

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 536**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013** **E 19187268 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** **EP 3613765**

54 Título: **Anticuerpo contra la molécula guía repulsiva B (RGMB)**

30 Prioridad:

03.08.2012 US 201261742137 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2025

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.00%)

450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215-5450, US y
BOSTON CHILDREN'S HOSPITAL (50.00%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 012 536 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

Anticuerpo contra la molécula guía repulsiva B (RGMB)

Referencia cruzada a Solicitudes Relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense No. 61/742.137, presentada el 3 de agosto de 2012.

Declaración de Derechos

[0002] Esta invención se ha realizado con el apoyo de las subvenciones AI056299 y 5HSSN266200500030C adjudicadas por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno estadounidense tiene ciertos derechos sobre la invención. Esta declaración se incluye únicamente para cumplir con 37 C.F.R. § 401. 14(a)(f)(4) y no debe tomarse como una afirmación o admisión de que la solicitud divulga y/o reivindica una sola invención.

Antecedentes de la Invención

[0003] Para que las células inmunitarias, como las células T, respondan a las 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 al. (1990) J. Immunol. 144:3701-3709). La primera señal, que confiere especificidad a la respuesta inmunitaria, se transduce a través del receptor de células T (TCR) tras el reconocimiento del péptido antigénico extraño presentado en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La segunda señal, denominada coestimulación, induce a las células T a proliferar y volverse funcionales (Lenschow et al. (1996) Annu. Rev. Immunol. 14:233). La coestimulación no es específica del antígeno ni está restringida por el CMH, y se cree que la proporcionan uno o más polipéptidos distintos de la superficie celular expresados por las APC (Jenkins, M. K. et al. (1988) J. Immunol. 140:3324-3330; Linsley, P. S. et al. (1991) J. Exp. Med. 173:721-730; Gimmi, C. D., et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579; Young, J. W. et al. (1992) J. Clin. Invest. 90:229-237; Koulova, L. et al. (1991) J. Exp. Med. 173:759-762; Reiser, H. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:271-275; vanSeventer, G. A. et al. (1990) J. Immunol. 144:4579-4586; LaSalle, J. M. et al. (1991) J. Immunol. 147:774-80; Dustin, M. I. et al. (1989) J. Exp. Med. 169:503; Armitage, R. J. et al. (1992) Nature 357:80-82; Liu, Y. et al. (1992) J. Exp. Med. 175:437-445).

[0004] Dichas células inmunitarias tienen receptores que transmiten señales inmunomoduladoras (por ejemplo, costimuladoras y coinhibitorias). Por ejemplo, las células T tienen receptores de células T y el complejo CD3, las células B tienen receptores de células B y las células mieloides tienen receptores Fc. Además, las células inmunes portan 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 costimuladora a las células T. Tras la ligadura del receptor de células T, la ligadura de CD28 da lugar a una señal coestimuladora caracterizada, por ejemplo, por la regulación al alza de los receptores 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 costimuladora permite a la célula progresar a través del ciclo celular y, por tanto, aumenta la proliferación de células T (Greenfield et al. (1998) Crit. Rev. Immunol. 18:389). La unión de un receptor en una célula T que transmite una señal costimuladora a la célula (por ej., la ligadura de un receptor costimulador que conduce a la secreción de citoquinas y/o a la proliferación de la célula T) por una molécula de la familia B7, como B7-1 o B7-2, da lugar a la costimulación. Así, la inhibición de una interacción entre una molécula de la familia B7, como B7-1 o B7-2, y un receptor que transmite una señal costimuladora en una célula inmunitaria provoca una modulación a la baja de la respuesta inmunitaria, una falta de respuesta específica, denominada anergia celular inmunitaria, delección clonal y/o agotamiento. La inhibición de esta interacción puede lograrse utilizando, por ej., fragmentos Fab anti-CD28, anticuerpos contra B7-1 o B7-2, o utilizando una forma soluble de un receptor al que pueda unirse una molécula miembro de la familia B7 como inhibidor competitivo (por ejemplo, CTLA41g).

[0005] También se han identificado receptores inhibidores que se unen a moléculas coestimuladoras en células inmunitarias. La activación del CTLA4, por ejemplo, transmite una señal negativa a una célula T. La intervención 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 una enfermedad linfoproliferativa (Tivol, et al. (1995) Immunity 3:541; Waterhouse et al. (1995) Science 270:985). El bloqueo de CTLA4 con anticuerpos puede bloquear una señal inhibidora, mientras que la agregación de CTLA4 con anticuerpos transmite una señal inhibidora. Por lo tanto, dependiendo del receptor al que se una una molécula coestimuladora (es decir, un receptor coestimulador como CD28 o un receptor inhibidor como CTLA4), determinadas moléculas B7, incluida B7-4, pueden promover la coestimulación o la inhibición de células T.

