplo, ARNm) median la represión traduccional cuando se expresan dentro de las células. En otra realización, los ARNip de cadena doble pueden procesarse en ARN antisentido de cadena simple que se unen a ARN celulares de cadena simple (por ejemplo, microARN) e inhiben su expresión. La interferencia de ARN (iARN) es el proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de las secuencias en animales y plantas iniciado por el ARN de cadena doble (ARNcd) que tiene secuencia homóloga al gen silenciado. El ARNcd in vivo se escinde mediante la ribonucleasa III para generar ARNip de 21 y 22 nucleótidos. Se ha demostrado que los dúplex de ARNip largos de 21 nucleótidos suprimen específicamente la expresión de los genes endógenos y heterólogos en líneas celulares de mamíferos diferentes, que incluyen células humanas de riñón embrionario (293) y HeLa (Elbashir et ál. (2001) Nature 411:494-498). Por consiguiente, la traducción de un gen en una célula puede inhibirse al poner en contacto la célula con ARN de cadena doble cortos con una longitud de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos o de aproximadamente 18 a 21 nucleótidos o de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos. De manera alternativa, es posible introducir un vector que codifica dichos ARNip o ARN de horquilla cortos (ARNhc), que se metabolizan en ARNip, en una célula diana (véase, por ejemplo, McManus et ál. (2002) RNA 8:842; Xia et ál. (2002) Nature Biotechnology 20:1006; y Brummelkamp et ál. (2002) Science 296:550). Los vectores que pueden usarse se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, en OligoEngine con el nombre pSuper RNAi System™.

También pueden usarse moléculas de ribozima, diseñadas para escindir catalíticamente las transcripciones de ARNm celular, para impedir la traducción de los ARNm celulares y la expresión de polipéptidos celulares, o ambas (véase, por ejemplo, la publicación internacional de PCT WO90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver et ál. (1990) Science 247:1222-1225 y la patente estadounidense n.º 5,093,246). Si bien pueden utilizarse ribozimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas del sitio para destruir los ARNm celulares, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de base complementarios con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo se conocen en la técnica y se describen con más detalladamente en Haseloff y Gerlach (1988) Nature 334:585-591. La ribozima puede modificarse genéticamente de modo que el sitio de reconocimiento de escisión se ubique cerca del extremo 5' de los ARNm celulares; es decir, para aumentar la eficiencia y minimizar la acumulación intracelular de transcripciones de ARNm no funcional.

Las ribozimas de los métodos y las composiciones que se presentan en la presente memoria también incluyen endorribonucleasas de ARN (en adelante, «ribozimas de tipo Cech») tales como las que se producen de forma natural en *Tetrahymena thermophila* (conocidas como ANR IVS o L-19 IVS) que han sido descritas exhaustivamente por Thomas Cech y colaboradores (Zaug, et ál. (1984) Science 224:574-578; Zaug, et ál. (1986) Science 231:470-475; Zaug, et ál. (1986) Nature 324:429-433; solicitud de patente internacional publicada n.º WO88/04300 de University Patents Inc.; Been, et ál. (1986) Cell 47:207-216). Las ribozimas de tipo Cech tienen un sitio activo de ocho pares de bases que se hibrida con una secuencia de ARN diana, después de lo cual se produce la escisión del ARN diana. Los métodos y las composiciones que se presentan en la presente memoria comprenden las ribozimas de tipo Cech que se dirigen a las secuencias del sitio activo de ocho pares de bases que se encuentran presentes en los genes celulares.

Al igual que el enfoque antisentido, las ribozimas pueden estar compuestas por oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para una mayor estabilidad, direccionamiento, etc.). Un método preferido de administración implica el uso de una construcción de ADN que «codifique» el ribozima bajo el control de un promotor pol III o pol II constitutivo fuerte, de modo que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajes celulares endógenos e inhibir la traducción. Debido a que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, se necesita una concentración intracelular más baja para lograr la eficacia.

Las moléculas de ácido nucleico utilizadas en la formación de hélices triples para la inhibición de la transcripción de los genes celulares son, preferiblemente, de cadena simple y están compuestas por desoxirribonucleótidos. La composición base de estos oligonucleótidos debe promover la formación de hélices triples a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren extensiones considerables de purinas o pirimidinas presentes en una cadena de un dúplex. Las secuencias de nucleótidos pueden basarse en pirimidina, lo que dará como resultado tripletes de TAT y CGC a lo largo de las tres cadenas asociadas de la hélice triple resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases a una región rica en purina de una cadena simple del dúplex en una orientación paralela a esa cadena. Además, pueden seleccionarse moléculas de ácido nucleico ricas en purinas, por ejemplo, que contengan una extensión de residuos G. Estas moléculas formarán una hélice triple con un dúplex de ADN rico en pares de GC, en la cual la mayoría de los residuos de purina se ubican en una cadena simple del dúplex diana, lo que da como resultado tripletes CGC a lo largo de las tres cadenas en el tríplex.

De manera alternativa, las secuencias potenciales que pueden dirigirse para la formación de una hélice triple pueden aumentarse mediante la creación de una molécula de ácido nucleico denominada como «en zigzag». Las moléculas en zigzag se sintetizan de manera alterna 5'-3', 3'-5', de modo que formen pares de bases primero con una cadena de un dúplex y luego con la otra, eliminando la necesidad de una extensión considerable de purinas o pirimidinas presentes en una cadena del dúplex.

Los ácidos nucleicos pequeños (por ejemplo, miARN, pre-miARN, pri-miARN, miARN*, anti-miARN o un sitio de unión de miARN, o una variante de estos), oligonucleótidos antisentido, ribozimas y moléculas de hélice triple de los métodos y las composiciones que se presentan en la presente memoria pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estas incluyen técnicas para la síntesis química de oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, síntesis química de fosforamidita de fase sólida. De manera alternativa, las moléculas de ARN pueden generarse mediante la transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse a una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de polimerasa de ARN adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. De manera alternativa, las construcciones de ADNc antisentido que sintetizan el ARN antisentido de forma constitutiva o inducible, dependiendo del promotor utilizado, pueden introducirse de forma estable en las líneas celulares.

Además, es posible introducir diversas modificaciones conocidas en las moléculas de ácido nucleico como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las modificaciones posibles incluyen, de modo no taxativo, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos en los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosfotioato o 2' O-metilo en lugar de enlaces de fosfodiesterasa dentro de la estructura principal del oligodesoxirribonucleótido. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que los polipéptidos, ácidos nucleicos pequeños y oligonucleótidos antisentido pueden enlazarse, además, a otro péptido o polipéptido (por ejemplo, un péptido heterólogo), por ejemplo, que funciona como medio de detección de proteínas. Los ejemplos no taxativos de restos peptídicos o polipeptídicos marcadores útiles para la detección en la invención incluyen, de modo no taxativo, enzimas adecuadas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinoesterasa; etiquetas de epítipo, tales como etiquetas FLAG, MYC, HA, o HIS; fluoróforos tales como proteína verde fluorescente; tintes; radioisótopos; digoxigenina; biotina; anticuerpos; polímeros; así como otros conocidos en la técnica, por ejemplo, en *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Joseph R. Lakowicz (Editor), Plenum Pub Corp, 2.^a edición (julio 1999).

Los agentes moduladores descritos en la presente memoria (por ejemplo, anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas de fusión o ácidos nucleicos pequeños) pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto *in vivo*. Las composiciones pueden contener una única molécula o agente de este tipo o cualquier combinación de agentes descritos en la presente memoria. Los «agentes activos únicos» que se describen en la presente memoria pueden combinarse con otros compuestos farmacológicamente activos («agentes activos secundarios») conocidos en la técnica de acuerdo con los métodos y composiciones que se proporcionan en la presente memoria. Se considera que determinadas combinaciones funcionan sinérgicamente en el tratamiento de las afecciones que podrían beneficiarse de la modulación de las respuestas inmunitarias. Los agentes activos secundarios pueden ser moléculas grandes (por ejemplo, proteínas) o moléculas pequeñas (por ejemplo, moléculas orgánicas, organometálicas o inorgánicas sintéticas). Por ejemplo, los anticuerpos anti-RGMb pueden combinarse con anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-CTLA4, etc. y cualquier combinación de ellos.

Los ejemplos de agentes activos de moléculas grandes incluyen, de modo no taxativo, factores de crecimiento hematopoyéticos, citocinas y anticuerpos monoclonales y policlonales. Los agentes activos de moléculas grandes típicos son moléculas biológicas, tales como proteínas de origen natural o elaboradas artificialmente. Las proteínas particularmente útiles en esta invención incluyen proteínas que estimulan la supervivencia y/o proliferación de las células precursoras hematopoyéticas y las células poéticas inmunológicamente activas *in vitro* o *in vivo*. Otras estimulan la división y la diferenciación de progenitoras eritroides comprometidas en células *in vitro* o *in vivo*. Las proteínas particulares incluyen, de modo no taxativo: interleucinas, tales como IL-2 (que incluye IL-II recombinante («rIL2») e IL-2 canaripox), IL-10, IL-12 e IL-18; interferones, tales como interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón beta-1a e interferón gamma-1b; GM-CSF y GM-CSF; y EPO.

Las proteínas particulares que pueden utilizarse en los métodos y composiciones que se proporcionan en la presente memoria incluyen, de modo no taxativo: filgrastim, que se comercializa en Estados Unidos con el nombre comercial Neupogen® (Amgen, Thousand Oaks, CA); sargramostim, que se comercializa en Estados Unidos con el nombre comercial Leukine® (Immunex, Seattle, WA); y EPO recombinante, que se comercializa en Estados Unidos con el nombre comercial Epogen® (Amgen, Thousand Oaks, CA). Se pueden preparar formas mutadas y recombinantes de GM-CSF tal como se describe en las patentes estadounidenses n.º 5,391,485; 5,393,870; y 5,229,496; que se incorporan a la presente mediante referencia. Se pueden preparar formas mutadas y recombinantes de G-CSF tal como se describe en las patentes estadounidenses n.º 4,810,643, 4,999,291, 5,528,823, y 5,580,755; que se incorporan a la presente mediante esta referencia.

III. Métodos para seleccionar agentes que modulan la activación de células inmunitarias

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para seleccionar agentes (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) que modulan una respuesta inmunitaria mediante la modulación de la coestimulación, tales como agentes que inhiben o promueven la interacción de RGMb con PD-L2. Dichos métodos utilizan ensayos de detección, que incluyen ensayos basados en células y no basados en células. En una realización, los ensayos proporcionan un método para identificar agentes que inhiben la interacción de RGMb con PD-L2 (por ejemplo, con o sin inhibición de la interacción de PD-1 con PD-L2).

En una realización, la invención se refiere a ensayos para seleccionar candidatos o compuestos de prueba que se unen o modulan la actividad de RGMb y/o PD-L2. En una realización, un método para identificar un agente para modular una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad del agente para modular, por ejemplo, potenciar o inhibir, la interacción entre RGMb y PD-L2, y determinar, además, la capacidad del agente para modular la interacción entre PD-1 y PD-L2. En una realización, se selecciona un agente que modula la interacción entre RGMb y PD-L2 (por ejemplo, sin modular la interacción entre PD-1 y PD-L2). En otra realización, se selecciona un agente que modula la interacción entre RGMb y PD-L2 y la interacción entre PD-1 y PD-L2. Dichos agentes incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos.

En una realización, un método para identificar un agente que potencia una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad del agente candidato para potenciar la interacción entre RGMb y PD-L2 (por ejemplo, con o sin la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L2).

En otra realización, un método para identificar un agente para regular por aumento una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad de un agente candidato para inhibir la interacción entre RGMb y PD-L2 (por ejemplo, con o sin la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L2), y seleccionar un agente que inhibe la interacción entre RGMb y PD-L2. En otra realización, un método para identificar un agente para regular por disminución una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad del agente candidato para potenciar la interacción entre RGMb y PD-L2 (por ejemplo, con o sin la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L2), y seleccionar un agente que potencia la interacción entre RGMb y PD-L2.

En una realización, un ensayo es un ensayo basado en células que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la unión entre PD-L2 y RGMb. La determinación de la capacidad de los polipéptidos para unirse o interactuar entre sí puede lograrse, por ejemplo, mediante la medición de la unión directa o mediante la medición de un parámetro de la activación de células inmunitarias.

Por ejemplo, en un ensayo de unión directa, los polipéptidos pueden acoplarse con un radioisótopo o marcador enzimático de modo que la unión de RGMb y PD-L2 pueda determinarse mediante la detección de la proteína marcada en un complejo. Por ejemplo, los polipéptidos pueden marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^3H , ya sea directa o indirectamente y el radioisótopo puede detectarse mediante recuento directo de radioemisión o mediante recuento de centelleo. De manera alternativa, los polipéptidos pueden marcarse enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa y el marcador enzimático puede detectarse mediante determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

También se encuentra dentro del alcance de esta invención la determinación de la capacidad de un compuesto para modular la interacción entre RGMb y PD-L2, sin marcar a ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, es posible usar un microfisiómetro para detectar la interacción de RGMb y PD-L2, sin marcar ningún polipéptido (McConnell, H. M. et ál. (1992) *Science* 257:1906-1912). Tal como se usa en la presente, un «microfisiómetro» (por ejemplo, Citosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su entorno mediante el uso de un sensor potenciométrico direccionable por luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación pueden usarse como un indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

En una realización preferida, la determinación de la capacidad de los agentes de bloqueo (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) para antagonizar la interacción entre un conjunto dado de polipéptidos puede lograrse al determinar la actividad de uno o más miembros del conjunto de polipéptidos. Por ejemplo, la actividad de RGMb o PD-L2 puede determinarse mediante al detectar la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, la actividad de la tirosina quinasa), detectar la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, detectar la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador sensible a la diana enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectar una respuesta celular regulada por RGMb y/o PD-L2. La determinación de la capacidad del agente de bloqueo para unirse o interactuar con dicho polipéptido puede lograrse, por ejemplo, al medir la capacidad de un compuesto para modular la coestimulación o inhibición de una célula inmunitaria en un ensayo de proliferación, o al interferir con la capacidad de dicho polipéptido para unirse a los anticuerpos que reconocen una parte de este. En una realización, se determina la capacidad del al menos un compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas, y modular la proliferación celular. En algunas realizaciones, el compuesto de prueba tiene un efecto seleccionado del grupo que consiste en (a) regulación por aumento de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por disminución de la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (b) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (c) regulación por aumento de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por disminución de la fosforilación de PKC- θ ; (d) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación de PKC- θ ; (e) regulación por aumento de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación

de SHSP-2; y (f) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMB y regulación por disminución de la fosforilación de SHP-2.

FoxP3, ERK1/ERK2, PKC- θ y SHP-2 se conocen en la técnica. Por ejemplo, FOXP3 cumple una función en la regulación del desarrollo de linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores CD25+/CD4+. Se expresa en la leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos y se usa ampliamente como marcador de una población de linfocitos T reguladores (Tregs) que controlan la inmunotolerancia y permiten que las células tumorales evadan la respuesta hospedadora (Bignone y Banham (2008) EOBT 8:1897-1920). SHP-2 (también conocido como Syp, SHPTP2, PTP2C, PTPN11, PTP1D y BPTP3) es un miembro de la familia de tirosina fosfatasas no de membrana (patente estadounidense n.º 5,589,375 y patente estadounidense n.º 5,831,009). La proteína SHP-2 contiene dos dominios de homología src 2 (SH2), regiones conservadas de aproximadamente 100 aminoácidos originalmente identificados en las proteínas tirosina quinasas Src, que promueven la interacciones proteína-proteína a través de la unión de residuos de fosfotirosilo (Neel, Semin. Cell. Biol. 4: 419-432 (1993)). Se ha demostrado que estos dos dominios presentan funciones diferenciales en la regulación de la fosfatasa SHP-2 y, por consiguiente, afectan vías de señalización diferentes. El dominio SH2 del extremo N sirve como un dominio regulador y de reclutamiento, que produce un efecto autoinhibidor a través de interacciones intramoleculares con el dominio interno de la fosfatasa catalítica. Mientras que el dominio SH2 del extremo C actúa simplemente para reclutar otras proteínas para las interacciones intermoleculares necesarias para la transducción de señales (Pei et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 1141-1145 20 (1996)). El estado de fosforilación de la molécula SHP-2 regula la actividad de su fosfatasa. Las proteínas tirosina fosfatasas, que incluyen las fosfatasas que contienen SH2, se encuentran muy conservadas entre los eucariotas de especies tan diversas como los mamíferos, que incluyen los seres humanos, hasta la levadura y el *Xenopus*. Se ha demostrado que SHP-2 cumple una función fundamental en las respuestas inmunológicas aberrantes (por ejemplo, en la respuesta alérgica (Pazdrak et ál., J. Exp. Med. 186: 561-568 (1997))). La fosforilación de SHP-2 puede detectarse fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen, de modo no taxativo, la detección de movilidad alterada de la molécula de SHP-2 en un gel PAGE, ensayos de fosforilación y ensayos que miden la actividad de la molécula de SHP-2. La detección de la fosforilación de SHP-2 puede ser directa o, de manera alternativa, ser indirecta, por ejemplo, la detección de una actividad o evento corriente abajo.

ERK1 y ERK2 (también conocidas como MAPK1 y MAPK2) son quinasas (Boulton, et ál., Cell 65: 663-675, (1991)). La activación de la molécula ERK se realiza a través de la fosforilación de serina/treonina o la fosforilación de tirosina. La inhibición de la activación de ERK 1 y 2 puede ser provocada por la inhibición de la fosforilación corriente arriba de las moléculas ERK 1 y 2, o puede ser provocada por la activación de una fosfatasa que desfosforila ERK1 y 2 para reducir la actividad. Se sabe que las proteínas ERK se activan mediante la fosforilación por parte de la molécula MEK, una quinasa de doble especificidad. Tras la activación, ERK1 y ERK2 se translocan en el núcleo donde pueden fosforilarse directamente y activan una variedad de factores de transcripción 20 que incluyen c-Myc, C/EBP β , p62, TCF /Elk-1, ATF-2 y c-Jun. El estado de fosforilación/estado de activación de las moléculas ERK1 y 2 tras la activación de los linfocitos T indica la señalización a través de PD-1. Un profesional experto puede determinar fácilmente el estado de fosforilación/estado de activación de las moléculas ERK 1 y 2 mediante el uso de ensayos fácilmente disponibles en la técnica. Por ejemplo, el estado de fosforilación de las moléculas ERK1 25 y 2 puede determinarse mediante el uso de un anticuerpo específico para la forma de fosforilación de las proteínas p42/44 ERK.1/2 (específicas de fosfo-Thr202/Tyr204), varias de las cuales se encuentran comercialmente disponibles. De manera alternativa, el estado de fosforilación de las moléculas ERK.1 y 2 puede determinarse mediante su movilidad en un gel, mediante el uso de un anticuerpo que reconoce ERK1 y 2, independientemente del estado de fosforilación para la identificación. De manera alternativa, el estado de activación de ERK.1 y 2 puede determinarse mediante la evaluación de la actividad de la quinasa de las moléculas ERK.1 y 2. La determinación del estado de fosforilación/activación de ERK1 y 2 también puede realizarse mediante métodos indirectos, por ejemplo, detección de una actividad o evento corriente abajo.

Las isoenzimas PKC cumplen una función importante en muchos eventos de señalización celular. PKC- θ (también conocida como PKC- θ , PKCT, PRKCT, nPKC- θ y PRKCQ) es una isoforma independiente del calcio de la familia PKC de serina-treonina quinasas. La sobreexpresión transitoria de la proteína PKC- θ en células de timoma murino dio como resultado una activación transcripcional de una construcción controlada por el promotor de interleucina-2 (Baier et ál., Eur. J. Biochem. 225: 195-203(1994)), lo que indica una función de PKC- θ en las vías de señalización de linfocitos T. También se ha demostrado que PKC- θ se activa en el transcurso de la activación de linfocitos T mediada por el receptor de linfocitos T, y esta activación se correlaciona con la translocación de la molécula de PKC- θ en la membrana plasmática en el sitio de contacto de APC (patente estadounidense n.º 6,040,152). PKC- θ también se ha implicado en otros procesos celulares, incluida la apoptosis (Datta et ál., J. Biol. Chem. 272: 20317-20320 (1997)), disposición citoesquelética (Pietromonaco et ál., J. Biol. Chem. 273: 7594-7603 (1998); Simons et ál., Biochem. Biop-ys. Res. Commun. 253: 561-565 (1998)), proliferación (Passalacqua et ál., Biochem. J 337: 113-118 (1999)), y angiogénesis y reparación de heridas (Tang et ál., J. Biol. Chem. 272: 28704- 25 28711 (1997)). El estado de fosforilación refleja el estado de activación de la molécula PKC- θ , en donde la fosforilación indica la activación. Un profesional experto puede determinar fácilmente el estado de fosforilación/estado de activación de las moléculas PKC- θ mediante el uso de ensayos fácilmente disponibles en la técnica. Por ejemplo, el estado de fosforilación de la molécula PKC- θ puede determinarse mediante el uso de un anticuerpo específico para la forma de fosforilación de la proteína PKC- θ (por ejemplo, anti-fosfo T538), que se

encuentra comercialmente disponible. De manera alternativa, el estado de fosforilación de la molécula PKC- θ puede determinarse mediante su movilidad en un gel, mediante el uso de un anticuerpo que reconoce PKC- θ (independientemente del estado de fosforilación) para la detección. De manera alternativa, el estado de activación de PKC- θ puede determinarse mediante la evaluación de la actividad de las quinasas de la molécula PKC- θ (Kupfer et ál., U.S. Patent No. 6,040,152), o mediante la evaluación de la translocación en la membrana en el punto de contacto de APC (Kupfer et aa., patente estadounidense n.º 6,040, 152). La determinación del estado de fosforilación/activación de PKC- θ también puede realizarse mediante métodos indirectos, por ejemplo, detección de una actividad o evento corriente abajo.

Los agentes que potencian las interacciones entre RGMb y PD-L2 o bloquean o inhiben la interacción de PD-L2 con un receptor de coestimulación pueden identificarse por su capacidad para inhibir la proliferación de las células inmunitarias, y/o la función efectora, o para inducir la anergia, eliminación clonal y/o agotamiento cuando se agregan a un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en presencia de un agente que estimula la transducción de señales a través de un receptor de activación. Pueden emplearse una serie de lecturas de activación celular reconocidas para medir la proliferación celular o función efectora (por ejemplo, producción de anticuerpos, producción de citocinas, fagocitosis) en presencia del agente de activación. La capacidad de un agente de prueba para bloquear esta activación puede determinarse fácilmente al medir la capacidad del agente de provocar una reducción en la proliferación o función efectora que se está midiendo, mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica.

Por ejemplo, los agentes de esta invención pueden analizarse para determinar la capacidad de inhibir o potenciar la coestimulación en un ensayo de linfocitos T, tal como se describe en Freeman et ál. (2000) J. Exp. Med. 192:1027 y Latchman et ál. (2001) Nat. Immunol. 2:261. Los linfocitos T CD4⁺ pueden aislarse de PBMC humanas y estimularse con un anticuerpo anti-CD3 de activación. La proliferación de linfocitos T puede medirse mediante la incorporación de ³H timidina. Un ensayo puede realizarse con o sin coestimulación de CD28 en el ensayo. Pueden realizarse ensayos similares con linfocitos T Jurkat y con blastos PHA de PBMC.

De manera alternativa, los agentes de la presente invención pueden analizarse para determinar la capacidad de modular la producción celular de las citocinas que son producidas por las células inmunitarias, o cuya producción es potenciada o inhibida en estas, en respuesta a la modulación de la actividad RGMb/PD-L2. Por ejemplo, las células inmunitarias que expresan RGMb pueden estimularse de forma subóptima *in vitro* con una señal de activación primaria, por ejemplo, los linfocitos T pueden estimularse con éster de forbol, anticuerpo anti-CD3 o, preferiblemente, antígeno en asociación con una molécula de MHC de clase II, y proporcionarse una señal de coestimulación, por ejemplo, mediante una forma estimulante de antígeno de la familia B7, por ejemplo, mediante una célula transfectada con ácido nucleico que codifica un polipéptido B7 y expresa el péptido en su superficie o mediante una forma estimulante soluble del péptido. Las citocinas conocidas liberadas en los medios pueden identificarse mediante ELISA o mediante la capacidad de un anticuerpo que bloquea la citocina para inhibir la proliferación de células inmunitarias o la proliferación de otros tipos de células que es inducida por la citocina. Por ejemplo, un kit ELISA IL-4 se encuentra disponible en Genzyme (Cambridge MA), al igual que un anticuerpo de bloqueo de IL-7. Los anticuerpos de bloqueo contra IL-9 e IL-12 se encuentran disponibles en Genetics Institute (Cambridge, MA). Es posible determinar el efecto de la estimulación o el bloqueo de la interacción de RGMb y PD-L2 sobre el perfil de las citocinas. Un ensayo *in vitro* de coestimulación de células inmunitarias, tal como se describió anteriormente, también puede usarse en un método para identificar citocinas novedosas que pueden modularse mediante la modulación de la actividad de la actividad RGMb/PD-L2. Por ejemplo, si una actividad particular inducida tras la coestimulación, por ejemplo, proliferación de células inmunitarias, no puede inhibirse mediante la adición de anticuerpos de bloqueo contra citocinas conocidas, la actividad puede ser provocada por la acción de una citocina desconocida. Después de la coestimulación, esta citocina puede purificarse a partir de los medios mediante métodos convencionales y su actividad puede medirse por su capacidad para inducir la proliferación de células inmunitarias. Para identificar las citocinas que pueden cumplir una función en la inducción de la tolerancia, puede usarse un ensayo *in vitro* de coestimulación de linfocitos T, tal como se describió anteriormente. En este caso, los linfocitos T podrían recibir la señal de activación primaria y ponerse en contacto con una citocina, pero podrían no recibir la señal de coestimulación. Después de lavar y dejar descansar las células inmunitarias, las células podrían reestimularse con una señal de activación primaria y una señal de coestimulación. Si las células inmunitarias no responden (por ejemplo, proliferan o producen citocinas) estas han generado tolerancia y la citocina no ha impedido la inducción de tolerancia. Sin embargo, si las células inmunitarias responden, la inducción de tolerancia ha sido impedida por la citocina. Estas citocinas que son capaces de impedir la inducción de tolerancia pueden dirigirse para el bloqueo *in vivo* junto con reactivos que bloquean los antígenos de linfocitos B como un medio más eficiente para inducir la tolerancia en receptores de trasplantes o sujetos con enfermedades autoinmunitarias.

En aun otra realización, un ensayo de la presente invención es un ensayo sin células para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto un PD-L2 o una proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre el PD-L2 o la proteína RGMb o parte biológicamente activa de esta. La unión del compuesto de prueba puede determinarse de forma directa o indirecta, tal como se describió anteriormente. En una realización preferida, el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido, o una parte biológicamente activa de esta, con su compañero de unión para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un

compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con el polipéptido en la mezcla de prueba, en donde la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para interactuar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del compuesto de prueba para unirse de forma preferencial al polipéptido, o parte biológicamente activa de este, en comparación con el compañero de unión.

Por ejemplo, RGMb y PD-L2 pueden usarse para formar una mezcla de ensayo y la capacidad de un polipéptido para bloquear esta interacción puede evaluarse mediante la determinación de la capacidad de RGMb para unirse a PD-L2 mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. En algunas modalidades, ya sea para ensayos basados en células o sin células, el compuesto de prueba puede evaluarse, además, para determinar si afecta la unión y/o la actividad de interacción entre PD-1 y PD-L2. Otros métodos de análisis de unión útiles incluyen el uso del análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo et ál. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Tal como se usa en la presente, «BIA» es una tecnología para estudiar las interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los componentes que interactúan (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) puede usarse como una indicación de reacciones en tiempo entre polipéptidos biológicos. Los polipéptidos de interés pueden inmovilizarse en un chip BIAcore y pueden evaluarse múltiples agentes (anticuerpos de bloqueo, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) con respecto a la unión al polipéptido de interés. Un ejemplo de uso de la tecnología BIA se describe en Fitz et ál. (1997) Oncogene 15:613.

Los ensayos sin células de la presente invención pueden utilizar formas de proteínas solubles y/o unidas a la membrana. En el caso de los ensayos sin células en los que se utiliza una forma de proteína unida a la membrana (por ejemplo, RGMb o PD-L2 en la superficie celular), puede ser conveniente utilizar un agente solubilizante, de modo que la forma de proteína unida a la membrana se mantenga en la solución. Los ejemplos de dichos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecopolí(éter de etilenglicol)_n, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), o sulfonato de N-dodecil=N,N-dhnetil-3-amonio-1-propano.

En una o más realizaciones de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser conveniente inmovilizar cualquiera de los polipéptidos para facilitar la separación de las formas de proteína que se encuentran en complejo y las que no se encuentran en complejo, así como para adaptarlas a la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a un polipéptido puede lograrse en cualquier recipiente adecuado que pueda contener los reactivos. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrifuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que agrega un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a la matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/polipéptido RGMb, o proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/diana pueden ser absorbidas en microesferas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St Louis, MO) o placas de microtitulación derivadas de glutatión, que se combinan luego con el compuesto de prueba, y la mezcla se incubó en condiciones que conducen a la formación de un complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para la sal y el pH). Luego de la incubación, las microesferas o las placas de microtitulación se lavan para eliminar los componentes sin unir, la matriz se inmoviliza en el caso de las microesferas, los complejos se determinan ya sea de forma directa o indirecta, por ejemplo, tal como se describió anteriormente. De manera alternativa, los complejos se pueden disociar de la matriz, y el nivel de unión o actividad del polipéptido se determina mediante el uso de técnicas estándar.

En una realización alternativa, la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de un polipéptido de interés (por ejemplo, RGMb o PD-L2) puede lograrse tal como se describió anteriormente para los ensayos basados en células tal como mediante la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de un polipéptido que funciona corriente abajo del polipéptido. Por ejemplo, es posible determinar los niveles de mensajeros secundarios, es posible determinar la actividad del polipéptido que interactúa en una diana apropiada, o es posible determinar la unión del polipéptido que interactúa con una diana apropiada, tal como se describió previamente.

Esta invención se refiere, además, a agentes novedosos identificados mediante los ensayos de análisis descritos anteriormente. Por consiguiente, además, se encuentra dentro del alcance de esta invención el uso de un agente identificado tal como se describe en la presente en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un agente identificado tal como se describe en la presente puede usarse en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios de un tratamiento con dicho agente. De manera alternativa, un agente identificado tal como se describe en la presente puede usarse en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, esta invención se refiere a usos de agentes novedosos identificados mediante los ensayos de detección descritos anteriormente para los tratamientos que se describen en la presente memoria.

IV. Composiciones farmacéuticas

Es posible incorporar agentes que modulan (por ejemplo, inhiben o promueven) la interacción de RGMb y PD-L2, con o sin el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L2, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos de bloqueo,

péptidos, proteínas de fusión o moléculas pequeñas, en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Dichas composiciones comprenden típicamente el anticuerpo, péptido, proteína de fusión o molécula pequeña y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión «portador farmacéuticamente aceptable» incluya cualesquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. En la técnica se conoce el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de estos en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Se formula una composición farmacéutica de la invención de modo que sea compatible con su vía de administración deseada. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos, antioxidantes tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes tal como ácido etilendiaminatetraacético; amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad, tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede colocar en ampollas, jeringas descartables o frascos de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida en la medida en que exista la posibilidad de incluirla en una jeringa fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de estos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, es preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente adecuado con uno de los ingredientes mencionados anteriormente o una combinación de estos, según sea necesario, seguida de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril de estos.

En general, las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden estar contenidas en cápsulas de gelatina o en comprimidos. A los efectos de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, caramelos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar mediante el uso de un portador fluido para utilizar como enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se utiliza como enjuague y se expectora o se traga. Se pueden incluir materiales adyuvantes y/o agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, las grageas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como un dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se administran en forma de un spray en aerosol de un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración

transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para penetrar la barrera. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de atomizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas, tal como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

En una realización, los agentes moduladores se preparan con portadores que protegerán el compuesto de la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato etilvinílico, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense n.º 4,522,811.

Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria, tal como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se desea tratar, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. Las especificaciones de las formas de dosificación unitarias de la invención se estipulan mediante y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo, el efecto terapéutico particular que se desee alcanzar y las limitaciones inherentes a la técnica de la producción de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos altos. Si bien se pueden usar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe prestar atención al diseñar un sistema de administración que dirige dichos compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y los estudios en animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación a ser utilizado en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra, preferiblemente, dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en prototipos de animales para lograr un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar de manera más correcta las dosis útiles para los seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Los agentes moduladores descritos anteriormente pueden administrarse en forma de ácidos nucleicos expresables que codifican dichos agentes. La presente invención también comprende dichos ácidos nucleicos y composiciones que los contienen. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y utilizarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, administración local (véase la patente estadounidense 5,328,470) o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et ál. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica de un vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual está incrustado el vehículo de administración del gen. De manera alternativa, cuando el vector de administración del gen completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración del gen.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador, junto con las instrucciones para su administración.

V. Usos y métodos de la invención

Los agentes moduladores descritos en la presente pueden usarse de acuerdo con una serie de métodos relacionados con la modulación de la interacción entre RGMb y PD-L2 y la modulación correspondiente (por ejemplo, regulación por aumento o regulación por disminución) de las respuestas inmunitarias.

1. Métodos profilácticos

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir en un sujeto una enfermedad o afección asociada con una respuesta inmune no deseada o menos deseable. Los sujetos en riesgo de una enfermedad que podrían beneficiarse del tratamiento con los agentes o los métodos reivindicados pueden identificarse, por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica. La administración de un agente profiláctico puede producirse antes de la manifestación de los síntomas asociados con una respuesta inmunitaria no deseada o menos deseable. El agente adecuado utilizado para el tratamiento (por ejemplo, anticuerpos, péptidos, proteínas de fusión o moléculas pequeñas) pueden determinarse en función de las indicaciones clínicas y pueden identificarse, por ejemplo, mediante el uso de los ensayos de detección descritos en la presente memoria.

2. Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para modular una respuesta inmunitaria, por ejemplo al modular la interacción entre RGMb y PD-L2.

Los métodos moduladores de la presente invención implican poner en contacto una célula con un agente que modula la interacción entre RGMb y PD-L2. El agente ilustrativo que modula la interacción entre RGMb y PD-L2 se describió anteriormente. Por ejemplo, un agente que modula la actividad del polipéptido RGMb o PD-L2 incluye una molécula de ácido nucleico o proteína, una molécula diana de proteína RGMb o PD-L2 de origen natural (por ejemplo, receptores de PD-1, BMP-2, BMP-4, BMP), un anticuerpo anti-RGMb o anti-PD-L2, agonistas o antagonistas de RGMb o PD-L2 (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antisentido, oligonucleótido triple y ribozimas), un mimético peptídico de un agonista o antagonista de RGMb o PD-L2, agonistas o antagonistas de ácido nucleico de la expresión o actividad de RGMb o PD-L2, u otra molécula pequeña.

En una realización preferida, un agente que modula la expresión de RGMb o PD-L2 es, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antisentido, un oligonucleótido triple, una ribozima o un vector recombinante para la expresión de una proteína RGMb o PD-L2.

Estos agentes moduladores pueden administrarse *in vitro* (por ejemplo, al poner en contacto la célula con el agente) o, de manera alternativa, *in vivo* (por ejemplo, mediante la administración del agente a un sujeto). Como tal, la presente invención se refiere a métodos para tratar a un individuo afectado por una enfermedad o un trastorno que podría beneficiarse de la modulación de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, mediante la modulación de la interacción entre RGMb y PD-L2.

3. Regulación por disminución de respuestas inmunitarias mediante la modulación de las interacciones de RGMb/PD-L2

Existen diversas realizaciones de la invención para regular por aumento la función inhibidora provocada por la interacción de RGMb con PD-L2 para regular por disminución de ese modo las respuestas inmunitarias (por ejemplo, agentes que promueven la unión de PD-L1 a RGMb). La regulación por disminución puede ser en forma de la inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria que ya está en proceso o puede implicar la inducción de una respuesta inmunitaria. Las funciones de las células inmunitarias activadas pueden inhibirse mediante la regulación por disminución de las respuestas de células inmunitarias o mediante la inducción de anergia específica de las células inmunitarias, o ambas.

En una realización de la invención, se induce tolerancia contra antígenos específicos mediante la coadministración de un antígeno con un agente (por ejemplo, anticuerpo, péptido, proteína de fusión o molécula pequeña) que bloquea la interacción entre RGMb y PD-L2. Por ejemplo, puede inducirse tolerancia a proteínas específicas. En una realización, pueden inhibirse las respuestas inmunitarias a alérgenos (por ejemplo, alérgenos de alimentos) o a proteínas extrañas para las que no se desea una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los pacientes que reciben Factor VIII frecuentemente generan anticuerpos contra este factor de coagulación. La coadministración de un agente que potencia una señal inhibidora mediada por RGMb/PD-L2 en combinación con el factor recombinante VIII (o al enlazarse físicamente con el Factor VII, por ejemplo, mediante reticulación) puede dar como resultado la regulación por disminución. De manera similar, puede inducirse una reducción de la eliminación clonal y/o un aumento del agotamiento (por ejemplo, agotamiento de linfocitos T).

En otra realización, los métodos de tratamiento pueden usar, además, agentes que bloquean una actividad de las vías coestimuladoras, tales como las de otros antígenos de linfocitos B similares a B7-1, B7-2 o B7-3) para regular por disminución aún más las respuestas inmunitarias. Es posible combinar dos agentes separados que modulan las respuestas inmunitarias como una sola composición o administrarse por separado (de forma simultánea o secuencial) para regular por disminución de forma más eficaz las respuestas inmunitarias mediadas por células inmunitarias en un sujeto. Además, es posible usar una cantidad terapéuticamente activa de uno o más de los

agentes en cuestión, junto con otros reactivos de modulación por disminución para influir en las respuestas inmunitarias. Los ejemplos de otros reactivos inmunomoduladores incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos que bloquean una señal coestimuladora (por ejemplo, contra CD28 o ICOS), anticuerpos que actúan como agonistas de CTLA4 y/o anticuerpos contra otros marcadores de células inmunitarias (por ejemplo, contra CD40, contra el ligando de CD40 o contra citocinas), proteínas de fusión (por ejemplo, CTLA4-Fc), y fármacos inmunosupresores (por ejemplo, rapamicina, ciclosporina A o FK506).

La regulación por disminución de las respuestas inmunitarias es útil para tratar una serie de afecciones, por ejemplo, en situaciones de trasplante de tejidos, piel y órganos, en la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), o en enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, alergia, un trasplante, respuesta de hipersensibilidad, un trastorno que requiera un aumento de la función o producción de linfocitos T CD4+, un trastorno que requiera una mayor eficiencia de la vacunación, un trastorno que requiera un aumento de la función o producción de linfocitos T, y un trastorno que requiera una mayor eficiencia de la vacunación. Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células inmunitarias da como resultado una reducción de la destrucción del tejido en trasplante de tejido. Típicamente, en trasplantes de tejido, el rechazo del trasplante comienza mediante su reconocimiento como extraño por parte de las células inmunitarias, seguido de una reacción inmunitaria que destruye el trasplante. La administración de un agente descrito en la presente memoria antes o durante el trasplante puede promover la generación de una señal inhibitoria. Además, la inhibición también puede ser suficiente para causar la anergia de las células inmunitarias, induciendo de ese modo la tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia a largo plazo evita la necesidad de administración repetida de estos reactivos de bloqueo.

La modulación por disminución de las respuestas inmunitarias también es útil para el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria. Muchos trastornos autoinmunitarios son provocados por una activación inadecuada de las células inmunitarias que son reactivas contra el tejido propio y que promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. Prevenir la activación de células inmunitarias autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. La administración de los agentes descritos en la presente memoria es útil para prevenir la generación de autoanticuerpos o citocinas que pueden estar implicados en el proceso de la enfermedad. Adicionalmente, los agentes que promueven una función inhibitoria mediada por la interacción entre RGMb y PD-L2 pueden inducir tolerancia específica al antígeno de las células inmunitarias autorreactivas, lo que podría provocar un alivio de la enfermedad. La eficacia de los reactivos para prevenir o aliviar los trastornos autoinmunitarios puede determinarse mediante el uso de una serie de modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Los ejemplos incluyen encefalitis autoinmunitaria experimental murina, lupus eritematoso sistémico en ratones *MRL/lpr/lpr* o ratones híbridos NZB, artritis de colágeno autoinmunitaria murina, diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB, y miastenia grave experimental murina (véase, por ejemplo, Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, Tercera edición 1993, capítulo 30).

La inhibición de la activación de células inmunitarias también es útil terapéuticamente en el tratamiento de alergias y reacciones alérgicas, por ejemplo, al inhibir la producción de IgE. Las reacciones alérgicas pueden ser de naturaleza sistémica o local, dependiendo de la vía de entrada del alérgeno y el patrón de depósito de IgE en mastocitos o basófilos. Por lo tanto, la inhibición de las respuestas alérgicas mediadas por células inmunitarias (por ejemplo, alimentos) de forma local o sistémica mediante la administración de un agente descrito en la presente memoria que promueve una función inhibitoria mediada por RGMb y PD-L2.

La inhibición de la activación de las células inmunitarias también puede ser importante terapéuticamente en infecciones parasitarias y virales de las células inmunitarias. Por ejemplo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la replicación viral es estimulada por la activación de las células inmunitarias. La modulación de estas interacciones puede dar como resultado la inhibición de la replicación viral y mejorar de ese modo el curso del SIDA. La modulación de estas interacciones también puede ser útil para promover el mantenimiento del embarazo. Las mujeres en riesgo de embarazo espontáneo (por ejemplo, las que han tenido un aborto espontáneo previamente o las que han tenido dificultades para concebir) debido a rechazo inmunológico del embrión o feto pueden ser tratadas con los agentes que modulan estas interacciones.

La regulación por disminución de una respuesta inmunitaria mediante la modulación de la interacción entre RGMb y PD-L2 también puede ser útil para el tratamiento de un ataque autoinmunitario de tejidos autólogos. Por lo tanto, la modulación de las afecciones exacerbadas por ataque autoinmunitario, tales como trastornos autoinmunitarios, así como afecciones tales como enfermedad cardíaca, infarto de miocardio y aterosclerosis, se encuentra dentro del alcance de la invención.