[0006] PD-1 es un miembro de la familia de moléculas de inmunoglobulina (Ishida et al. (1992) EMBO J. 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704). PD-1 se identificó previamente utilizando un enfoque basado en la clonación por sustracción diseñado para identificar moduladores de la muerte celular programada (Ishida et al. (1992)

EMBO J. 11:3887-95; 5 Woronicz et al. (1995) Curr. Top. Microbial. Immunol. 200:137). Se cree que PD-1 desempeña un papel en la supervivencia de los linfocitos, por ejemplo, durante la selección clonal (Honjo (1992) Science 258:591; Agata et al. (1996) Int. Immunology. 8:765; Nishimura et al. (1996) Int. Immunology 8:773). PD-1 también se implicó como regulador de las respuestas de las células B (Nishimura (1998) Int. Immunology 10:1563). A diferencia de CTLA4, que sólo se encuentra en las células T, PD-1 también se encuentra en las células B y en las células mieloides. El descubrimiento previo de que PD-1 se une a ligandos de PD-1, como PD-L1 y PD-L2, situó a PD-1 en una familia de receptores inhibidores con CTLA4. Mientras que la activación de un receptor coestimulador da lugar a una señal coestimuladora en una célula inmunitaria, la activación de un receptor inhibidor, por ejemplo, CTLA4 o PD-1 (por ejemplo, por reticulación o agregación), da lugar a la transmisión de una señal inhibidora en una célula inmunitaria, lo que produce una modulación a la baja de las respuestas de las células inmunitarias y/o anergia de las células inmunitarias. Mientras que la transmisión de una señal inhibidora conduce a una modulación a la baja en las respuestas de las células inmunitarias (y a una modulación a la baja resultante en la respuesta inmunitaria global), la prevención de una señal inhibidora en las células, como las células inmunitarias, conduce a una modulación al alza de las respuestas de las células inmunitarias (y a una modulación al alza resultante de una respuesta inmunitaria).

[0007] La patente estadounidense No. 2009/297527 A1, la publicación internacional No. WO 2009/030500 A1, la patente estadounidense No. 2004/014141 A1 y la patente estadounidense No. 2010/183608 A1 divulgan anticuerpos anti-RGMB.

[0008] Actualmente se desconoce si existen receptores y ligandos coinhibitorios, especialmente porque las moléculas bien conocidas implicadas en la mediación de señales coinhibitorias y la consiguiente regulación a la baja de las respuestas inmunitarias (p. ej., CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, etc.) no explican todo el espectro de respuestas inmunoinhibitorias observadas. Por consiguiente, es necesario identificar otros receptores y/o ligandos coinhibitorios que desempeñen funciones fisiológicamente importantes en la regulación de las respuestas inmunitarias. Resumen de la Invención

[0009] 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 PD-L2 se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos y pueden transmitir señales moduladoras a la baja a las células inmunitarias. Por ejemplo, se sabe que la unión del ligando PD-L2 a PD-1 transmite una señal negativa. En el presente documento se demuestra que el RGMB transmite de forma similar una señal negativa a las células (por ejemplo, células inmunitarias o cancerosas) al interactuar con PD-L2. Así, la modulación de la interacción entre RGMB y PD-L2 resulta en la modulación de la respuesta inmunitaria.

[0010] La invención se define según las reivindicaciones 1 - 15 y se describe en los siguientes aspectos de la invención: En un aspecto, la invención se dirige a un anticuerpo monoclonal anti-RGMB aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe la interacción entre RGMB y PD-L2, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMB o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: a) un polipéptido que comprende tres CDR: CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en los que CDR-L1 está formado por los residuos de aminoácidos 44-54 de NO ID SEC: 12, CDR-L2 consiste en los residuos de aminoácidos 70-76 de NO ID SEC: 12, y CDR-L3 consiste en los residuos de aminoácidos 109-116 de NO ID SEC: 12; y b) un polipéptido que comprende tres CDR: CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en los que CDR-H1 está formado por los residuos de aminoácidos 50-54 de NO ID SEC: 14, CDR-H2 consiste en los residuos de aminoácidos 69-85 de NO ID SEC: 14, y CDR-H3 consiste en los residuos de aminoácidos 118-125 de NO ID SEC: 14.

[0011] En otro aspecto, la invención se dirige al anticuerpo monoclonal anti-RGMB descrito anteriormente, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMB comprende una secuencia variable de cadena pesada que tiene la secuencia de NO ID SEC: 14 y/o una secuencia variable de cadena ligera que tenga la secuencia de NO ID SEC: 12.

[0012] En otro aspecto, la invención se dirige al anticuerpo monoclonal anti-RGMB descrito anteriormente, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMB o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia variable de cadena pesada que tiene la secuencia de NO ID SEC: 14 y una secuencia variable de cadena ligera que tiene la secuencia de NO ID SEC: 12.

[0013] En otro aspecto, la invención se dirige al anticuerpo monoclonal anti-RGMB como se ha descrito anteriormente, en el que la presencia del anticuerpo monoclonal anti-RGMB o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce o inhibe al menos una actividad en relación con la ausencia del anticuerpo monoclonal anti-RGMB o fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modulación de la fosforilación de ERK1 o ERK2, modulación de la fosforilación de PKC- θ , modulación de la fosforilación de SHP-2, modulación de la producción de citoquinas y modulación de la proliferación celular.

[0014] En otro aspecto, la invención se dirige al anticuerpo monoclonal anti-RGMB descrito anteriormente, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMB o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado de forma detectable.

[0015] En otro aspecto, la invención se dirige al anticuerpo monoclonal anti-RGMb descrito anteriormente, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio efector.

[0016] En otro aspecto, la invención se dirige al anticuerpo monoclonal anti-RGMb descrito anteriormente, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio Fc.

5 [0017] En otro aspecto, la invención se dirige al anticuerpo monoclonal anti-RGMb como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en Fv, Fav, (ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, y fragmentos de diacuerpos.

[0018] En otro aspecto, la invención se dirige a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo monoclonal antiRGMb o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se ha descrito anteriormente.

10 [0019] En otro aspecto, la invención se dirige a un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito anteriormente.

[0020] En otro aspecto, la invención se dirige a una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado descrito anteriormente.

[0021] En otro aspecto, la invención se dirige a una célula huésped que comprende el vector descrito anteriormente.

15 [0022] En otro aspecto, la invención se dirige a una célula huésped que expresa el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo como se ha descrito anteriormente.

[0023] En otro aspecto, la invención se dirige a un dispositivo o kit que comprende al menos un anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se ha descrito anteriormente.

20 [0024] En otro aspecto, la invención se dirige al dispositivo o kit descrito anteriormente que comprende una etiqueta para detectar al menos un anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un complejo que comprende el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0025] A continuación se describen otros aspectos de la divulgación que no forman parte de la invención.

[0026] 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, como una célula T, una célula B o una célula mielóide. En otra realización adicional, la respuesta inmunitaria se estimula (p. ej., utilizando un agente seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo bloqueante que se une a RGMb, una forma no activante de RGMb, una forma soluble de RGMb, una proteína de fusión de RGMb, una molécula de ácido nucleico que bloquea la transcripción o traducción de RGMb, un antagonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo bloqueante que reconoce PD-L2, una forma no activante de PD-L2, una forma soluble de PD-L2, una proteína de fusión de PD-L2, una molécula de ácido nucleico que bloquea la transcripción o traducción de RGMb y/o PD-L2, un antagonista de PD-L2 de molécula pequeña, una forma no activadora de un ligando natural de RGMb, una forma soluble de un ligando natural de RGMb y una proteína de fusión de un ligando natural de RGMb). En otra realización más, el anticuerpo bloqueante 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 tanto la interacción entre PD-L2 y RGMb como 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 otra realización adicional, el método comprende además el contacto de la célula o célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que aumentan la respuesta inmunitaria. En otra forma de realización, la respuesta inmunitaria se regula a la baja (por ejemplo, mediante el uso de un agente seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo activador que se une a RGMb, un agonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo activador que se une a PD-L2, un agonista de PD-L2 de molécula pequeña y un anticuerpo bloqueante que se une a PD-1 e inhibe la interacción entre PD-L2 y PD-1). En otra realización, el anticuerpo activador 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 tanto la interacción entre PD-L2 y RGMb como la interacción entre PD-L2 y PD-1. En otra realización adicional, el anticuerpo bloqueante 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 tanto la interacción entre PD-L2 y PD-1 como la interacción entre PD-L1 y PD-1. En otra forma de realización, se induce anergia, agotamiento y/o deleción clonal en la célula inmunitaria. En otra realización, el método comprende además el contacto de la célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que regulan a la baja una respuesta inmunitaria. En otra realización adicional, la etapa de contacto se produce in vivo, ex vivo o in vitro.