4. Regulación por aumento de respuestas inmunitarias mediante la modulación de las interacciones de RGMb/PD-L2

Los agentes descritos en la presente también pueden usarse para regular por aumento las respuestas inmunitarias. En una realización, el bloqueo de la interacción entre RGMb y PD-L2 da como resultado la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria. La regulación por aumento de las respuestas inmunitarias puede ser en forma de potenciar una respuesta inmunitaria existente o provocar una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, potenciar la respuesta inmunitaria mediante el uso de las composiciones y los métodos en cuestión es útil para el tratamiento del cáncer, una enfermedad infecciosa (por ejemplo, bacterias, virus o parásitos), una infección parasitaria, asma asociada con una alteración de la tolerancia de las vías respiratorias, una enfermedad neurológica y una

enfermedad inmunosupresora.

Los trastornos infecciosos ilustrativos incluyen enfermedades virales de la piel, tales como herpes o herpes zóster, en cuyo caso dicho agente puede administrarse tópicamente en la piel. Además, las enfermedades virales sistémicas, tales como la gripe, el resfriado común, y la encefalitis pueden aliviarse mediante la administración sistémica de dichos agentes. En una modalidad preferida, los agentes que regulan por aumento la respuesta inmunitaria descritos en la presente memoria son útiles para modular el equilibrio de arginasa/iNOS durante la infección por *Trypanosoma cruzi* para facilitar una respuesta inmunitaria de protección contra el parásito.

De manera alternativa, las respuestas inmunitarias pueden potenciarse en un paciente infectado a través de un enfoque *ex vivo*, por ejemplo, al quitar las células inmunitarias del paciente, poner en contacto las células inmunitarias *in vitro* con un agente que modula la interacción entre RGMb y PD-L2, y reintroducir las células inmunitarias estimuladas *in vitro* en el paciente.

En determinados casos, puede ser conveniente administrar, además, otros agentes que regulan por aumento las respuestas inmunitarias, por ejemplo, formas de otros miembros de la familia B7 que transducen señales a través de receptores de coestimulación, para aumentar aún más la respuesta inmunitaria.

Los agentes que regulan por aumento una respuesta inmunitaria pueden usarse de forma profiláctica en vacunas contra diversos polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos derivados de patógenos). La inmunidad contra un patógeno (por ejemplo, un virus) puede inducirse mediante vacunación con una proteína viral junto con un agente que regula por aumento una respuesta inmunitaria, en un adyuvante apropiado.

En otra realización, la regulación por aumento o mejora de una función de la respuesta inmunitaria, tal como se describe en la presente memoria, es útil en la inducción de la inmunidad tumoral.

En otra realización, la respuesta inmunitaria puede estimularse mediante los métodos descritos en la presente memoria, de modo que se superen la tolerancia, la eliminación clonal y/o el agotamiento (por ejemplo, agotamiento de linfocitos T) preexistentes. Por ejemplo, las respuestas inmunitarias para los antígenos contra los cuales el sujeto no puede montar una respuesta inmunitaria significativa, por ejemplo, contra un antígeno autólogo, tal como un antígeno específico de un tumor, pueden inducirse mediante la administración de agentes adecuados descritos en la presente memoria que regulan por aumento la respuesta inmunitaria. En una realización, puede coadministrarse un antígeno autólogo tal como un antígeno específico de un tumor. En otra realización, puede estimularse una respuesta inmunitaria contra un antígeno (por ejemplo, un antígeno autólogo) para tratar un trastorno neurológico. En otra realización, los agentes en cuestión pueden usarse como adyuvantes para aumentar las respuestas a los antígenos extraños en el proceso de inmunización activa.

En una realización, las células inmunitarias se obtienen de un sujeto y se cultivan *ex vivo* en presencia de un agente, tal como se describe en la presente memoria, para expandir la población de células inmunitarias y/o potenciar la activación de las células inmunitarias. En una realización adicional, las células inmunitarias se administran luego a un sujeto. Las células inmunitarias pueden estimularse *in vitro*, por ejemplo, al proporcionar a las células inmunitarias una señal de activación primaria y una señal de coestimulación, tal como se conoce en la técnica. Varios agentes también pueden usarse para coestimular la proliferación de las células inmunitarias. En una realización, las células inmunitarias se cultivan *ex vivo* de acuerdo con el método descrito en la solicitud de PCT n.º WO 94/29436. El polipéptido de coestimulación puede ser soluble, estar unido a una membrana celular o unido a una superficie sólida, tal como una microesfera.

En incluso otra realización, los agentes descritos en la presente memoria útiles para la regulación por aumento de las respuestas inmunitarias pueden enlazarse, además, o unirse operativamente, a toxinas mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, reticulación o mediante técnicas de ADN recombinante. Dichos agentes también pueden provocar la destrucción celular de células deseadas. En una realización, una toxina puede conjugarse con un anticuerpo, tal como un anticuerpo biespecífico. Dichos anticuerpos son útiles para dirigirse a una población específica de células, por ejemplo, mediante el uso de un marcador que se encuentra solo en cierto tipo de células, por ejemplo, una célula que expresa RGMb y/o PD-L2. En general, en la técnica se conoce la preparación de inmunotoxinas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,340,535 y EP 44167). Se conocen diversos tipos de enlazadores que contienen enlaces disulfuros que pueden emplearse con éxito para conjugar el resto de toxina con un polipéptido. En una realización, se prefieren los enlazadores que contienen un enlace disulfuro «impedido» estéricamente debido a su mayor estabilidad *in vivo*, impidiendo de ese modo la liberación del resto de toxina antes de la unión en el sitio de acción. Se conoce una amplia variedad de toxinas que pueden conjugarse con los polipéptidos o anticuerpos de la invención. Los ejemplos incluyen: diversas toxinas derivadas de plantas, hongos o incluso bacterias útiles que, a modo de ejemplo, incluyen varias toxinas de la cadena A, particularmente, la cadena A de ricina, proteínas inactivadoras de ribosomas tales como saporina y gelonina, α -sarcina, aspergilina, restrictocina, ribonucleasas tales como ribonucleasa placentaria, angiogénica, toxina de difteria y exotoxina de *Pseudomonas*, etc. Un resto de toxina preferido para su uso en relación con la invención es la cadena A de toxinas que se ha tratado para modificar o eliminar la cadena A desglucosilada de los residuos de carbohidratos. (Patente estadounidense 5,776,427). La infusión de uno o una combinación de dichos agentes

citotóxicos (por ejemplo, fusiones de ricina) en un paciente puede provocar la destrucción de las células inmunitarias.

V. Administración de agentes

5 Los agentes inmunomoduladores de la invención se administran a los sujetos en forma biológicamente compatible adecuada para la administración farmacéutica *in vivo*, para potenciar o suprimir las respuestas inmunitarias mediadas por células inmunitarias. «Forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*» significa una forma de la proteína para administración en la que cualquier efecto tóxico se ve superado por los efectos terapéuticos de la proteína. El término «sujeto» pretende incluir organismos vivos en los cuales se pueda
10 provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, mamíferos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de estos. La administración de un agente descrito en la presente memoria puede tener cualquier forma farmacológica que incluya una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente solo o en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 La administración de una cantidad terapéuticamente activa de la composición terapéutica de la presente invención se define como una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un agente puede variar de acuerdo con ciertos factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del péptido para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas pueden administrarse diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

20 Los agentes de la invención descritos en la presente memoria pueden administrarse de forma conveniente, como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica o administración rectal. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, para la administración de los agentes, por vías distintas a la parenteral, puede ser conveniente recubrir el agente, o coadministrar el agente, con un material que impide su inactivación.

30 Un agente puede administrarse a un individuo en un portador, diluyente o adyuvante apropiado, coadministrarse con inhibidores de enzimas o en un portador apropiado tal como liposomas. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones amortiguadoras acuosas. El término adyuvante se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto inmunoestimulante tal como interferón. Los adyuvantes contemplados en la presente memoria incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como oleiléter de polioxietileno y n-hexadecil éter de polietileno. Los inhibidores de enzimas incluyen el inhibidor pancreático de tripsina, diisopropilfluorofosfato (DEEP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite en agua, así como también liposomas convencionales (Sterna et ál. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

40 El agente también puede administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos, así como en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

45 Las composiciones farmacéuticas de agentes adecuados para uso inyectable incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, preferiblemente, la composición será estéril y fluida en la medida en que exista la posibilidad de colocarla en una jeringa fácilmente. Preferiblemente, será estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conservará contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de estos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, es preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

60 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un agente de la invención (por ejemplo, un anticuerpo, péptido, proteína de fusión o molécula pequeña) en la cantidad necesaria en un solvente apropiado con una o más combinaciones de los ingredientes antemencionados, según sea necesario, seguido por una esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del agente

más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril de estos.

Cuando el agente está protegido de forma adecuada, tal como se describió anteriormente, la proteína puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Tal como se usa en la presente, un «portador farmacéuticamente aceptable» incluye cualesquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retardan la absorción, y similares. En la técnica se conoce el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de estos en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Las «formas de dosificación unitaria», tal como se usan en la presente, se refieren a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones de las unidades de dosificación de la invención son dictadas por, y dependen directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y los efectos terapéuticos particulares que se desean lograr y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

En una realización, un agente de la invención es un anticuerpo. Tal como se define en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo (es decir, una dosis eficaz) varía de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, preferiblemente, de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente, de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, y aun más preferiblemente, de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg, o 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la técnica se dará cuenta de que determinados factores pueden influir en la dosificación necesaria para tratar de manera eficaz a un sujeto, los cuales incluyen, de modo no taxativo, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos anteriores, la salud general y/o la edad del sujeto, así como la presencia de otras enfermedades. Asimismo, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata a un sujeto con un anticuerpo en el intervalo entre aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente, entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente, entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente, durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Se apreciará también que la dosificación eficaz del anticuerpo utilizado para el tratamiento se puede aumentar o reducir en el transcurso de un tratamiento específico. Los cambios en la dosificación pueden surgir a partir de los resultados de ensayos de diagnóstico.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deberían considerarse como taxativos. El contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas que se cita a lo largo de la presente solicitud, así como las Figuras, se incorporan a la presente mediante referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos para los Ejemplos 2-12

A. Ratones

Se obtuvieron ratones de tipo salvaje (WT) BALB/cJ, ratones BALB/cByJ y ratones C57BL/6 de Jackson Laboratory. Se han descrito los antecedentes de ratones KO PD-L2 en BALB/c (Keir et ál. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26:677-704). Se usaron ratones DO11.10 OVA TCR transgénicos como donantes de linfocitos T CD4+ específicos de OVA (Tsitoura et ál. (1999) J. Immunol. 163:2592-2600). Se usaron ratones hembra de la misma edad a las 6-12 semanas. Los protocolos de animales fueron aprobados por los Comités de Uso y Cuidado de Animales en el Hospital de Niños de Boston, el Instituto de Cáncer Dana-Farber y la Escuela de Medicina de Harvard.

B. Células y medios de cultivo

300 células de la línea de pre-linfocitos B de ratón se transfectaron mediante electroporación con ADNc de mRGMB o hRGMB en el vector de expresión pEFGF-Puro. Las células se seleccionaron en un medio que contenía puromicina, se clasificaron y se subclonaron. La expresión en la superficie celular de mRGMB y hRGMB se verificó mediante citometría de flujo mediante el uso de un anticuerpo policlonal mRGMB (R&D) y un mAb hRGMB (R&D), respectivamente. Previamente, se han elaborado otras células transfectadas tales como 300-mPD-L2, 300-mPDL1, 300-mPD-1, y Jurkat-hPD-1, mediante el uso del mismo método. Las células se cultivaron en RPMI-1640 (Mediatech) suplementado con FBS inactivado por calor al 10 % (Invitrogen), estreptomycin/penicilina al 1 %, gentamicina 15 µg/ml (Invitrogen), glutamax al 1 % (Invitrogen), y β-mercaptoetanol 50 µM (Sigma-Aldrich) a 37 °C con CO₂ al 5 %.

Las líneas celulares utilizadas en la presente memoria se obtuvieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), con la excepción de SN12C que se obtuvieron en el Instituto Nacional del Cáncer (NCI).

Los bazos de los ratones o las células LN para los experimentos de tolerancia se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (Invitrogen) suplementado con FBS al 10 %, glutamax al 1 %, p-mercaptoetanol 50 µM a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 10 %.

C. Clonación de la expresión de RGMb en células COS

Un panel de bibliotecas de expresión de ADNc de linfocitos activados murinos se transfectó transitoriamente en células COS mediante el uso de DEAE-Dextrano o Lipofectamina como facilitador (Freeman et ál. (1989) J. Immunol. 143:2714-2722). Después de 44 horas, las células COS se cosecharon y se cribaron en placas de petri recubiertas con mPD-L2-mIgG2a/IgA. Se recuperó el ADN episomal y se electroporó en DH10B/P3 de *E. coli*. Se utilizó fusión de esferoplastos para reintroducir los plásmidos en las células COS para las rondas posteriores y el cribado. Antes de la segunda y tercera ronda, se retiraron las células COS con expresión de PD-1 mediante la incubación con mAb PD-1 seguido por agotamiento con microesferas magnéticas de cabra anti-IgG de rata. Después de la tercera ronda de cribado, los plásmidos individuales se transfectaron en COS y se verificó la unión de PD-L2-Ig a RGMb mediante citometría de flujo en las células COS transfectadas transitoriamente con mRGMb. Se aislaron al menos cuatro ADNc de mRGMb independientes.

D. Generación de anticuerpos

Las ratas se inmunizaron 3 veces mediante inyección intramuscular e intravenosa de ADNc de plásmido mRGMb (Latchman et ál. (2001) Nat. Immunol. 2:261-268), y se aumentó 3 veces con mRGMb-HIS recombinante (R&D) mediante inyección i.p. y s.c. Los sobrenadantes de hibridoma se analizaron mediante citometría de flujo en 300 células transfectadas con mRGMb o ELISA en placas recubiertas con mRGMb recombinante (R&D). Los hibridomas se subclonaron hasta lograr estabilidad y los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía por afinidad de proteína G, y se verificó que tuvieran niveles de endotoxina inferiores a 2 EU/mg de proteína. Los clones 307.9D1 (IgG2a de rata) y 307.1H6 (IgG2a de rata) se seleccionaron para su uso en los Ejemplos que se describen en la presente memoria. Además, la Tabla 2 proporciona un resumen de las capacidades de bloqueo de varios anticuerpos monoclonales mRGMb y mPD-L2.

Tabla 2: Capacidades de bloqueo de mAb mRGMb y mPD-L2

Anticuerpos	mRGMb a mPD-L2	mPD-L2 a mPD-1	mRGMb a mBMP-2/4
mAb mRGMb			
307,9D1, 307, 8B2	Sí	N.A.	Sí
307.1H6, 307.9D3, 307.5G1	No	N.A.	No
mAb mPD-L2			
GF17.2C9	Sí	No	N.A.
mAb mPD-L2 3.2. TY25	Sí	Sí	N.A.

N.A.: No corresponde

Finalmente, la Tabla 3 proporciona secuencias para el anticuerpo monoclonal aislado de rata anti-ratón/anti-humano RGMb 9D1. En resumen, el dominio variable de las cadenas ligera y pesada del mAb 9D1 se ha secuenciado y se proporcionan los dominios de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de este. La numeración se muestra de acuerdo con las posiciones, y los residuos de aminoácidos correspondientes, correspondientes a las CDR, por ejemplo, pueden identificarse fácilmente en función de las traducciones proporcionadas.

Tabla 3: Secuencias de mAb 9D1

Secuencias de aminoácidos y ADN variable de cadena ligera (vK) de 9D1	
DEFINICIÓN DE LOCUS	9D1_LS-VK 378 pb de AND lineal de 9D1, ADN 378
CARACTERÍSTICAS	Ubicación/Calificador
Segmento_J	349..378 /marcador=JK
Segmento_V	325..348 /marcador=CDR3
Región_V	229..324 /marcador=FWR3
Segmento_V	208..228 /marcador=CDR2
Región_V	163..207 /marcador=FWR2
Segmento_V	130..162 /marcador=CDR1
Región_V	61..129 /marcador=FWR1
Péptido_ señal	1..60 /vntifkey="94" /label=LS
CDS	1..378 /marcador=9D1\LS-VF

/traducción="MMAAVQLLGLLLCLRAMRCIDIQMTQSPSHLSASVGRVT
LSCKVSONIYKYNWYQQKLGEAPKLLIYYTSFLQTGIPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSLPEDVATYFCQKYISGWTFTGGGKLELK"

ORIGEN DE RECUENTO DE
BASES

103 a

91 c

89 g

95 t

1 atgatggctg cagttcagct cttagggctt ttgtgtgtct gcttcogagc catgagatgt
61 gacatccaga tgaccagtc tocttcacac ctgtcagcat ctgtgggaga cagagtcact
121 ctcatgtgca aagtaagtca gaatatattac aagtacttaa actgggtatca gcaaaaactt
181 ggagaagctc ccaaaactcct gatataattat acaagctttt tgcaaacggg catcccgta
241 aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat tacacactca ccatcagcag cctgcagcct
301 gaagatgttg ccacataatt ctgccagaag tattatagcg ggtggacgtt cgggtggagga
361 accaagctgg aattgaaa

Secuencias de aminoácidos y ADN variable de cadena pesada de 9D1

DEFINICIÓN DE LOCUS

9D1_LS-VH 408 pb de AND lineal de 9D1, ADN 408

CARACTERÍSTICAS

Ubicación/Calificador

Segmento_J

376..408 /marcador=JH

Segmento_V

352..375 /marcador=CDR3

Región_V

256..351 /marcador=FWR3

Segmento_V

205..255 /marcador=CDR2

Región_V

163..204 /marcador=FWR2

Segmento_V

148..162 /marcador=CDR1

Región_V

88..147 /marcador=FWR1

Péptido_ señal

1..87 /marcador=LS

CDS

1..408 /marcador=9D1LS-VH

/traducción= "MGWSQIILFLVAATTCVHISOVOLOQSGTELKPGSSVKIS
CKASGDTFTSDYMHWIRQQPGSGLEWIGWIYPGNGNTKYNQKFDGKATLTADKS
SSTAYLQLSLLTSEDYAVYFCARQTEGYFDYWGQGMVTVSS"

5

ORIGEN DE RECUENTO DE
BASES

107 a

97 c

106 g

98 t

Secuencias de aminoácidos y ADN variable de cadena pesada de 9D1

DEFINICIÓN DE LOCUS 9D1_LS-VH 408 pb de AND lineal de 9D1, ADN 408 bases

CARACTERÍSTICAS Ubicación/Calificador

1 atgggatgga gccagatcat totctttctg gtggcagcaa ctacatgtgt ccactcccag
61 gtacagctac agcaatcagg gactgaactg gtgaagcctg ggtcctcagt gaaaatttcc
121 tgcaaggctt ctggcgacac cttcaccagt gactatatgc actggataag gcagcagcct
181 ggaagtggcc ttgagtggat tgggtggatt tatcctggaa atggtaatac taagtacaat
241 caaaagtctg atgggaaggc aacactcact gcagacaaat cctccagcac agcctatttg
301 cagctcagcc toctgacatc tgaggactat gcagtctatt totgtgcaag acagacggag
361 gggtactttg attactgggg ccaaggagtc atggtoacag totcctca

E. Generación de proteínas de fusión de Ig

- 10 Las proteínas de fusión mRGMb-Ig se generaron mediante la unión del dominio extracelular de mRGMb con la parte Fc de proteína IgG2a de ratón, mutada para reducir la unión de FcR (Latchman et ál. (2001) Nat. Immunol. 2:261-268). las proteínas de fusión mPD-L2-hlgG1/IgA se generaron mediante la unión del dominio extracelular de PD-L2 con la parte Fc portion de hlgG1 y la parte de la cola de hlgα. Las proteínas de fusión de Fc se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo de células CHO mediante cromatografía por afinidad de proteína A o proteína G y se verificó
- 15 que tuvieran niveles de endotoxina inferiores a 2 EU/mg proteína. Previamente, se ha descrito otras proteínas de fusión de Ig utilizadas (Latchman et ál. (2001) Nat. Immunol. 2:261-268).

F. Ensayo de conjugación celular

- 20 Se desarrolló un ensayo para determinar la unión de receptor-ligando en función de la unión celular determinada por citometría de flujo. Un tipo celular transfectado se marcó con el tinte rojo PKH26 (Sigma) y las otras células transfectadas con el tinte verde PKH67 (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células marcadas con tinte rojo y tinte verde (105 de cada tipo celular) se incubaron en 200 µl de amortiguador HBSS sin calcio y magnesio (GIBCO) suplementado con FBS inactivado por calor al 10 % (Invitrogen), gentamicina 15 µg/ml

(Invitrogen) y HEPES al 1 % (Invitrogen) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 45 min a 37 °C. Cuando se usó el ensayo de conjugación celular para evaluar la capacidad de bloqueo de los anticuerpos, un tipo de células transfectadas se incubó previamente durante 30 min a TA con anticuerpos antes de agregar el otro tipo de células transfectadas. La formación de conjugados se analizó inmediatamente mediante citometría de flujo mediante el uso del canal PE para el tinte rojo y el canal FITC para el tinte verde. Se usó el cosechador automático de placas de FACSCanto (BD Biosciences) para la uniformidad del procesamiento celular. La configuración del instrumento fue la siguiente, modo de rendimiento: estándar, configuración de cargador: velocidad de flujo de muestra en 0,5 µl/segundo, volumen de muestra y volumen de mezcla en 100 µl, velocidad de muestra en 50 µl/segundo, cantidad de mezclas en 2, y volumen de lavado en 400 µl.