25

30

35

40

45

50

[0027] En otro aspecto, se proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una afección que se beneficiaría de la regulación al alza de una respuesta inmunitaria que comprende administrar al sujeto un agente que inhibe la interacción entre RGMb y PDL2 de tal manera que se trata la afección que se beneficiaría de la regulación al alza de una respuesta inmunitaria. En una realización, el agente se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo bloqueante que se une a RGMb, una forma no activante de RGMb, una forma soluble de RGMb, una proteína de fusión de RGMb, una molécula de ácido nucleico que bloquea la transcripción o traducción de RGMb, un antagonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo bloqueante que reconoce PD-L2, una forma no activante de PD-L2, una forma soluble de PD-L2, una proteína de fusión de PD-L2, una molécula de ácido nucleico que bloquea la transcripción o traducción 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 agonista de PD-1 de molécula pequeña. En otra realización, el anticuerpo bloqueante que se une a PDL2 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 tanto la interacción entre PD-L2 y RGMb como la interacción entre PD-L2 y PD-1. En otra realización adicional, se reduce la anergia, el agotamiento y/o la eliminación clonal en la célula inmunitaria. En otra forma de realización, el método comprende además el contacto de la célula o célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que aumentan la respuesta inmunitaria. En otra realización, la condición que se beneficiaría de la regulación de una respuesta inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en cáncer, una infección vírica, una infección bacteriana, una infección por protozoos, una infección por helmintos, asma asociada a una alteración de la tolerancia de las vías respiratorias, una enfermedad neurológica, esclerosis múltiple y una enfermedad inmunosupresora.

[0028] En otro aspecto adicional, se proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una afección que se beneficiaría de la regulación a la baja de una respuesta inmunitaria que comprende la administración al sujeto de un agente que estimula la señalización mediada por PD-L2 a través de un RGMb en una célula inmunitaria del sujeto de manera que se trata una afección que se beneficiaría de la regulación a la baja de la respuesta inmunitaria. En una realización, el agente se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo activador que se une a RGMb, un agonista de RGMb de molécula pequeña, un anticuerpo activador que se une a PD-L2, un agonista de PD-L2 de molécula pequeña, un anticuerpo bloqueador que se une a PD-1 e inhibe la interacción entre PD-L2 y PD-1, una molécula de ácido nucleico que bloquea la transcripción o traducción de PD-1 y un antagonista de PD-1 de molécula pequeña. En otra realización, el anticuerpo activador 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 tanto la interacción entre PD-L2 y RGMb como la interacción entre PD-L2 y PD-1. En otra realización adicional, el anticuerpo bloqueante 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 PD1; y anticuerpos anti-PD-1 que bloquean tanto la interacción entre PD-L2 y PD-1 como la interacción entre PDL1 y PD-1. En otra forma de realización, se induce anergia, agotamiento y/o deleción clonal en la célula inmunitaria. En otra realización, el método comprende además el contacto de la célula inmunitaria con uno o más agentes adicionales que regulan a la baja una respuesta inmunitaria. En otra realización, la condición que se beneficiaría de la regulación a la baja de la respuesta inmunitaria se selecciona del grupo que consiste en una alergia (por ejemplo, alergias alimentarias), un trasplante, una enfermedad de injerto contra huésped, una respuesta de hipersensibilidad, un trastorno autoinmunitario, un trastorno que requiere una mayor producción o función de células T CD4+, un trastorno que requiere una mayor eficacia de la vacunación, un trastorno que requiere una mayor producción o función de células T reguladoras y un trastorno que requiere una mayor eficacia de la vacunación.

[0029] En otra forma de aspecto, un método para el cribado de compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb 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) una proteína PD-L2 o RGMb, o una porción biológicamente activa de la misma, con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la unión entre PD-L2 y RGMb. En una realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo formado por una célula T, una célula B y una célula mieloide.

[0030] En otro aspecto, un método de cribado de compuestos que modulan la actividad de señalización resultante 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) una proteína PD-L2 o RGMb, o una porción biológicamente activa de la misma, con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modulación de la fosforilación de ERK1 o ERK2, modulación de la fosforilación de PKC- θ , modulación de la fosforilación de SHP-2, modulación de la producción de citoquinas y modulación de la proliferación celular. En una realización, el compuesto de ensayo tiene un efecto seleccionado del grupo que consiste en (a) regula al alza la señalización de PD-L2/RGMb y, de ese modo, regula a la baja la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (b) regula a la baja la señalización de PD-L2/RGMb y, de ese modo, regula al alza la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (c) regula al alza la señalización de PD-L2/RGMb y, en consecuencia, regula a la baja la fosforilación de PKC- θ ; d) regula a la baja la señalización de PD-L2/RGMb y, en consecuencia,

regula al alza la fosforilación de PKC- θ ; (e) regula al alza la señalización de PD-L2/RGMb y, por tanto, regula al alza la fosforilación de SHSP-2; y (f) regula a la baja la señalización de PD-L2/RGMb y, por tanto, regula a la baja la fosforilación de SHP-2. En otra realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo formado por una célula T, una célula B y una célula mieloide.

5 [0031] En otro aspecto adicional, se proporciona un ensayo basado en células para el cribado de 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 PDL-2 con una célula que expresa RGMb, con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la unión entre PD-L2 y RGMb. En una realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo formado por una célula T, una célula B y una célula mieloide.

10 [0032] En otro aspecto más, se proporciona un ensayo libre de células para el cribado de compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto una proteína PD-L2 o RGMb, o porción biológicamente activa de la misma, con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la unión entre la proteína PD-L2 o RGMb, o porción biológicamente activa de la misma.

15 [0033] En otro aspecto, un ensayo basado en células para el cribado de compuestos que modulan la actividad de señalización resultante 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, con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo 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 citoquinas y modular la proliferación celular. En una realización, la célula es una célula inmunitaria seleccionada del grupo formado por una célula T, una célula B y una célula mieloide.

20 [0034] En otro aspecto adicional, un ensayo libre de células para el cribado de compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto una proteína PD-L2 o RGMb, o porción biológicamente activa de la misma, con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular una o más actividades de señalización seleccionadas del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modulación de la fosforilación de ERK1 o ERK2, modulación de la fosforilación de PKC θ , modulación de la fosforilación de SHP-2, modulación de la producción de citoquinas y modulación de la proliferación celular.

25 [0035] En otra forma de aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-RGMb aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, 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 que se le ha asignado un número de acceso. En otra realización, el anticuerpo monoclonal comprende: a) una secuencia de cadena pesada con al menos aproximadamente un 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 un 95% de identidad con 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 CDR de cadena pesada con al menos aproximadamente el 95% de identidad con una secuencia CDR de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3 o b) una secuencia CDR de cadena ligera con al menos aproximadamente el 95% de identidad con una secuencia CDR 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 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 CDR de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3; o b) una secuencia CDR de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3. En otra realización adicional, el anticuerpo anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo es monoclonal, quimérico, humanizado, compuesto, de roedor o humano. En otra realización más, el anticuerpo anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce o inhibe al menos una actividad en relación con la ausencia del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modulación de la fosforilación de ERK1 o ERK2, modulación de la fosforilación de PKC- θ , modulación de la fosforilación de SHP-2, modulación de la producción de citoquinas y modulación de la proliferación celular. En otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado detectablemente, 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.

55 [0036] En otro aspecto, se proporciona una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina de los anticuerpos descritos en el presente documento.

[0037] En otro aspecto adicional, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida, en condiciones estrictas, 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 aproximadamente un 95% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias enumeradas en la Tabla 3.

[0038] En otra forma de aspecto, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado descrito en el presente documento.

[0039] En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado descrito en el presente documento, vector descrito en el presente documento, expresa un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, o es accesible según un depósito descrito en el presente documento.

[0040] En otro aspecto adicional, se proporciona un dispositivo o kit que comprende al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, dicho dispositivo o kit comprende opcionalmente una etiqueta para detectar el al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un complejo que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0041] En otra forma de aspecto, un método de producción de un anticuerpo descrito en el presente documento, cuyo método comprende los pasos de: (i) cultivar una célula huésped transformada que ha sido transformada por un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el anticuerpo descrito en el presente documento en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo; y (ii) recuperar el anticuerpo expresado, se proporciona.

[0042] En otro aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia o el nivel de un polipéptido RGMb, dicho método comprende la obtención de una muestra y la detección de dicho polipéptido en una muestra mediante el uso de al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. En una realización, el al menos un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un polipéptido RGMb y el complejo se detecta en forma de ensayo inmunoenzimático (ELISA), ensayo radioinmune (RIA), inmunquímicamente o utilizando un ensayo de flujo intracelular.