G. Citometría de flujo

Las células se tiñeron con anticuerpos diana y controles de isotipo mediante el uso de procedimientos de citometría de flujo estándar, y se analizaron en FACSCanto (BD Biosciences) y software FlowJo 9.2 (TreeStar).

Para verificar inicialmente la expresión de RGMb en células transfectadas con mRGMb o hRGMb se usaron anti-mRGMb de oveja (R&D) o IgG de oveja (SouthernBiotech) más IgG-PE de burro anti-oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y anti-hRGMb de ratón (mAb, R&D) más IgG-PE de cabra anti-ratón (SouthernBiotech), respectivamente, todos a 10 µg/ml.

Para evaluar las especificidades de unión de los anticuerpos mRGMb, mRGMb o hRGMb transfectados, 300 células se incubaron con diluciones en serie de sueros, sobrenadantes de cultivo o anticuerpos purificados, después, se detectó la unión con 5µg/ml de IgG-PE de cabra anti-rat (SouthernBiotech). Para el mAb mRGMb 9D1 conjugado con biotina, se usó 1,4 µg/ml de estreptavidina-PE.

Para el ensayo de unión de receptor-ligando, 300 células transfectadas con mRGMb o hRGMb y células de control (300 células y linfocitos T Jurkat transfectados con hPD-1) se tiñeron con diluciones en serie de mPD-L2-hlgG1/IgA o control-hlgG1/IgA más 5 µg/ml de Fab2 anti-hlgG-PE de cabra (absorbido por ratón, SouthernBiotech), o con diluciones en serie de mPD-L1-mIgG2a o control-mIgG2a más 10 µg/ml de anti-mIgG2a-PE de cabra (SouthernBiotech). 300 células transfectadas con mPD-L2 y 300 células se tiñeron con diluciones en serie de mRGMb-mIgG2a o control-mIgG2a más 5 µg/ml de Fab2 anti-mIgG2a-PE de cabra (SouthernBiotech).

Para evaluar la expresión en la superficie celular de RGMb y PD-L2 en las líneas de células de ratón RAW264.7, J774.1 y C2C12, se usaron mAb mRGMb 9D1 conjugados con PE, mAb mPD-L2 TY25 o IgG2a de rata a 5 µg/ml; las líneas de células RAW264.7 y J774.1 se preincubaron con mAb de receptor de Fc (2.4G2).

Para analizar la expresión de la superficie celular de RGMb en líneas de células cancerosas humanas, se usaron mAb mRGMb 1H6 o IgG2a de rata a 10 mg/ml más IgG-PE de cabra anti-rata (SouthernBiotech) a 5 µg/ml.

Para los análisis de citometría de flujo intracelular de la expresión de RGMb en células primarias de bazo, timo y pulmón, las células se tiñeron primero con LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (Invitrogen) a 1:1000. Después de la incubación previa con mAb de receptor de Fc de ratón (2.4G2), las células se tiñeron para la detección de marcadores superficiales con diferentes combinaciones de los siguientes anticuerpos (BioLegend): CD3-Pacific Blue, CD4-PE-cy7, CD8-aloficocianina (APC), CD19-PE-cy7, CD11c-APC y F4/80-APC. Luego, las células se permeabilizaron mediante el uso del kit de fijación/permeabilización BD Cytofix/Cytoperm™. Se usó PBS que contenía BSA al 3 % y Triton X-100 al 0,1 % para el lavado y la incubación de anticuerpos en los siguientes procedimientos. Si se usaron anticuerpos conjugados con biotina, la biotina endógena se bloqueó con el kit de bloqueo de biotina endógena (Molecular Probes), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron con mAb mRGMb 9D1 conjugado con PE o IgG2a de rata a 5 µg/ml, o mAb mRGMb 9D1 conjugado con biotina o IgG2a de rata a 2,5 µg/ml más estreptavidina-PE o -APC (BD Biosciences) a 1 µg/ml después de la incubación previa con mAb de receptor de Fc (2.4G2) y hlgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Para la tinción de Foxp3, se usaron reactivos de fijación/permeabilización de Foxp3 de eBioscience y Foxp3-PE (BioLegend). Se usaron 300 células y 300 células transfectadas con mPD-L2 como controles negativos.

Se identificaron linfocitos T DO11.10 mediante tinción con TCRp-APC-eFluor 780, CD4-PerCP y KJ1-26-APC (eBioscience). Se identificaron células Treg DO11.10 mediante el uso de CD25-FITC (BioLegend), seguido por tinción intracelular con Foxp3-PE, tal como se describió anteriormente.

H. ELISA

Para examinar la especificidad de los mAb mRGMb, placas de 96 pocillos se recubrieron con 2 µg/ml de mRGMa-HIS, mRGMb-HIS, o mRGMc-HIS recombinante (R&D). Luego, se agregaron diluciones en serie de mAb mRGMb y controles de isotipo y se incubaron durante 1 hora (h) a 37 °C. Se usó IgG de ratón anti-rata (Y-específico)-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 1:2500 para la detección.

Para examinar la interacción de RGMa/RGMb/RGMc y PD-L2, las placas de 96 pocillos de ELISA se recubrieron con 2 o 5 µg/ml de mRGMa-HIS, mRGMb-HIS, mRGMc-HIS, o hRGMb-HIS recombinante (R&D). Luego, se agregaron diluciones en serie de mPD-L2- hlgG1/IgA, mPD-L2-mIgG2a/IgA, hPD-L2-mIgG2a o proteínas de fusión de control-

Ig, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se usó Fab₂ anti-hlgG-HRP de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories) o anti-mIgG2a-HRP de rata (BD Biosciences) a 1:1000 o 1:10000 para la detección.

Para evaluar las capacidades de los anticuerpos mRGMb y las proteínas de fusión mPD-L2 para bloquear la unión de RGMb a BMP-2/4, las placas de 96 pocillos de ELISA se recubrieron con 1 µg/ml de BMP-2 (GIBCO) o BMP-4 recombinante de ratón (R&D). Los anticuerpos mRGMb, controles de isotipo, mPD-L2-hlgG1/IgA, mPD-L2-mIgG2a/IgA, o proteínas de fusión de control de Ig en las concentraciones indicadas se incubaron previamente con 20 µg/ml mRGMb-HIS (R&D) durante 45 min. a 4 °C, luego, se agregaron a las placas y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Se usó anti-penta-HIS-HRP (Qiagen) a 1:1000 was para la detección.

Para determinar si RGMb se une a PD-L2 y BMP-2/4 simultáneamente, las placas de 96 pocillos de ELISA se recubrieron con BMP-2/4 tal como se describió anteriormente. mPD-L2-hlgG1/IgA, mPD-L2-hlgG (R&D), mPD-L1-hlgG (R&D) o las proteínas de fusión de control-Ig a 10 µg/ml se incubaron previamente con 10 µg/ml mRGMb-HIS (R&D) o amortiguador solo durante 15 min. a temperatura ambiente (TA), luego, se agregaron a las placas y se incubaron durante 1 h a 37 °C. De manera alternativa, se agregó 10 mg/ml mRGMb-HIS (R&D) o amortiguador solo primero a las placas y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después del lavado, se agregó mPD-L2-Ig o proteínas de fusión de control-Ig se incubaron durante 1 h a 37 °C. Se usó Fab₂ anti-hlgG-HRP de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 1:10000 para la detección.

El sustrato para HRP fue el sistema de sustrato de peroxidasa de micropocillos TMB (KPL).

I. Aislamiento y estimulación celular

Se aislaron células del bazo y el timo mediante interrupción mecánica de los tejidos. Los esplenocitos se trataron con amortiguador de lisado de glóbulos rojos (Sigma).

Para obtener células pulmonares para la citometría de flujo y transferencia western o para analizar DC esplénicas, se digirieron piezas de tejidos de los pulmones o el bazo en RPMI 1640 con FBS 5 %, 1 mg/ml colagenasa IV (Sigma) y 200 U/ml DNasa I (Roche) y luego se trataron con amortiguador de lisado de glóbulos rojos (Sigma).

Los macrófagos alveolares pulmonares y los macrófagos intersticiales para el análisis de transferencia Western se clasificaron mediante citometría de flujo en función de su expresión diferencial de F4/80 y CD11c (F4/80+CD11c+ para lo macrófagos alveolares y F4/80+ CD11c- mara los macrófagos intersticiales), tal como se describió previamente en Bedoret et ál. (2009) J. Clin. Invest. 119:3723-3738.

Los macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato para la transferencia Western se obtuvieron de ratones BALB/c el día 4 después de la inyección i.p. con tioglicolato al 3 % (DIFCO).

Las células CD4+ y CD8+ para la transferencia Western se purificaron a partir de esplenocitos de ratón mediante el uso del kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ y el kit de aislamiento de linfocitos T CD8+ (Miltenyi Biotec Inc.).

Los esplenocitos estimulados con FLT-3L se obtuvieron de los ratones 2 semanas después de la inyección s.c. de la línea tumoral RENCA transfectada con FLT-3L.

Los linfocitos T activados se prepararon mediante la estimulación de esplenocitos o timocitos con mAb CD3 2C11 en placas recubiertas (BD Biosciences) a 10 mg/ml y/o mAb CD28 37.51 soluble (BD Biosciences) a 1 mg/ml durante 6 días, luego, se lavaron y se reestimularon con mAb CD3 en placas recubiertas (10 µg/ml) solo o junto con mAb CD28 soluble (1 µg/ml) durante 2 días. Se analizaron las células los días 1 y 3 después de la estimulación primaria y el día 2 después de la estimulación secundaria mediante RT-PCR en tiempo real de Taqman o citometría de flujo.

J. RT-PCR en tiempo real de Tagman

Se aislaron muestras de ARN total mediante el uso del mini kit RNeasy (QIAGEN). Se realizó transcripción inversa mediante el uso del kit de transcripción inversa Quantitect (QIAGEN). Se usaron ensayo de expresión génica de Taqman (Applied Biosystems) para mRGMb (Mm00724273_ml), mPD-L2 (Mm00451734_ml), mPD-1(Mm00435532_ml) y el control endógeno de ratón GAPDH (Mm99999915_g1) en la PCR en tiempo real llevada a cabo en un sistema de PCR en tiempo real 7300 (Applied Biosystems). Se calculó el múltiplo de cambio en comparación con GAPDH mediante el método ΔCt.

K. Transferencia Western

Se prepararon lisados celulares mediante el uso de amortiguador RIPA con comprimidos de inhibidoras de proteína ULTRA completas (Roche). Los lisados (60-80 µg/carril para las líneas celulares y células primarias y 0,5 o 1 µg/carril para las células 300 transfectadas con RGMb) se ejecutaron en SDS-PAGE en condiciones de reducción y se llevó a cabo la transferencia Western mediante el uso de mAb mRGMb de rata 1H6 (10 µg/ml) más IgG-HRP anti-rata de cabra (Santa Cruz Biotechnology) (1:5000). Para la transferencia del control de carga, las membranas se trataron con amortiguador de eliminación de transferencia Western Restore Plus (Thermo Scientific) y se transfirieron con p-actina anti-ratón de ratón (Abcam) (1:5000) más IgG-HRP anti-ratón de cabra (Santa Cruz Biotechnology) (1:4000). Las bandas de proteínas en las membranas se visualizaron mediante el uso de técnicas

quimioluminiscentes estándar.

L. Tinción inmunohistoquímica y microscopía confocal

Las células se colocaron en cubreobjetos en medio de cultivo el día antes a la tinción. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7 % durante 15 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS que contenía BSA al 0,5 %, las células se permeabilizaron en PBS que contenía BSA al 0,5 % y Triton X-100 al 0,5 % durante 30 min. La biotina endógena se bloqueó con el kit de bloqueo de biotina endógena (Molecular Probes), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido por bloqueo en PBS que contenía BSA al 3 % y Triton X-100 al 0,1 % durante 30 min. a temperatura ambiente y tres lavados en PBS que contenía BSA al 0,5 % y Triton X-100 al 0,1 %. Luego, las células se incubaron con mAb mRGMB 1H6 conjugado con biotina o IgG2a de rata conjugada con biotina a 0,5 µg/ml en PBS que contenía BSA al 1 % y Triton X-100 al 0,1 % durante dos horas a temperatura ambiente, seguido por tres lavados tal como se indicó anteriormente. Posteriormente, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 0,5 µg/ml en PBS que contenía BSA al 1 % y Triton X-100 al 0,1 % durante una hora a temperatura ambiente, seguido por tres lavados tal como se indicó anteriormente. Finalmente, las células se tiñeron con Phalloidin-TRIC (Sigma) aa 50 µg/ml para marcar la F-actina, y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje. Se tomaron imágenes mediante el uso de un microscopio confocal Nikon D-Eclipse C1 equipado con un láser de iones Melles Griot 488 (con un filtro de emisión 515/30), un láser Melles Griot 543 (con un filtro de emisión 590/50), un láser Melles Griot 640 y el software de adquisición confocal Nikon EZ-C1 versión 3.90.

M. Tolerancia respiratoria y tratamiento con mAb

Para inducir la tolerancia, ratones WT BALB/cByJ o PD-L2-/- levemente anestesiados recibieron 100 mg de OVA sin LPS (Worthington Biochemical) en PBS o PBS solo (control) mediante instilación intranasal los días 0, 1 y 2. En algunos experimentos, los ratones fueron tratados con mAb de bloqueo de RGMB, PD-L2, PD-L1 o PD-1 o anticuerpo de control i.p. el día -1 (400 µg/ratón) y el día 2 (200 µg/ratón). El día 12, los ratones se inmunizaron con 50 µg de OVA (ICN Biomedical) adsorbido en 2 mg de alumbre. Se recogieron los bazo el día 19 y los esplenocitos o esplenocitos sin B (Figura 8D) se reestimularon *in vitro* con OVA. Los cultivos se impulsaron con 1 µCi de 3H-timidina durante las 17 h finales y se recogieron a las 96 h. Se recogió el sobrenadante del cultivo a las 96 h para ELISA de IL-4.

N. Transferencia de linfocitos T DO 11.10 y tolerancia respiratoria

Los linfocitos T DO 11.10 seleccionaron positivamente de los bazo de ratones Tg DO 11.10 mediante incubación con microesferas magnéticas CD4+ y se clasificaron mediante el uso de columnas MACS (Miltenyi Biotec Inc.). Cada recipiente recibió 2 x10⁵ o 5 x10⁶ linfocitos T DO11.10 i.v., seguido por tres dosis intranasales de 100 µg de OVA sin LPS OVA los días 0, 1, 2 y mAb tal como se indicó. Se analizaron las células de los LN mediastínicos mediante citometría de flujo los días 3, 5 o 7.

O. Análisis estadístico

Se realizó la prueba t de Student de dos colas y ANOVA en dos vías, seguido por pruebas de comparaciones múltiples de Tukey o Dunnett mediante el uso de GraphPad Prism versión 6.00 para MacOS X, software GraphPad, La Jolla California E.E. U.U. (disponible en internet en graphpad.com. p<0.05 se consideró significativo. Los datos son el promedio±SEM.

Ejemplo 2: RGMB se une a PD-L2, pero no a PD-L1 u otras moléculas relacionadas

RGMB, también conocido como DRAGON, es un miembro de la familia RGM que consiste en RGMa, RGMB y RGMc/hemojuvelina (Severyn et ál. (2009) Biochem J. 422:393-403). Las RGM son proteínas de membrana ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se unen a proteínas morfogénicas óseas (BMP) y neogenina (Conrad et ál. (2010) Mol. Cell Neurosci. 43:222-231). Las BMP consisten en una familia con no más de 20 miembros relacionados con la familia del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) (Bragdon et ál. (2011) Cell Signal. 23:609-620 y Yoshioka et ál. (2012) Eur. J. Immunol. 42:749-759). RGMB se une directamente a BMP-2 o BMP-4, que a su vez se unen a los receptores tipo I (ALK1, ALK2, ALK3, y ALK6) y los receptores tipo II (BMPRII, ActRIIa y ActRIIb) (Corradini et ál. (2009) Cytokine Growth Factor Rev. 20:389-398 y Yoshioka et ál. (2012) Eur. J. Immunol. 42:749-759). Las RGM coordinan la utilización de los receptores de BMP específicos (Corradini et ál. (2009) Cytokine Growth Factor Rev. 20:389-398). Las RGM no señalan directamente, pero puede actuar como correceptores (por ejemplo, RGMB se une directamente a BMP-2/4) que modulan la señalización de BMP (Samad et ál. (2005) J. Biol. Chem. 280:14122-14129).

RGMB se expresa y funciona en el sistema nervioso (Severyn et ál., 2009). Además, la expresión de RGMB se observa en macrófagos y otras células del sistema inmunitario (Xia et ál., 2010). Una función de RGMB en el sistema inmunitario apenas comienza a emerger (Galligan et ál., 2007; Xia et ál., 2010). Los ratones con deficiencia de RGMB tienen un fenotipo letal temprano.

Por lo tanto, se determinó si PD-L1 interactúa con RGMB. Las células del tipo de «células 300.19» transfectadas con RGMB de ratón (mRGMB), también conocidas como «células 300-mRGMB» expresan la proteína RGMb y pueden unirse a las proteínas de fusión mPD-L2-Ig, pero no a la proteína de fusión mPD-L1-Ig u otras proteínas de fusión de Ig relacionadas con la familia B7, según se determinó mediante análisis de citometría de flujo (Figuras 1A-1C). De

manera similar, las células transfectadas con mPD-L2 también se unen a la proteína de fusión mRGMb-Ig (Figuras 1D-1E). Las células del tipo de células 300 transfectadas con RGMb humana (hRGMb) también se unen a la proteína de fusión de Ig mPD-L2 (Figuras 1F-1G).

Los análisis del ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) demostraron, además, que mRGMb se une a mPD-L2 y hPD-L2, y que hRgmb se une a hPD-L2 y mPD-L2 (Figuras 1H-1I). Por lo tanto, la interacción de RGMb:PD-L2 se produce tanto en ratones como en humanos. Los resultados de ELISA también muestran que mPD-L2 se une a mRGMb, pero no a mRGMa o mRGMc (Figura 1J).

Para evaluar la interacción de RGMb:PD-L2 en condiciones más fisiológicas, se usó un ensayo de conjugación celular donde un tipo de células transfectadas se marcó con un tinte rojo y el otro tipo de células transfectadas se marcó con un tinte verde. La unión de los dos tipos de células se evaluó mediante citometría de flujo y se indicó mediante eventos positivos dobles (puntos amarillos). En las Figuras 1K, 1M, 1O y 1Q, el panel superior muestra los gráficos de FSC-SSC y el panel inferior muestra los gráficos de puntos correspondientes. Las Figuras 1L, 1N, 1P y 1R solo muestran los gráficos de puntos sin los gráficos de FSC-SSC correspondientes. Tal como se esperaba, las células mRGMb se unieron a las células mPD-L2 (Figura 1K), pero no a las células mPD-L1 (Figura 1L). Como controles positivos, las células mPD-1 se unieron a las células mPD-L2 y mPD-L1 (Figuras 1M-1N). Los ensayos de unión de control negativo tuvieron muy pocos conjugados (<0.3 %) (Figuras 1O-1R). Estos resultados muestran que RGMb se une específicamente a PD-L2, pero no a PD-L1, y la orientación estructural es compatible con la unión de superficie celular a superficie celular de RGMb y PD-L2.

Ejemplo 3: Los anticuerpos monoclonales anti-RGMb se unen a RGMb, pero no a RGMa o RGMc

El análisis de citometría de flujo muestra que los anticuerpos anti-mRGMb que se generaron (por ejemplo, los clones 9D1, 1H6, 8B2, 9D3, 5G1 y 7A7) se unen a las células 300 transfectadas con mRGMb o hRGMb (véase, por ejemplo, las Figuras 2A-2F). Los datos de ELISA muestran que los anticuerpos anti-mRGMb a mRGMb, pero no a mRGMa o mRGMc (Figura 2G).

Ejemplo 4: Capacidades de bloqueo de los anticuerpos anti-RGMb, anticuerpos anti-PD-L2, proteínas de fusión de RGMb-Ig y PD-1-Ig

Se usó un ensayo de conjugación celular para evaluar las capacidades de bloqueo de los anticuerpos y las proteínas de fusión. Las Figuras 3A, 3B y 3D muestran que las células 300-mRGMb fueron capaces de unirse a las células 300-mPD-L2, mientras que las Figuras 3C y 3E muestran que las células 300-mPD-1 fueron capaces de unirse a las células 300-mPD-L2.

La Figura 3A muestra las capacidades de bloqueo de los anticuerpos anti-mRGMb ilustrativos. En particular, los anticuerpos anti-mRGMb 9D1 y 8B2 bloquearon la unión de mRGMb a mPD-L2, mientras que los anticuerpos anti-mRGMb 1H6, 9D3 y 5G1 no bloquearon la unión de mRGMb a mPD-L2.