Breve descripción de los dibujos

[0043] 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, proteínas de fusión RGMb-Ig y 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 simultáneamente a RGMb y se propuso un modelo para la interacción 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 superficie celular y la expresión intracelular de RGMb por líneas celulares de cáncer humano. Las Figuras 7A-7D muestran la expresión intracelular de RGMb por células hematopoyéticas primarias de ratón. Las Figuras 8A-8D muestran que el bloqueo de la interacción RGMb:PD-L2 inhibe la inducción de tolerancia respiratoria. Las Figuras 9A-9I muestran que el bloqueo de la interacción RGMb:PD-L2 impide la expansión de las células T al antígeno 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 300 células. De izquierda a derecha, cada casilla de datos de cada gráfico corresponde a la posición correspondiente de la leyenda de arriba a abajo (por ejemplo, las casillas de datos de izquierda a derecha en la Figura 10A corresponden a PD-1, PDL1 y PD-L2). La Figura 11 muestra un gráfico de la puntuación clínica de EAE a lo largo del tiempo para ratones tratados con el anticuerpo anti-RGMb 9D1 y ratones tratados con el control. La Figura 12 muestra el protocolo del modelo de tolerancia oral a dosis bajas utilizado para demostrar que el bloqueo de RGMb inhibe la inducción de tolerancia oral. La figura 13 muestra que el tratamiento de ratones con mAb anti-RGMb 9D1 impide el desarrollo de tolerancia oral, dando lugar a un aumento de la proliferación y de las respuestas de citoquinas en comparación con los ratones tolerados tratados con mAb de control.

Descripción detallada de la Invención I.

Definiciones

[0044] Los artículos "un" y "uno" se utiliza aquí para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

[0045] El término "receptor activador" incluye receptores de células inmunitarias que se unen a antígenos, antígenos complejados (por ejemplo, en el contexto de polipéptidos CMH) o se unen a anticuerpos. Dichos receptores activadores incluyen receptores de células T (TCR), receptores de células B (BCR), receptores de citoquinas, receptores LPS, receptores del complemento y receptores Fc.

[0046] Los receptores de células T están presentes en las células T y están asociados a los polipéptidos CD3. Los receptores de células T son estimulados por antígenos en el contexto de polipéptidos del CMH (así como por reactivos policlonales activadores de células T). La activación de las células T a través del TCR da lugar a numerosos cambios, por ejemplo, fosforilación de proteínas, cambios en los lípidos de la membrana, flujos de iones, alteraciones de los nucleótidos cíclicos, cambios en la transcripción del ARN, cambios en la síntesis de proteínas y cambios en el volumen celular.

[0047] Los receptores de células B están presentes en las células B. Los receptores de antígenos de células B son un complejo entre Ig de membrana (mIg) y otros polipéptidos transmembrana (por ej., Igα y Igβ). La función de transducción de señales de las mIg se desencadena por la reticulación de los polipéptidos receptores por antígenos oligoméricos o multiméricos. Los linfocitos B también pueden activarse mediante anticuerpos antiinmunoglobulina. Tras la activación del BCR, se producen numerosos cambios en las células B, incluida la fosforilación de la tirosina.

[0048] 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 porción Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina (Igs). Entre los FcR humanos que se han identificado hasta ahora se encuentran los que reconocen IgG (Fcγ R designada), IgE (Fcε R1), IgA (Fcα), y IgM/A (Fcμα R polimerizada). Los FcR se encuentran en los siguientes tipos de células: Fcε R I (mastocitos), Fcε R.II (muchos leucocitos), Fcα R (neutrófilos), y Fcμα R (epitelio glandular, hepatocitos) (Hogg, N. (1988) Immunol. Today 9:185-86). Los ampliamente estudiados FcγRs son centrales en las defensas inmunitarias celulares, y son responsables de estimular la liberación de mediadores de la inflamación y enzimas hidrolíticas implicadas en la patogénesis de enfermedades autoinmunes (Unkeless, J. C. et al. (1988) Annu. Rev. Immunol. 6:251-81). Los FcγR proporcionan un vínculo crucial entre las células efectoras y los linfocitos que secretan Ig, ya que los FcγR de macrófagos/monocitos, leucocitos polimorfonucleares y células natural killer (NK) confieren un elemento de reconocimiento específico mediado por IgG. Los leucocitos humanos tienen al menos tres receptores diferentes para IgG: h Fcγ RI (en monocitos/macrófagos), hFcγ RII (en monocitos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, posiblemente células B y la línea celular K562), y Fcγ III (en células NK, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos).

[0049] Con respecto a las células T, la transmisión de una señal costimuladora a una célula T implica una vía de señalización que no es inhibida por la ciclosporina A. Además, una señal costimuladora puede inducir la secreción de citoquinas (por ejemplo, IL-2 y/o IL10) en una célula T y/o puede prevenir la inducción de falta de respuesta al antígeno, la inducción de anergia, o la inducción de muerte celular (deleción) en la célula T.

[0050] El término "actividad", cuando se utiliza con respecto a un polipéptido, por ejemplo, PD-L2, PD-L1, PD-1 o polipéptido RGMb incluye actividades que son inherentes a la estructura de la proteína. Por ejemplo, con respecto a un ligando PD-1, el término "actividad" incluye la capacidad de modular la coestimulación de células inmunitarias (por ejemplo, modulando una señal coestimuladora en una célula inmunitaria activada) o de modular la inhibición modulando una señal inhibidora en una célula inmunitaria (por ejemplo, enganchando un receptor natural en una célula inmunitaria). Los expertos en la materia reconocerán que cuando una forma activadora del polipéptido ligando PD-1 se une a un receptor inhibidor, se genera una señal inhibidora en la célula inmunitaria.

[0051] El término "nivel alterado de expresión" de un marcador se refiere a un nivel de expresión o número 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 el número 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 número de copias del marcador o región cromosómica en una muestra de control (por ejemplo, muestra de un sujeto sano que no padezca la enfermedad asociada) y, preferiblemente, el nivel de expresión o número de copias medio del marcador o región cromosómica en varias muestras de control. El nivel alterado de expresión es mayor o menor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión o el número 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 el número de copias del marcador en una muestra de control (por ejemplo, muestra de un sujeto sano que no tiene la enfermedad asociada) y preferiblemente, el nivel medio de expresión o el número de copias del marcador en varias muestras de control.

[0052] El término "actividad alterada" de un marcador se refiere a una actividad de un marcador que está aumentada o disminuida en un estado de enfermedad, por ejemplo, en una muestra de cáncer, en comparación con la actividad del marcador en una muestra normal, de control. La actividad alterada de un marcador puede ser el resultado de, por ejemplo, una expresión alterada del marcador, un nivel proteico alterado del marcador, una estructura alterada del marcador o, por ejemplo, una interacción alterada con otras proteínas implicadas en la misma vía o en una vía diferente a la del marcador, o una interacción alterada con activadores o inhibidores transcripcionales.

[0053] La "cantidad" de un marcador, por ejemplo, la expresión o el número 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, diez o más veces esa cantidad. Alternativamente, la cantidad del marcador en el sujeto puede considerarse "significativamente" superior o inferior a la cantidad normal si la cantidad es al menos unas dos, y preferiblemente al menos unas tres, cuatro o cinco veces, superior o inferior, respectivamente, a la cantidad normal del marcador.

[0054] A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" abarcan ampliamente formas de anticuerpos naturales (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos recombinantes como anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos, así como fragmentos y derivados de todos los anteriores, cuyos fragmentos y derivados tienen al menos un sitio de unión antigénica. Los derivados de anticuerpos pueden comprender una proteína o una fracción química conjugada con un anticuerpo.

[0055] El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, también incluye una "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"). El término "porción de unión a antígeno", tal como se utiliza aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desempeñada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente formado por 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 al., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar polipéptidos monovalentes (conocidos como Fv de cadena única (scFv); véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Osbourn et al. 1998, *Nature Biotechnology* 16: 778). Dichos anticuerpos de cadena simple también se incluyen en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Cualquiera de las secuencias VH y VL de scFv específicos puede unirse al ADNc o a secuencias genómicas de la región constante de la inmunoglobulina humana, con el fin de generar vectores de expresión que codifiquen polipéptidos IgG completos u otros isotipos. VH y VL también pueden utilizarse en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de inmunoglobulinas utilizando la química de proteínas o la tecnología del ADN recombinante. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena simple, como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, obligando así 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 al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

[0056] Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede formar parte de polipéptidos de inmunoadhesión más grandes, formados por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Ejemplos de tales polipéptidos de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para hacer un polipéptido scFv tetramérico (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para fabricar polipéptidos scFv bivalentes y biotinilados (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las porciones de anticuerpo, como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos enteros utilizando técnicas convencionales, como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Además, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y los polipéptidos de inmunoadhesión pueden obtenerse mediante técnicas estándar de ADN recombinante, como se describe en el presente documento.