Las Figuras 3B y 3C muestran las capacidades de bloqueo de los anticuerpos anti-PD-L2. Específicamente, el anticuerpo anti-PD-L2 2C9 bloqueó la unión de mRGMb a mPD-L2, pero no la unión de mPD-1 a mPD-L2. Por el contrario, los anticuerpos anti-PD-L2 3.2, TY25 y MIH37 bloquearon la unión de mRGMb a mPD-L2 y la unión de mPD-1 a mPD-L2. Finalmente, el anticuerpo anti-PD-L2 4H3 no bloqueó la unión de mRGMb a mPD-L2 ni la unión de mPD-1 a mPD-L2. La existencia de mAb PD-L2 de bloqueo simples y dobles indica que los sitios de unión a PD-1 y RGMb en PD-L2 son cercanos pero distintos.

Las Figuras 3D y 3E muestran que mPD-1-Ig redujo la unión de mRGMb a mPD-L2, mientras que mRGMb-Ig no tuvo efectos sobre la unión de mPD-1 a mPD-L2. Este resultado indica que la unión de RGMb a PD-L2 es más débil que la de PD-1 a PD-L2.

Dado que RGMb se une directamente a BMP-2/4, se analizó la capacidad de los anticuerpos RGMb para bloquear la unión de RGMb a BMP-2/4. 9D1 y 8B2 bloquearon la unión de RGMb a BMP-2/4 en un ELISA (Figuras 3F-3G) y, por lo tanto, son bloqueadores duales de la interacción de RGMb con PD-L2 y BMP. Sin embargo, la proteína de fusión PD-L2-Ig no pudo bloquear la unión de RGMb a BMP-2/4 en un ELISA (Figuras 3F-3G). Estos datos indican que los sitios de unión en RGMb para PD-L2 y BMP son cercanos pero distintos.

También se determinó si el anticuerpo anti-PD-L2 2C9 bloqueador simple se une a un epítipo diferente al de los bloqueadores dobles. Los datos de citometría de flujo muestran que el anticuerpo anti-mPD-L2 3.2 bloqueó la unión del anticuerpo anti-mPD-L2 TY25-PE a las células 300-mPD-L2, mientras que los anticuerpos anti-mPD-L2 2C9 y 4H3 no lo hicieron. Estos resultados indican que 3.2 y TY25 comparten el mismo epítipo, mientras que 2C9 y 4H3 reconocen epítopos diferentes al de TY25.

Ejemplo 5: PD-L2 y BMP-2/4 se unen a sitios de unión cercanos pero distintos en RGMb y ambos pueden unirse simultáneamente a RGMb

Para evaluar si RGMb puede unirse a PD-L2 y BMP al mismo tiempo, se realizó un ELISA para analizar la capacidad de unión de la proteína de fusión PD-L2-Ig con BMP-2/4 inmovilizado en presencia o ausencia de RGMb. PD-L2 no pudo unirse directamente a BMP-2/4, pero en presencia de RGMb pudo formar un complejo con BMP cuando se

agregó RGMb y PD-L2-Ig simultáneamente (Figuras 4A-4B) o posteriormente a BMP-2/4. Estos datos son consistentes con que RGMb tiene sitios de unión distintos para la unión de PD-L2 y BMP y muestran que RGMb tiene la capacidad de formar un complejo trimérico con BMP y PD-L2.

Estos datos coinciden con los resultados de otros estudios, que incluyen Corradini et ál. (2009) Cytokine Growth Factor Rev. 20:389-98 y Yoshioka et ál. (2012) Eur. J. Immunol. 42:749-59, en los cuales se propone en la presente memoria que existe un complejo de señalización que implica las interacciones de RGMb, PD-L2, BMP-2/4 y los receptores de BMP tipo I y tipo II (Figura 4C, panel izquierdo). Los dímeros de BMP-2 o BMP-4 enlazan el RGMb con los receptores de BMP tipo I, que luego reclutan los receptores de BMP tipo II que fosforilan los receptores de BMP tipo I en un complejo de señalización. El complejo fosforila Smad1/5/8 o la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 my la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), lo que produce la transcripción génica de la diana corriente abajo. El panel derecho de la Figura 4C muestra la unión de PD-L2 a PD-1, lo que da como resultado la fosforilación de tirosina del dominio citoplasmático de PD-1, el reclutamiento de las tirosina fosfatasas, particularmente, SHP-2, y la atenuación de las señales del receptor de antígeno. Por lo tanto, PD-L2, que puede unirse a PD-1 o RGMb, puede participar en dos circuitos de señalización importantes, las vías de señalización de PD-1 y BMP.

Ejemplo 6: Expresión de RGMb en macrófagos de ratón y la estructura de la proteína RGMb

Se ha informado ARNm de RGMb en macrófagos de pulmón de ratón, la línea celular de macrófagos RAW264.7 la línea celular de mioblastos C2C12 (Xia et ál. (2010) J. Immunol. 186:1369-1376), pero no se determinó la expresión de proteínas. La expresión de ARNm de RGMb se confirmó en células de las líneas celulares de macrófagos de ratón RAW264.7 y J774.1 mediante el uso de RT-PCR en tiempo real (Figura 5A) y se demostró la expresión en la superficie celular de la proteína RGMb en estas líneas celulares mediante citometría de flujo mediante el uso de mAb RGMb 9D1 (Figura 5B).

La expresión de la proteína RGMb también se confirmó mediante transferencia Western mediante el uso de mAb RGMb 1H6. Se detectó una banda principal (-37KD) y una banda menor (-49 Kilodaltons (kD)) en las células RAW264.7, J774.1 y C2C12, así como en las células 300 transfectadas con mRGMb (Figuras 5C-5D). No se observaron dichas bandas en las células 300 (Figura 5C), de forma consistente con la ausencia de ARNm de RGMb (Figura 5A). La transferencia Western demostró la expresión de RGMb en macrófagos peritoneal de ratón y macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato (Figura 5E), así como en macrófagos alveolares e intersticiales (Figura 5F). El mAb 1H6 también detectó RGMb humano mediante transferencia Western en las células 300 transfectadas con hRGMb y linfocitos T Jurkat humanos (Figura 5C).

La Figura 5G muestra cómo la escisión proteolítica de RGMb explica estas múltiples bandas de proteínas. RGMb contiene una parte del dominio tipo D del factor de von Willebrand (vWF) con un sitio de escisión proteolítica entre Asp171 y Pro 172. Después de la escisión, los dos fragmentos de RGMb permanecieron conectados por enlaces disulfuro. Se predice que el peso molecular del RGMb no escindido es 40 kD y el RGMb escindido tendrá fragmentos del extremo N y el extremo C de 13 kD y 27 kD, respectivamente. Cada fragmento tiene un sitio de glicosilación unido a N previsto, que puede aumentar el peso molecular de cada fragmento en 5-10 kD. El mAb 1H6 reacciona con un epítipo en el fragmento del extremo C y reconoce la forma escindida de 37 kD, así como la forma no escindida de 49 kD. El análisis de transferencia Western muestra que el RGMb más natural es la forma escindida.

Ejemplo 7: Expresión intracelular y en la superficie celular de RGMb por parte de líneas de células cancerosas humanas

Los estudios previos han informado RGMb en células tumorales de mama y próstata (Li et ál. (2012) Int. J. Oncol. 40:544-550 y Li et ál. (2012) J. Cell Biochem. 113:2523-2531). Se demostró que tanto RGMb como PD-L2 se expresan en la superficie celular de las líneas de células de cáncer de mama humano, MDA-231, SKBR-3 y MCF-7, la línea de células de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H226, así como la línea de células de cáncer renal humano SN12C, mediante el uso de análisis de citometría de flujo (Figura 6A). Los resultados de expresión se confirmaron mediante transferencia Western (Figura 6B). La localización de RGMb en las células SKBR-3 mediante microscopía confocal mostró cantidades sustanciales de RGMb dentro de la célula, aunque es detectable sobre la superficie celular (Figura 6C). Esto coincide con un estudio inmunohistoquímico realizado por Li et ál. (2012) Int. J. Oncol. 40:544-550 que muestra RGMb principalmente en el citoplasma de las células de tumor de próstata.

Ejemplo 8: Expresión intracelular de RGMb pro células hematopoyéticas primarias de ratón

La RT-PCR en tiempo real y transferencia Western mostraron la expresión de RGMb en células del bazo, timo y pulmones, así como en linfocitos T esplénicos CD4+ y CD8+ de ratones sin tratamiento (Figuras 7A-7B). Sin embargo, la expresión de RGMb en la superficie celular no fue detectable mediante citometría de flujo con mAb RGMb 9D1 conjugado con biotina o PE. Los niveles de ARNm de RGMb o proteína no se regularon por aumento en los linfocitos T por la activación de CD3 y/o CD28, lo que indica que RGMb no es una molécula de activación de linfocitos T. La citometría de flujo intracelular con mAb RGMb 9D1 conjugado con PE no detectó la expresión de RGMb en linfocitos T esplénicos (CD3+), linfocitos B (CD19+), o DC (CD11c+) de ratones sin tratamiento (Figura 7C, panel superior), pero se detectaron niveles bajos de expresión de RGMb en estas células de ratones tratados con el ligando de la tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT-3L) para expandir las poblaciones de DC (Figura 7C, panel

central). Al usar el sistema fuerte de biotina/estreptavidina-PE y tinción intracelular, se detectaron niveles bajos de proteína RGMb en las células no estimuladas del bazo, timo, y pulmones de ratón (Figura 7D). Los hallazgos de expresión de RGMb intracelular concuerdan con la expresión intracelular observada en la microscopía confocal de células SKBR-3 (Figura 6C) y la tinción inmunohistoquímica de células cancerosas (Li et ál. (2012) *Int. J. Oncol.* 40:544-550).

Ejemplo 9: El bloqueo de la interacción de RGMb:PD-L2 inhibe la inducción de tolerancia respiratoria

El bloqueo de PD-L2 tiene efectos particularmente fuertes sobre las respuestas inmunitarias en los pulmones (Akbari et ál. (2010) *Mucosal Immunol.* 3:81-91 y Singh et ál. (2010) *Allergy* 66:155-162) y RGMb tiene una expresión alta en los pulmones (Figura 7A). Notoriamente, la neumonitis es el evento adverso más grave informado en los ensayos clínicos en humanos de mAb PD-1 (Topalian et ál. (2012) *N. Engl. J. Med.* 366:2443-2454.). Por lo tanto, se investigó la función de PD-L2 y RGMb en un modelo de ratón de tolerancia respiratoria inducida por OVA.

La tolerancia respiratoria es un estado de falta de respuesta inmunológica específica de antígenos inducida por la exposición a antígenos inocuos inhalados en el tracto respiratorio. Se comparó el desarrollo de la tolerancia respiratoria en ratones de tipo salvaje (WT) y con deficiencia de PD-L2. Para inducir la tolerancia, los ratones se expusieron por vía intranasal (i.n.) a OVA o control de PBS los días 0, 1 y 2. Los ratones se estimularon mediante inmunización con OVA en alumbre i.p. el día 12, y se examinaron las respuestas de los linfocitos T esplénicos una semana después mediante reestimulación *in vitro* de linfocitos T con antígeno (Figura 8A). Las células de los ratones WT que se expusieron a OVA intranasal desarrollaron tolerancia, tal como se demuestra la reducción significativa de la proliferación de linfocitos T y las respuestas de IL-4 en comparación con los ratones de control que no recibieron OVA i.n. (Figura 8B). Sorprendentemente, los ratones con deficiencia de PD-L2 fueron resistentes al desarrollo de tolerancia respiratoria. Los linfocitos T de los ratones con deficiencia de PD-L2 que recibieron OVA i.n. mostraron niveles similares de proliferación y producción de IL-4 que los linfocitos T de los ratones de control con deficiencia de PD-L2 que recibieron PBS i.n. De manera similar, el tratamiento de los ratones WT con un mAb PD-L2 (3.2) que bloquea la interacción de PD-L2:RGMb y PD-L2:PD-1 impidió el desarrollo de tolerancia respiratoria, lo que dio como resultado un aumento de la proliferación y las respuestas de citocinas en comparación con los ratones que desarrollaron tolerancia con el mAb de control (Figura 8C). Estos resultados indican que PD-L2 es crucial para el desarrollo de tolerancia respiratoria.

Dado que PD-L2 puede interactuar con PD-1 y RGMb, se usaron mAb específicos para evaluar la contribución de RGMb en el desarrollo de la tolerancia respiratoria. Los ratones fueron tratados con mAb RGMb 9D1 bloquea RGMb:PD-L2 y RGMb:BMP), con mAb PD-L2 2C9 (bloquea RGMb:PD-L2 pero no PD-1 :PD-L2), o con mAb de control de isotipo. La administración de mAb 2C9 o 9D1 a los ratones que recibieron OVA i.n. inhibió el desarrollo de tolerancia respiratoria y produjo niveles más altos de proliferación de linfocitos T y producción de IL-4 en comparación con los linfocitos T de los ratones que recibieron mAb de control (Figura 8D). Estos resultados indican una función de la interacción de RGMb:PD-L2 para promover el desarrollo de la tolerancia respiratoria.

Ejemplo 10: El bloqueo de la interacción de RGMb:PD-L2 perjudica la expansión de los linfocitos T en antígenos durante el desarrollo de la tolerancia

Los estudios previos de tolerancia respiratoria mostraron que la administración intranasal de antígeno, tal como el polvo doméstico (Hoyne et ál. (1996) *Int. Immunol.* 8:335-342) u OVA (Albacker et ál. (2012) *Mucosal Immunol.* 6:580-590 y Tsitoura et ál. (1999) *J. Immunol.* 163:2592-2600), indujo una fuerte respuesta transitoria de los linfocitos T CD4+, seguida por la eliminación de la mayoría de los linfocitos T específicos de antígenos. Durante el desarrollo de la tolerancia respiratoria, se toman muestras del antígeno inhalado en DC inmaduras del pulmón, que migran a los LN mediastínicos drenantes donde encuentran linfocitos T específicos de antígenos. En ausencia de estímulos inflamatorios, las DC inducen la activación transitoria de los linfocitos T específicos de antígenos, seguida por la eliminación de los linfocitos T y una falta de respuesta (Hawiger et ál. (2001) *J. Exp. Med.* 194:769-779). La tolerancia respiratoria implica múltiples mecanismos, que incluyen la eliminación de linfocitos T específicos de antígenos y el desarrollo de anergia y linfocitos T reguladores (Tregs), y estos procesos pueden producirse simultáneamente (Albacker et ál. (2012) *Mucosal Immunol.* 6:580-590; Bedoret et ál. (2009) *J. Clin. Invest.* 119:3723-3738; Geurts van Kessel et ál. (2008) *Mucosal Immunol.* 1:442-450; Holt et ál. (2004) *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4:39-44).

Para explorar el mecanismo por el cual la interacción de RGMb y PD-L2 mejora la tolerancia respiratoria, se examinó el efecto del bloqueo de la interacción de RGMb:PD-L2 sobre la activación y expansión de los linfocitos T CD4+ DO 11.10 específicos para OVA. Los ratones receptores se trataron con mAb RGMb 9D1 o mAb de control, posteriormente, se proporcionó OVA o PBS por vía intranasal los días 0, 1 y 2, y se monitoreó el destino de los linfocitos T DO 11.10 mediante el uso de mAb KJ1-26 clonotípico (Figura 9A). Como se esperaba, la exposición de los ratones a OVA dio como resultado una expansión marcada de las células DO 11.10 en el LN mediastínico el día 7 en comparación con los ratones que recibieron PBS. Notoriamente, esta expansión de linfocitos T KJ1-26+ disminuyó considerablemente en los ratones que desarrollaron tolerancia tratados con anti-RGMb en comparación con los ratones tratados con mAb de control (Figura 9B, izquierda). La cantidad de linfocitos Treg específicos de OVA (KJ1-26+ Foxp3+) se redujo de manera similar en los ratones tratados con mAb RGMb, lo que indica que la expansión reducida de linfocitos T KJ1-26+ no se debió a una mayor cantidad de linfocitos Treg específicos de OVA (Figura 9B, derecha).

También se examinó el efecto del mAb RGMb sobre la expansión de linfocitos T KJ1-26+ en puntos temporales tempranos. Se detectaron cantidades similares de linfocitos KJ1-26+ en LN de los ratones tratados con mAb RGMb y de control el día 3. Sin embargo, el día 5, la cantidad de linfocitos KJ1-26+ aumentó en los ratones de control, pero

mostró una pequeña expansión en el grupo tratado con mAb RGMb (Figura 9C). Estos hallazgos indican que el bloqueo de RGMb inhibe la inducción de la tolerancia al afectar la expansión de los linfocitos T que se produce normalmente después de la administración respiratoria de OVA.

Para determinar si el tratado con mAb PD-L2 podría inhibir de manera similar la respuesta de los linfocitos T CD4+ específicos de OVA después de la exposición a OVA i.n., los ratones se trataron con mAb PD-L2, mAb RGMb o mAb de control y el día 5 se examinó la cantidad de linfocitos KJ1-26+. Se detectó una reducción en la cantidad de linfocitos KJ1-26+ en los grupos tratados con mAb PD-L2 y mAb RGMb en comparación con los ratones tratados con mAb de control, lo que indica la inhibición de la expansión de linfocitos KJ1-26+ (Figura 9D). Para determinar si el mAb anti-PD-L2 estaba alterando el curso temporal de la respuesta de los linfocitos T, se examinó la respuesta *in vivo* de los linfocitos T DO11.10 con respecto a OVA durante un período de 7 días en ratones tratados con mAb PD-L2 o mAb de control (Figura 9E). En los ratones de control, la cantidad de linfocitos KJ1-26+ en LN mediastínicos aumentó sustancialmente después del día 3, con su máximo el día 5 y disminuyendo luego tal como se describió en Tsitoura et ál. (1999) J. Immunol. 163:2592-2600. En los ratones tratados con mAb PD-L2, se observó un aumento limitado en la cantidad de linfocitos KJ1-26+ entre los días 3 y 5, con una disminución posterior, lo que indica que el bloqueo de PD-L2 inhibió la expresión de linfocitos T específicos de OVA a lo largo de la respuesta. También se comparó la expansión de linfocitos T WT KJ1-26+ T después de la transferencia a ratones con deficiencia de PD-L2 o WT y la exposición a OVA i.n. Entre los días 3 y 5, los linfocitos KJ1-26+ experimentaron una expansión de 72 veces en los receptores WT, pero una expansión de 9,7 veces en los receptores PD-L2-/- (Figura 9F). Esto confirma la importancia de PD-L2 para esta expansión inicial e indica que la expresión de PD-L2 en células distintas a los linfocitos T es necesaria para esta expansión.

Para diseccionar aún más esta interacción y determinar la participación de la vía de PD-1:PD-L2 vs. RGMb:PD-L2 en este proceso, los ratones fueron tratados con mAb PD-L2 2C9 que bloquea solo la interacción de RGMb:PD-L2 o con mAb de control. La expansión de linfocitos KJ1-26+ el día 5 se redujo significativamente en los ratones tratados con mAb 2C9 en comparación con los ratones tratados con control (Figura 9G), lo que indica que PD-1 no es necesario para este efecto dado que 2C9 no bloquea la interacción de PD-L2 con PD-1. Juntos, estos datos indican que el bloqueo de la interacción de RGMb:PD-L2 impide la inducción de la tolerancia respiratoria, y lo hace al reducir la expansión inicial de los linfocitos T CD4+ en respuesta a OVA mediante una vía que no implica PD-1.

Después se examinaron estos efectos del bloqueo de PD-L1 o PD-1 en comparación con PD-L2 sobre la activación inicial y la expansión de los linfocitos T CD4+ específicos de OVA DO 11.10 transferidos. El día 5, los ratones tratados con el mAb PD-L1 9G2 de bloqueo o mAb PD-1 1A2 tenían cantidades sustancialmente más altas de linfocitos KJ1-26+ en los LN mediastínicos que los ratones tratados con mAb de control (Figuras 9H-9I), lo que indicó que el bloqueo del acoplamiento de PD-1 o PD-L1 aumentó significativamente la expansión de linfocitos T específicos de OVA en respuesta a OVA i.n. En contraste, en los ratones tratados con mAb PD-L2, la cantidad de linfocitos KJ1-26+ fue significativamente menor que en los ratones tratados con control (Figura 9I). Estos datos indican, además, que la interacción de RGMb:PD-L2 reduce la expansión inicial de linfocitos T CD4+ en respuesta a OVA mediante una vía que no implica PD-1.

Juntos, estos datos muestran que PD-L2 tiene una función crucial en el desarrollo de la tolerancia respiratoria y que la interacción de PD-L2:RGMb promueve la inducción de la tolerancia respiratoria al respaldar la expansión inicial de los linfocitos T CD4+ en respuesta a OVA tolerogénico. Esta expansión es necesaria para la inducción de la tolerancia y es seguida por la eliminación de los linfocitos T específicos de Ag. Los linfocitos T transferidos a ratones con deficiencia de PD-L2 no experimentaron la expansión inicial de linfocitos T implicada en la tolerancia, lo que indica que la expresión de PD-L2 en células distintas a los linfocitos T proporciona una señal necesaria.

Ejemplo 11: Expresión de RGMb, PD-L2, BMP, BMPR y moléculas relacionadas en subconjuntos de células pulmonares, células epiteliales de las vías respiratorias y células 300

Para explorar los subconjuntos de células pulmonares implicadas en la interacción de RGMb:PD-L2 para promover la tolerancia respiratoria, se analizó la expresión de RGMa, RGMb, RGMc, BMP-2/4/6, receptores de BMP tipo I y tipo II, neogenina (se une a RGMb), netrína 1 (se une a neogenina), PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-1 y B7-2 en subconjuntos de células pulmonares mediante el uso de RT-PCR en tiempo real (Figuras 10A-10G). Las poblaciones de células pulmonares analizadas fueron macrófagos intersticiales (IM, F4/80+CD11c-), macrófagos alveolares (AM, F4/80+CD11c+), células dendríticas (DC, F4/80-CD11c+) y otras células (F4/80-CD11c-). La expresión de RGMa, RGMb, BMP-2/4/6, receptores de BMP tipo I y tipo II, neogenina, y netrína 1 en IM fue notablemente más alta que en AM, mientras que la expresión de PD-L2 fue más alta en DC y muy baja en IM y AM. Un estudio previo informó que se halló que los IM, pero no los AM, producen niveles altos de IL-10 e inhiben la maduración inducida por LPS y la migración de DC, previniendo de ese modo las alergias respiratorias en ratones (Bedoret et ál. (2009) J. Clin. Invest. 119:3723-3738). También se halló que los IM expresaban niveles mucho más altos de IL-10 que los otros tres subconjuntos de células pulmonares (Figura 10H). Estos datos, junto con el modelo de interacción propuesto anteriormente (Figura 4C), indican que RGMb, BMP-2/4 y los receptores de BMP en IM pueden interactuar con PD-

L2 en DC para formar un complejo que induce la producción de IL-10 en IM e inhibe la maduración y migración de DC, que promueve la tolerancia respiratoria.

Dado que las células epiteliales de las vías respiratorias también son importantes en la tolerancia respiratoria, se analizó la expresión de las moléculas anteriores en las líneas de células epiteliales de las vías respiratorias A549 y BET-2A mediante el uso de RT-PCR en tiempo real. Las células A549 tuvieron niveles muy bajos de expresión de todas estas moléculas y BET-2A tuvo un nivel moderado de expresión de RGMb y niveles bajos de expresión de las otras moléculas (Figura 10I). Estos datos indican que las células epiteliales pulmonares pueden no ser el tipo de células que explican la expresión alta de RGMb, BMP y receptores de BMP en las células pulmonares.

Para ver si existe un complejo de RGMb:PD-L2:BMP-2/4:receptores de BMP en las células 300 transfectadas que pueda usarse para el estudio del complejo, se analizó la expresión de las moléculas anteriores en las células 300 y células 300 transfectadas con RGMb mediante el uso de RT-PCR en tiempo real. Las células 300 tuvieron una expresión muy baja o nula de estas moléculas y no presentaron expresión inducida en las células 300 transfectadas con RGMb (Figura 10J). Estos datos indican que la unión de las células 300-RGMb a células 300-PD-L2 es independiente de BMP y los receptores de BMP.

Ejemplo 12: El bloqueo del acoplamiento de RGMb y PD-L2 retrasa la aparición de la enfermedad y reduce la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de enfermedad autoinmunitaria

El efecto del bloqueo del acoplamiento de RGMb/PD-L2 se evaluó en un modelo de ratón de encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) de esclerosis múltiple. Se produjeron ratones EAE mediante inmunización con glucoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG) y tratamiento con toxina pertussis (PT) tal como lo describen Chang et ál. (1999) J. Exp. Med. 190(5):733-40.

Los ratones se trataron con anticuerpo anti-RGMb 9D1 o un anticuerpo de control de isotipo irrelevante. Los anticuerpos se inyectaron el día anterior a la inmunización con MOG/PT (400 µg) y los días 2, 5, 8 y 11 después de la inmunización con MOG/PT (200 µg/inyección).

Los ratones se observaron diariamente con respecto a los signos de EAE, y se puntuaron en una escala de 0-5: 0 (sin enfermedad); 1 (cola flácida); 2 (debilidad de las extremidades posteriores); 3 (parálisis de las extremidades posteriores); 4 (parálisis de las extremidades posteriores y anteriores); y 5 (estado moribundo). La puntuación clínica promedio se calculó al promediar las puntuaciones de todos los ratones en cada grupo. El tratamiento con 9D1 dio como resultado la protección sustancial de EAE, el retraso de la aparición de los síntomas de EAE (día 14 para 9D1 en comparación con el día 9 para el control) y la reducción de la gravedad (puntuación máxima promedio 0.45 para 9D1 con comparación con 2.45 para el control) y la incidencia de los síntomas de EAE (3/10 ratones con 9D1 en comparación con 10/10 ratones para el control). Los resultados se muestran en forma de gráfico en la Figura 11, que grafica la puntuación clínica de EAE con el transcurso del tiempo para ratones tratados con 9D1 y control.

Ejemplo 13: RGMb en tolerancia oral

A diferencia del sistema nervioso entérico, la expresión de RGMb en el epitelio intestinal comienza durante el desarrollo intestinal postnatal. RGMa y RGMb se expresan predominantemente en el compartimento de la cripta proliferativa del epitelio intestinal y en células paneth del intestino delgado. La expresión dependiente del desarrollo en los ganglios entéricos y las células epiteliales intestinales sugiere que RGM puede estar implicada en la migración, diferenciación y apoptosis celular (Metzger et ál. (2005) Dev. Dyn. 234:169-175). Además, se informa que los ratones PD-L2^{-/-} son resistentes al desarrollo de tolerancia oral. (Zhang et ál. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:11695-11700). Dado que PD-L2 puede interactuar con RGMb, se determinó el efecto del bloqueo de RGMb durante la inducción de la tolerancia oral.

La Figura 12 muestra el protocolo del modelo de dosis baja de tolerancia oral utilizado para demostrar que el bloqueo de RGMb inhibe la inducción de la tolerancia oral. Específicamente, el tratamiento de ratones con mAb anti-RGMb 9D1 impidió el desarrollo de la tolerancia oral, lo que dio como resultado un aumento de la proliferación y las respuestas de citocinas en comparación con ratones con tolerancia tratados con mAb de control (Figura 13). Estos datos indican que RGMb tiene una función importante en el desarrollo de la tolerancia oral.

REIVINDICACIONES

1. Un agente para su uso en el tratamiento del asma asociado con una tolerancia alterada de las vías respiratorias, y/o esclerosis múltiple, en el que el agente inhibe la interacción de PD-L2 con RGMb, en donde el agente se pone en contacto con una célula que expresa PD-L2 o una célula que expresa RGMb para regular por aumento la respuesta inmunitaria, en donde el agente es un anticuerpo de bloqueo que se une a RGMb y/o un agente de bloqueo que se une a PD-L2.
2. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde la célula que expresa PD-L2 y/o la célula que expresa RGMb es una célula humana.
3. El agente para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la célula que expresa PD-L2 y/o la célula que expresa RGMb es una célula inmunitaria, preferiblemente, en donde la célula inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B y una célula mielóide.
4. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende, además, poner en contacto la célula con uno o más agentes adicionales que regulan por aumento una respuesta inmunitaria.
5. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo de bloqueo que se une a PD-L2 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-L2 que bloquean la interacción entre PD-L2 y RGMb sin bloquear la interacción entre PD-L2 y PD-1; y anticuerpos anti-PD-L2 que bloquean la interacción entre PD-L2 y RGMb y la interacción entre PD-L2 y PD-1.
6. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-5 en donde se reduce la anergia, agotamiento, y/o eliminación clonal en la célula inmunitaria.
7. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo de bloqueo
 - i) es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno de este; y/o
 - ii) comprende un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fv, Fav, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
8. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo de bloqueo se une a RGMb.
9. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo de bloqueo
 - i) comprende una secuencia variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:14 y/o una secuencia variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:12; y/o
 - ii) comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO:14 y/o secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO:12, preferiblemente, en donde
 - a) la secuencia de CDR1 de cadena ligera consiste en los residuos de aminoácidos 44 - 54 de la SEQ ID NO:12;
 - b) la secuencia de CDR2 de cadena ligera consiste en los residuos de aminoácidos 70-76 de la SEQ ID NO:12;
 - c) la secuencia de CDR3 de cadena ligera consiste en los residuos de aminoácidos 109-116 de la SEQ ID NO:12;
 - d) la secuencia de CDR1 de cadena pesada consiste en los residuos de aminoácidos 50 - 54 de la SEQ ID NO:14;
 - e) la secuencia de CDR2 de cadena pesada consiste en los residuos de aminoácidos 69 - 85 de la SEQ ID NO:14; y/o
 - f) la secuencia de CDR3 de cadena pesada consiste en los residuos de aminoácidos 118-125 de la SEQ ID NO:14.
10. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo de bloqueo que se une a RGMb
 - i) inhibe la inducción de la tolerancia respiratoria; y/o
 - ii) perjudica la expansión de linfocitos T en antígenos.
11. Un método *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, o (d) una proteína PD-L2 con una proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de

prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre PD-L2 y RGMb.

12. Un método *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la actividad de señalización que se produce a partir de la interacción entre PD-L2 y RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas y modular la proliferación celular, preferiblemente, en donde el compuesto de prueba tiene un efecto seleccionado del grupo que consiste en (a) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (b) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por aumento de la fosforilación de PKC- θ ; y (c) regulación por disminución de la señalización de PD-L2/RGMb y regulación por disminución de la fosforilación de SHP-2.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, y una célula mieloide.
14. Un ensayo basado en células *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre PD-L2 y RGMb, preferiblemente, en donde la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, y una célula mieloide.
15. Un ensayo sin células para seleccionar compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto un PD-L2 con una proteína RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la unión entre el PD-L2 y la proteína RGMb o parte biológicamente activa de esta.
16. Un ensayo basado en células *ex vivo* o *in vitro* para seleccionar compuestos que modulan la actividad de señalización que se produce a partir de la interacción entre PD-L2 y RGMb que comprende poner en contacto (a) una célula que expresa PD-L2 con una proteína RGMb; (b) una célula que expresa RGMb con una proteína PD-L2; o (c) una célula que expresa PD-L2 con una célula que expresa RGMb, o una parte biológicamente activa de esta, y además con un compuesto de prueba, y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modular la fosforilación de ERK1 o ERK2, modular la fosforilación de PKC- θ , modular la fosforilación de SHP-2, modular la producción de citocinas y modular la proliferación celular, preferiblemente, en donde la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, y una célula mieloide.

Figura 1

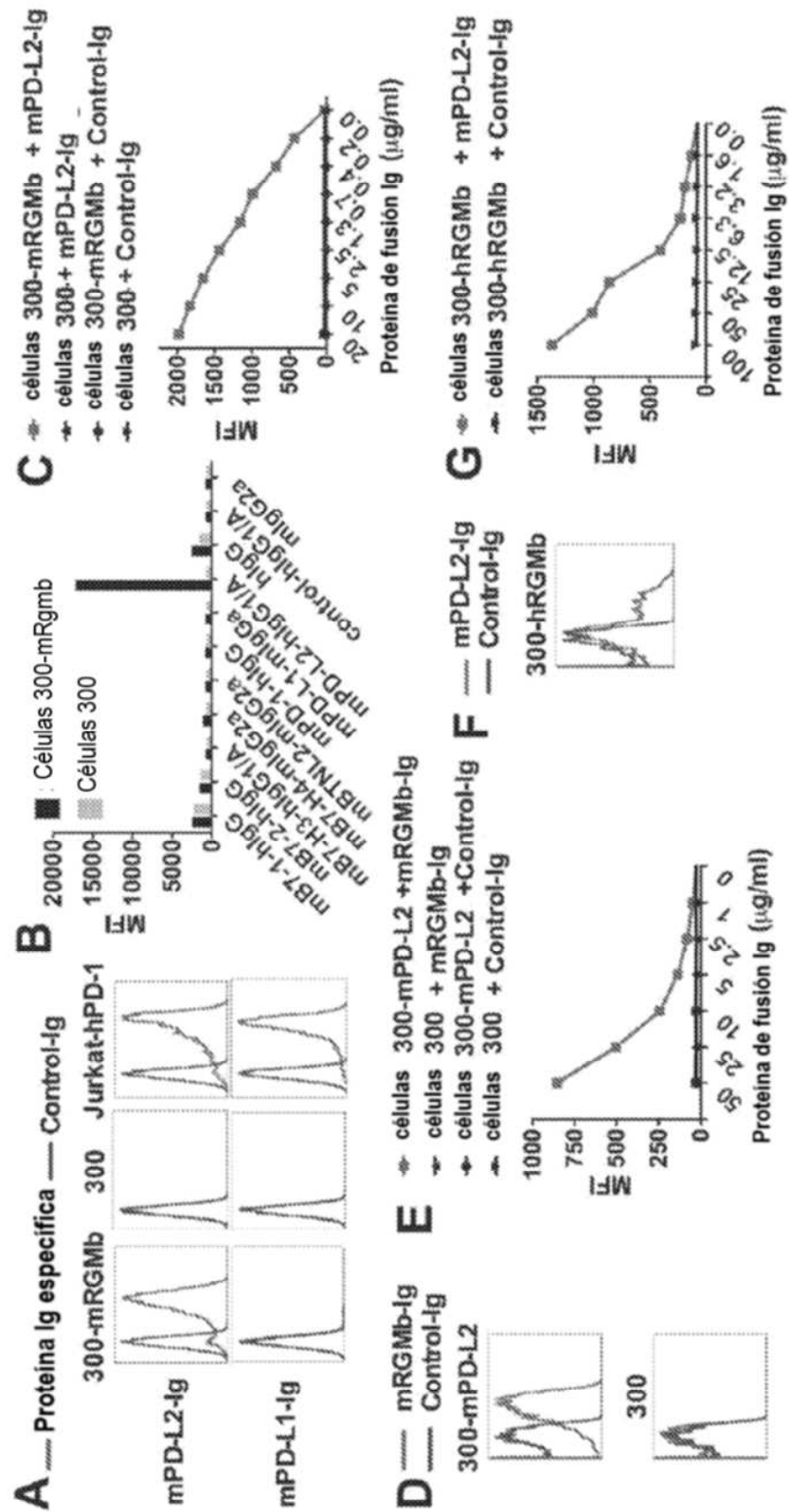


Figura 1 (cont.)

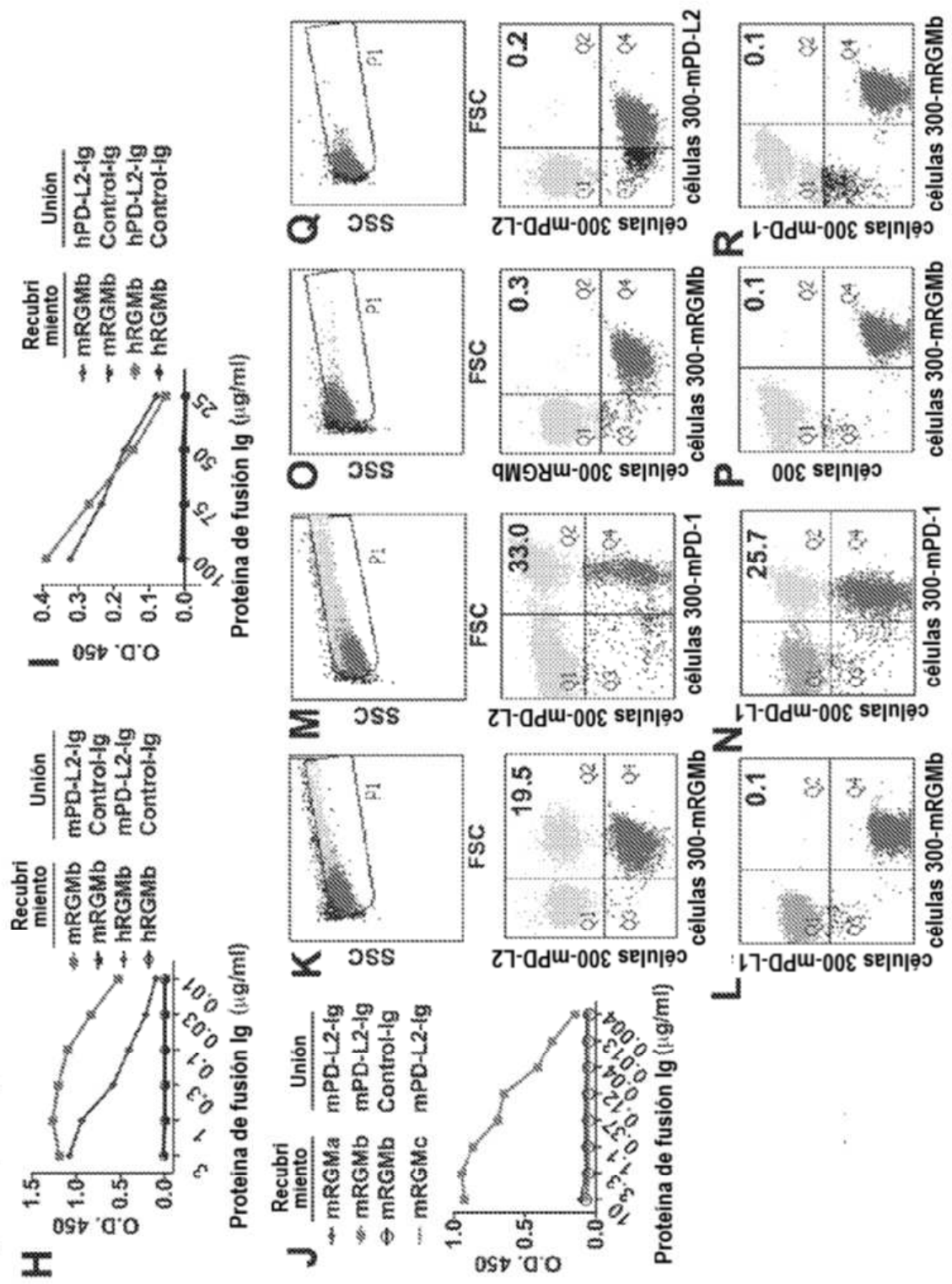


Figura 2

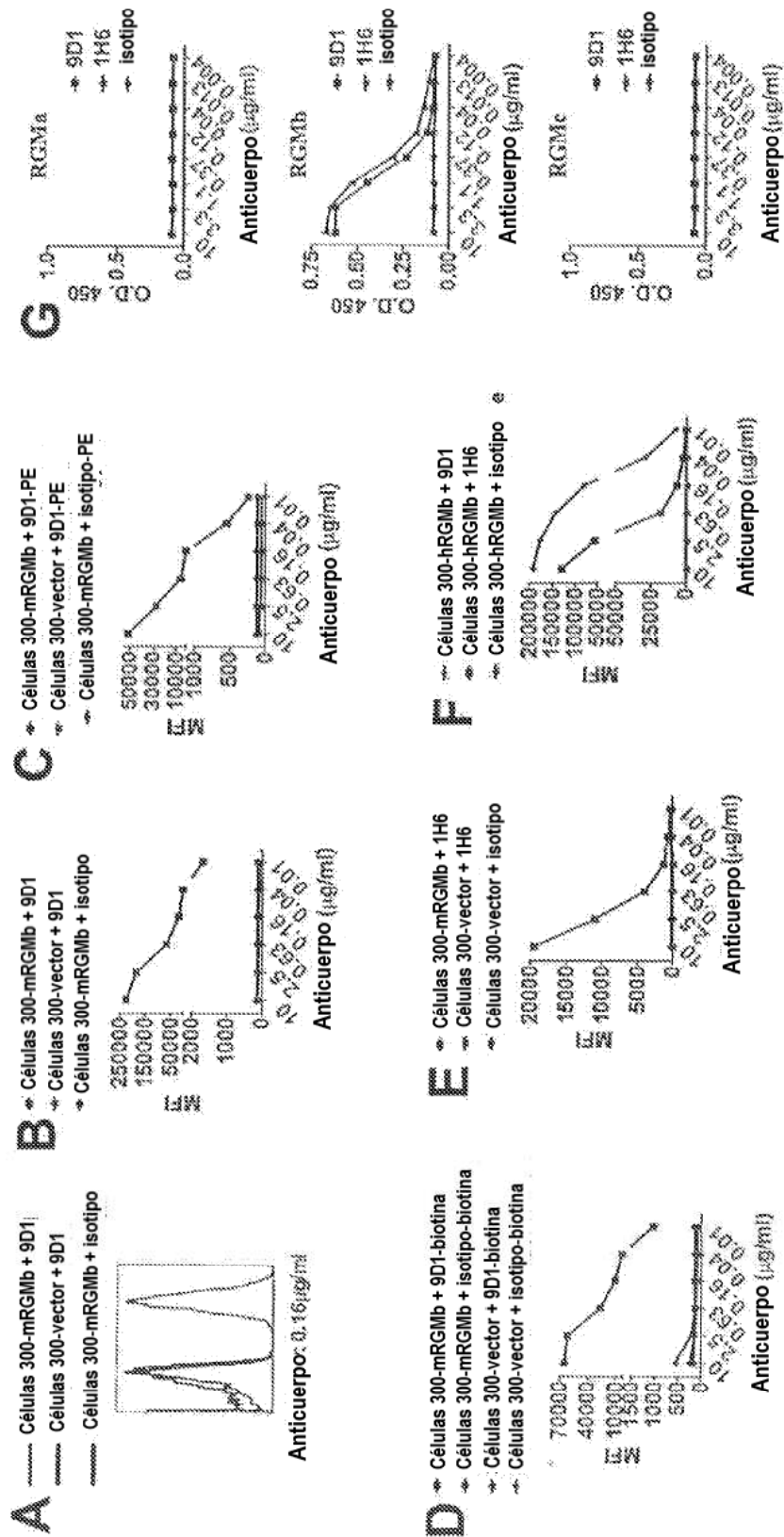


Figura 3

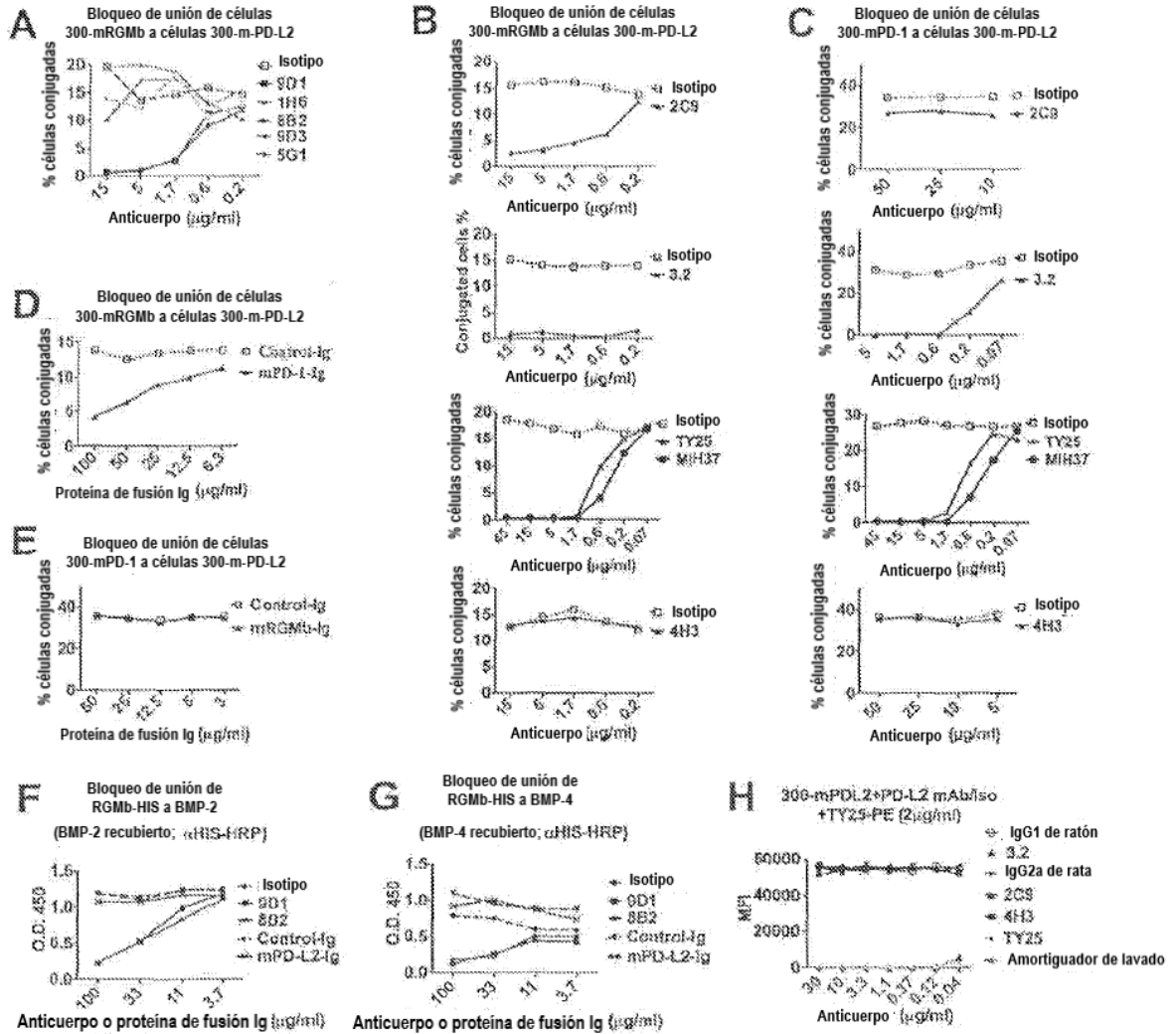


Figura 4

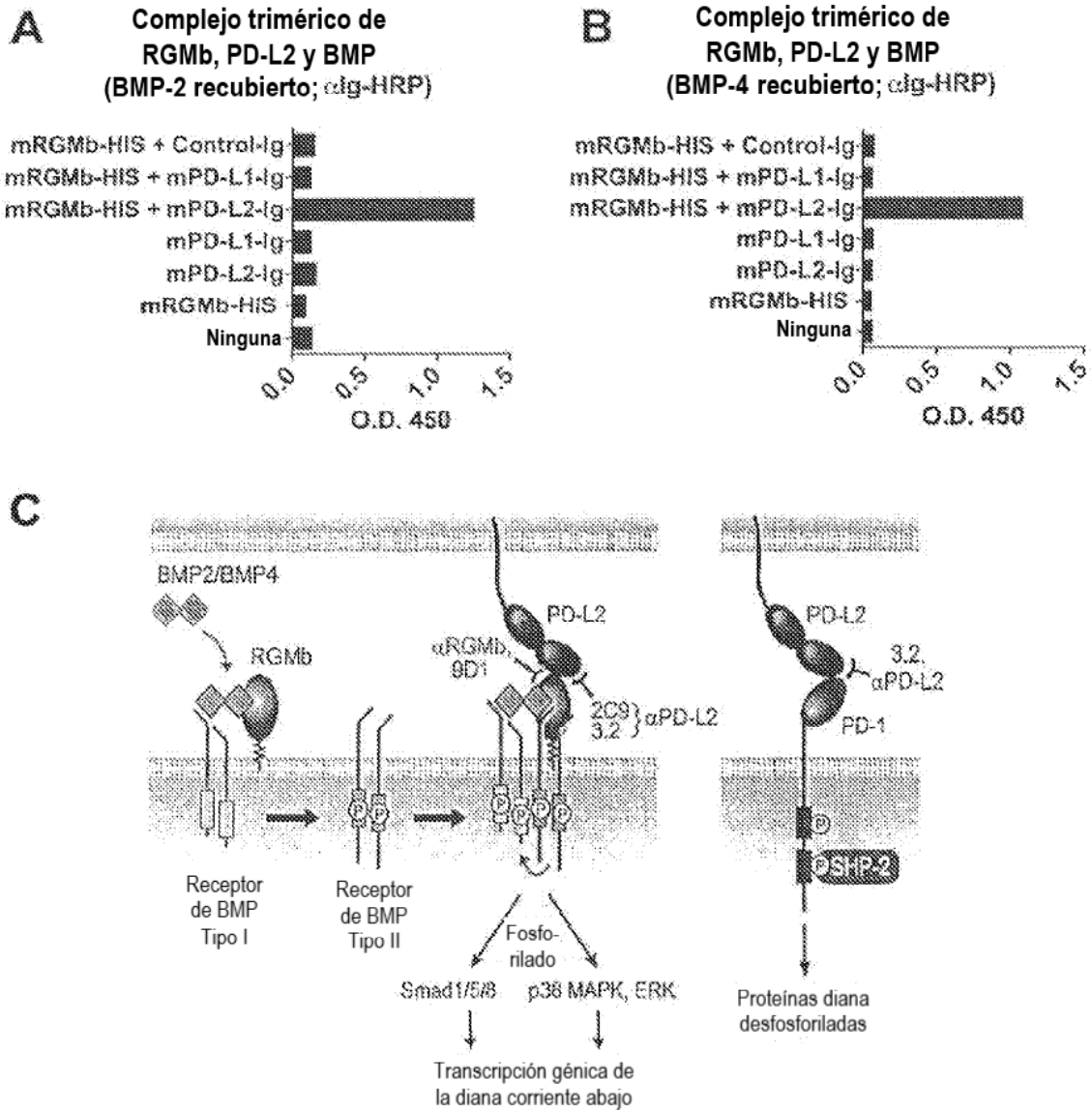


Figura 5

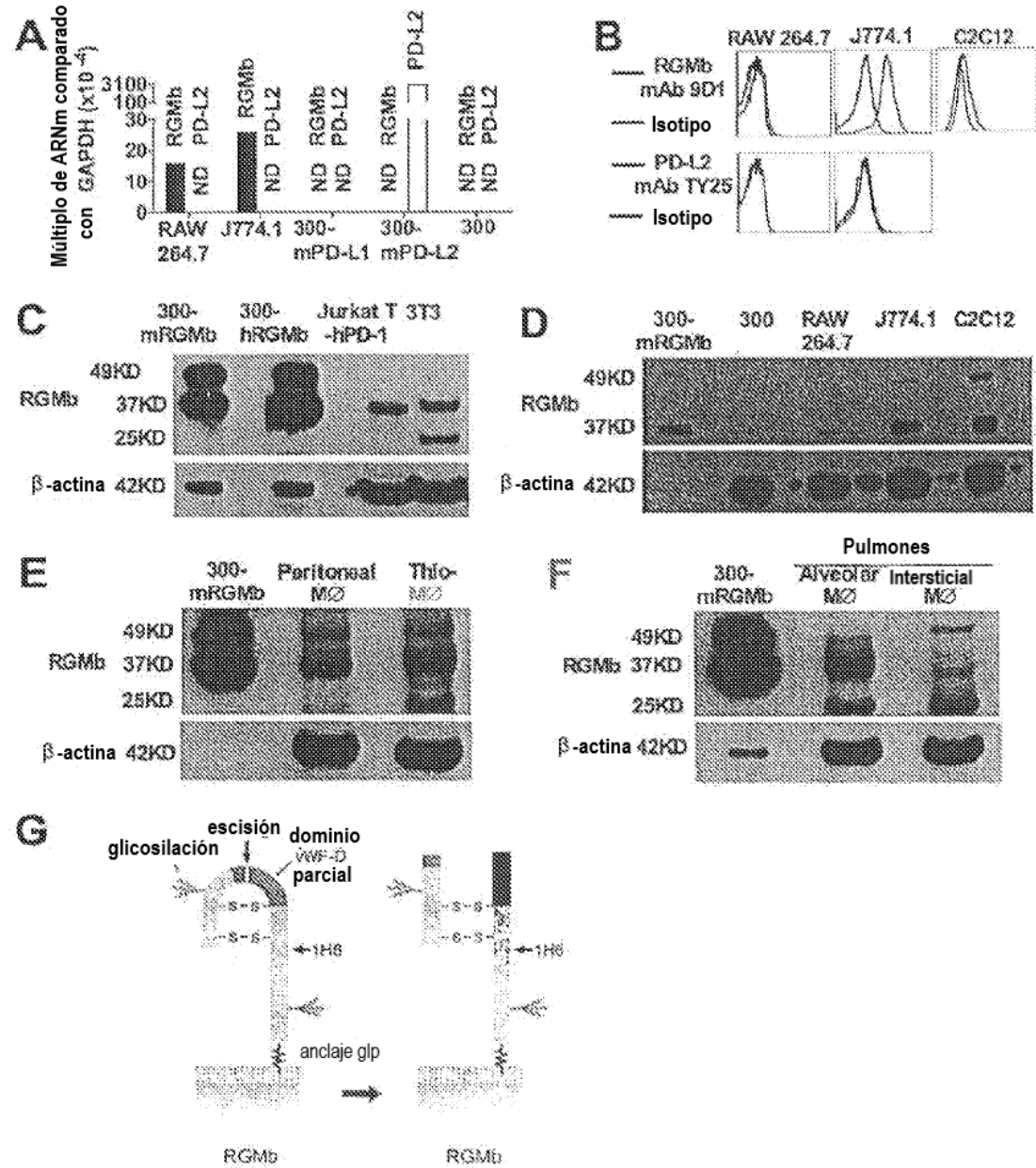


Figura 6

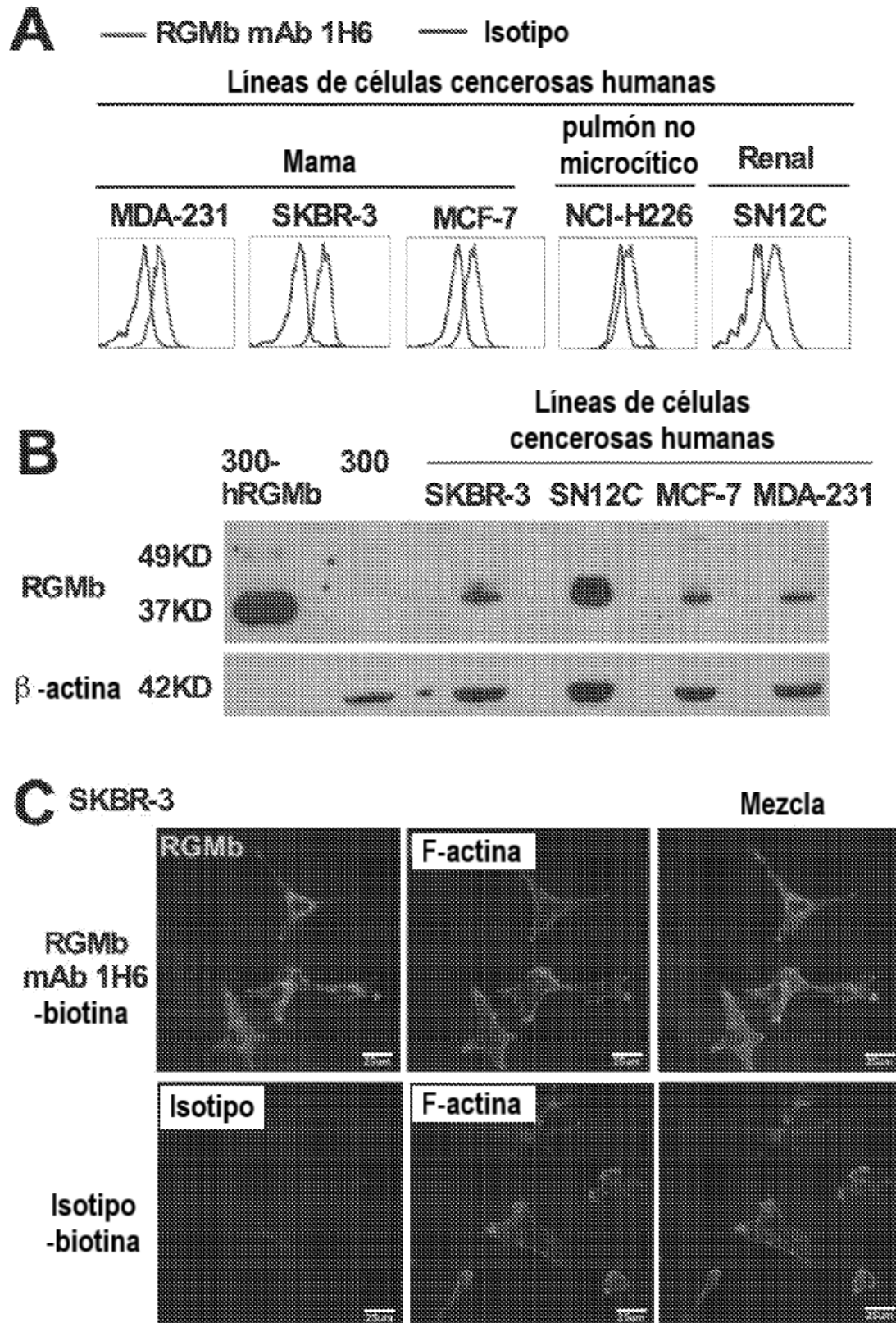


Figura 7

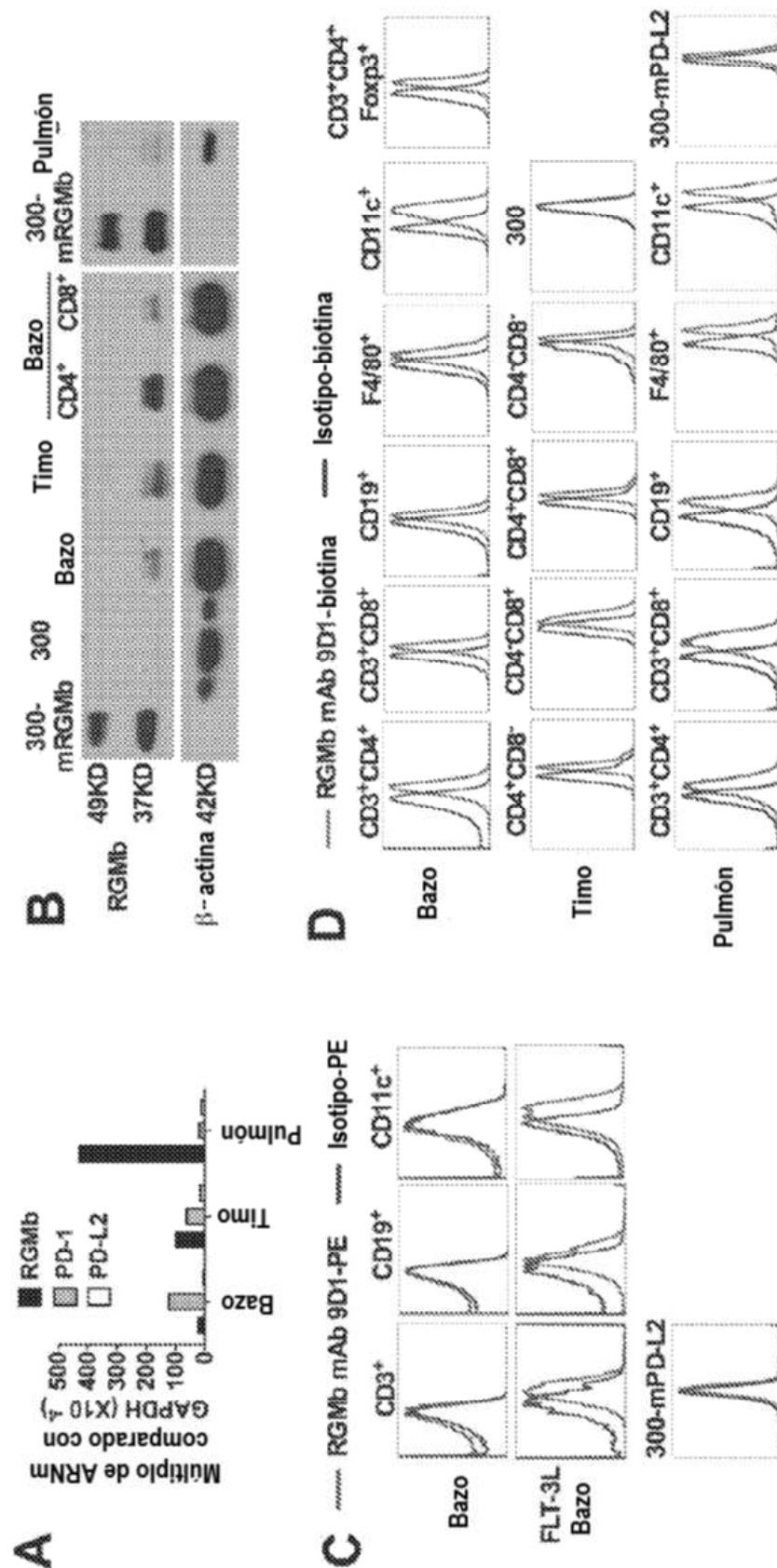


Figura 8

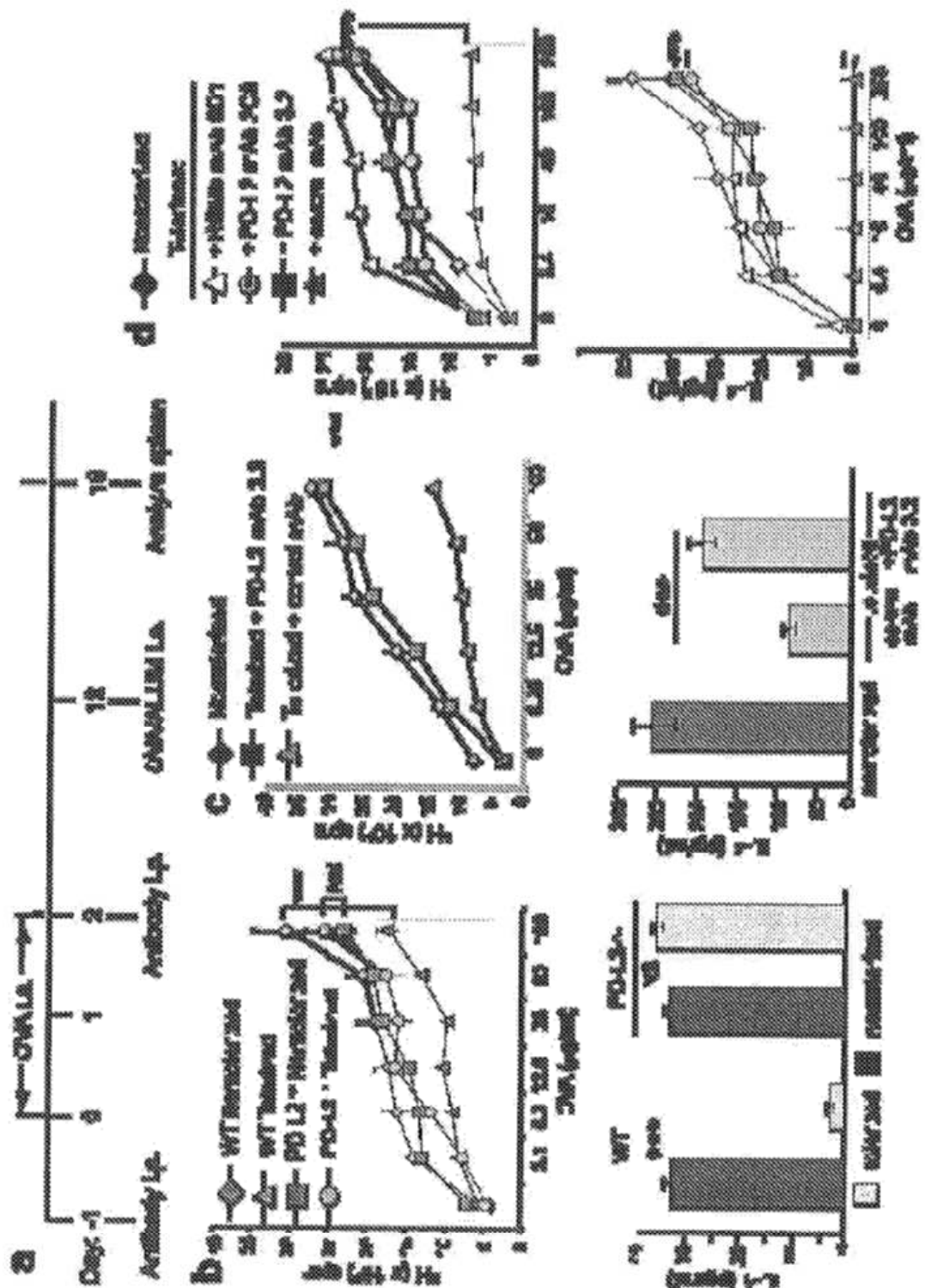


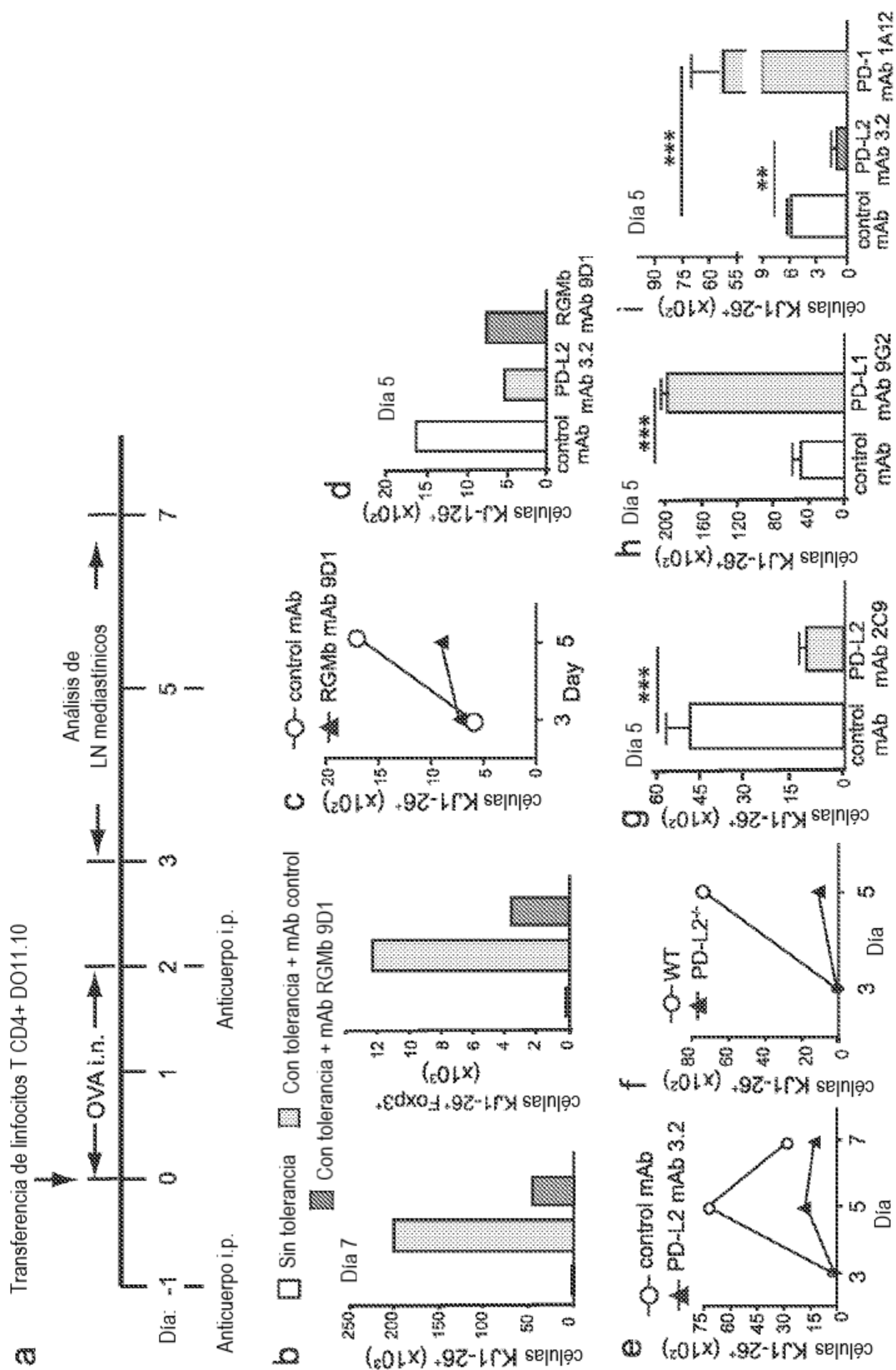
Figura 9

Figura 10

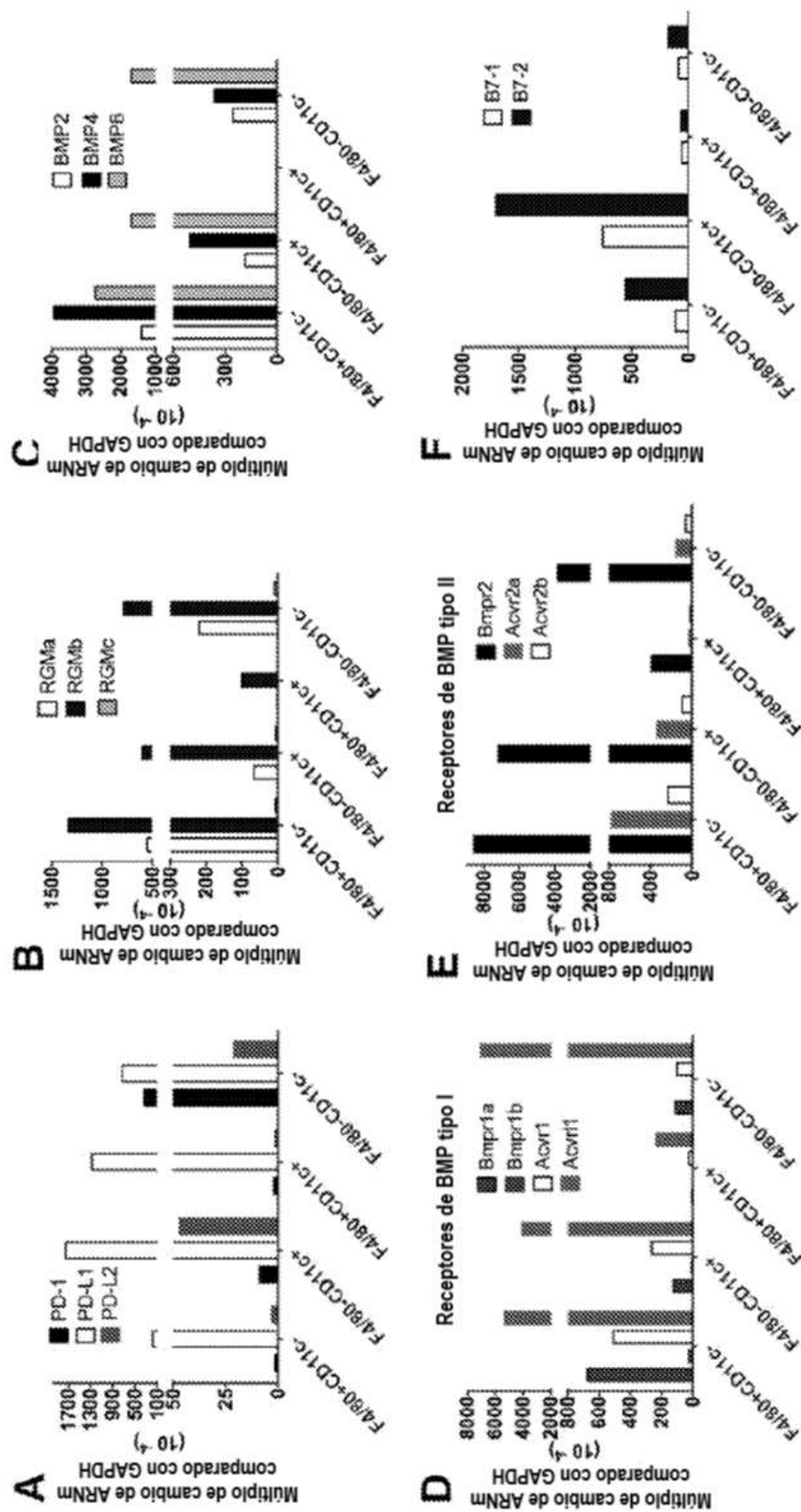


Figura 10 (cont.)

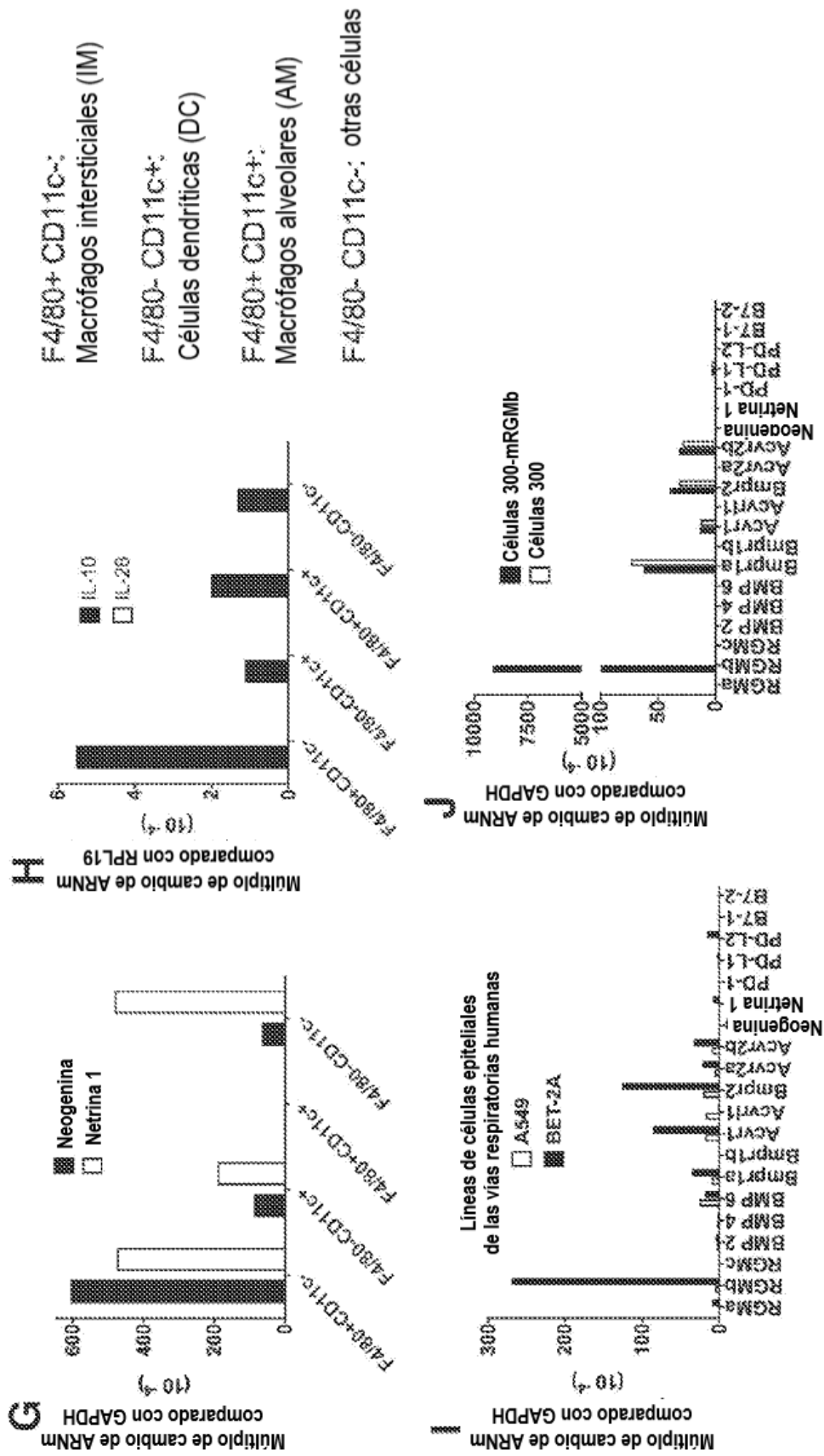


Figura 11

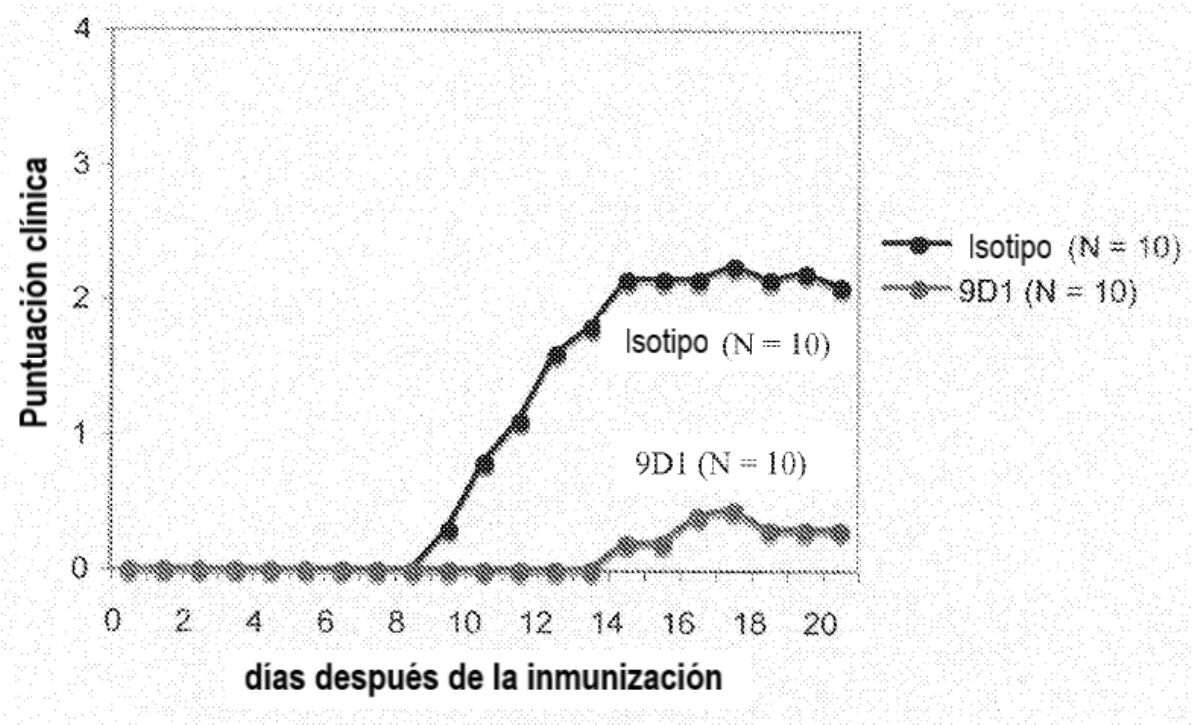


Figura 12

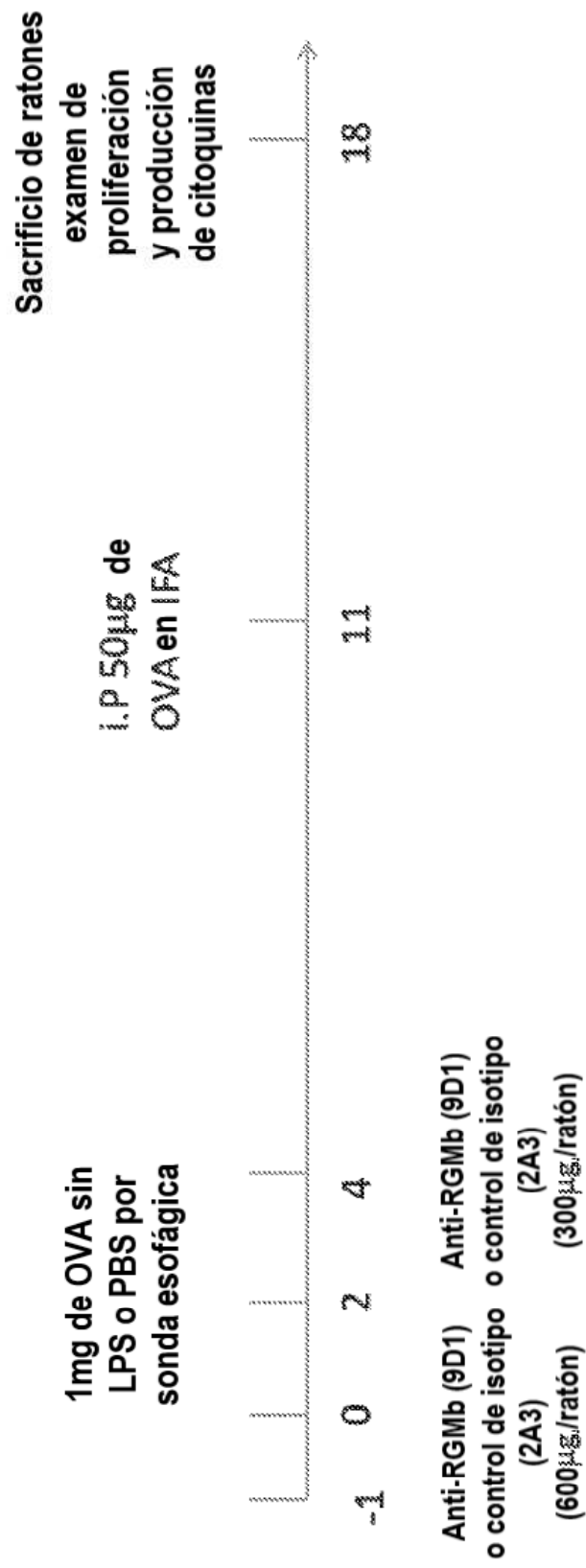
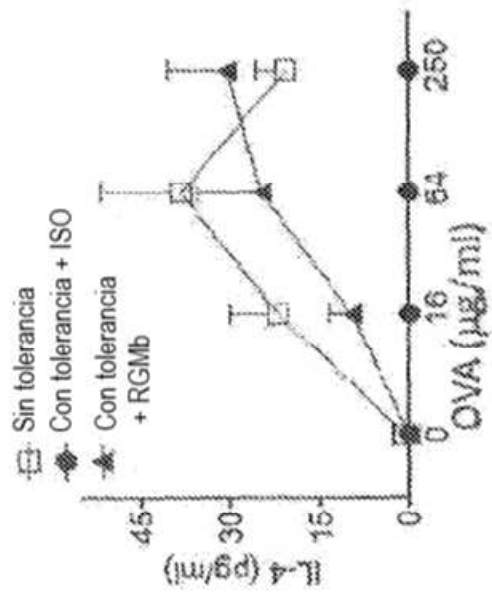
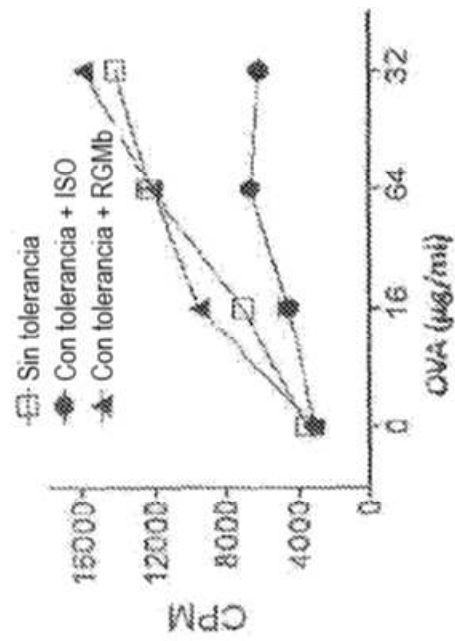


Figura 13

Esplenocitos (quitados de linfocitos B)



LN mesentéricos