[0057] Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos o singénicos; o formas modificadas de los mismos (por ejemplo, humanizados, quiméricos, etc.). Los anticuerpos también pueden ser totalmente humanos. Los términos "anticuerpos monoclonales" y "composición de anticuerpos monoclonales", tal como se utilizan aquí, se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpos que contienen sólo una especie de sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de un antígeno, mientras que el término "anticuerpos policlonales" y "composición de anticuerpos policlonales" se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpos que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpos monoclonales suele mostrar una única afinidad de unión por un antígeno concreto con el que inmunorreacciona. Además, los anticuerpos pueden ser "humanizados", lo que incluye anticuerpos fabricados por una célula no humana que tienen regiones variables y constantes que han sido alteradas para parecerse más a los anticuerpos que serían fabricados por una célula humana. Por ejemplo, alterando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano para incorporar aminoácidos que se encuentran en las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la invención pueden incluir residuos

de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR. El término "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza aquí, también incluye anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como el ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

[0058] 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 codificante de un polipéptido de ADNc de doble cadena, complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la cadena codificante de un gen. En consecuencia, un polipéptido de ácido nucleico antisentido puede unirse por hidrógeno a un polipéptido de ácido nucleico sentido.

[0059] El término "fluido corporal" se refiere a fluidos que son excretados o secretados por el cuerpo, así como a fluidos que normalmente no lo son (por ej. líquido amniótico, humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, cerumen y cerilla, líquido de Cowper o líquido preeyaculatorio, quilo, quimo, heces, eyaculado femenino, líquido intersticial, líquido intracelular, linfa, menstruación, leche materna, moco, líquido pleural, líquido peritoneal, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, líquido sinovial, lágrimas, orina, lubricación vaginal, humor vítreo, vómito).

[0060] Los términos "cáncer" o "tumor" o "trastorno hiperproliferativo" se refieren a la presencia de células que poseen características típicas de las células cancerígenas, como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, rápida tasa de crecimiento y proliferación, y ciertos rasgos morfológicos característicos. Las células cancerosas suelen presentarse en forma de tumor, pero dichas células pueden existir solas dentro de un animal, o puede tratarse de una célula cancerosa no tumorigénica, como una célula leucémica. Los cánceres incluyen, entre otros, el cáncer de células B, por ejemplo, el mieloma múltiple, la macroglobulinemia de Waldenström, las enfermedades de cadena pesada, como, por ejemplo, la enfermedad de cadena alfa, la enfermedad de cadena gamma y la enfermedad de cadena mu, la gammapatía monoclonal benigna y la amiloidosis inmunocítica, los melanomas, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón, el cáncer de bronquios, el cáncer colorrectal, el cáncer de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata metastásico, refractario a las hormonas), 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 de útero o de endometrio, cáncer de cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículo, cáncer de vías biliares, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer de glándulas salivales, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándulas suprarrenales, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos y similares. Otros ejemplos no limitantes de tipos de cáncer aplicables a los métodos abarcados por la presente invención incluyen sarcomas y carcinomas humanos, p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, 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 glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, cáncer de hígado, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer óseo, tumor cerebral, cáncer testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma de células pequeñas de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, p. ej. g., 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 cadenas pesadas. En algunas realizaciones, el cáncer cuyo fenotipo se determina mediante el método de la invención es un cáncer epitelial como, pero no limitado a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cánceres ginecológicos, cáncer renal, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de piel. En otras realizaciones, el cáncer es de mama, de próstata, de pulmón o de colon. En otras realizaciones, el cáncer epitelial es un cáncer de pulmón no microcítico, un carcinoma de células renales no papilar, un carcinoma cervical, un carcinoma ovárico (por ejemplo, un carcinoma ovárico seroso) o un carcinoma de mama. Los cánceres epiteliales pueden caracterizarse de varias otras formas, entre otras, seroso, endometriode, mucinoso, de células claras, de Brenner o indiferenciado. En algunas realizaciones, la presente invención se utiliza en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico del linfoma o sus subtipos, incluyendo, pero sin limitarse a, el linfoma de células del manto.

[0061] Los términos "CDR", y su plural "CDRs", se refieren a una región determinante de la complementariedad (CDR) de la cual 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 a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones de andamiaje o marco. La definición exacta de los límites y longitudes de los CDR está sujeta a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por lo tanto, los CDR pueden denominarse Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de límite. A pesar de las diferencias en los límites, cada uno de estos sistemas presenta cierto grado de solapamiento en lo que constituyen las denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Por lo tanto, las definiciones de CDR según estos sistemas pueden diferir en longitud y áreas límite con respecto a la región marco adyacente. En algunas realizaciones, las CDR descritas en el presente documento se determinan según segmentos enumerados de secuencias de ácido nucleico y polipéptido de región variable de cadena ligera y cadena pesada (véase, por ejemplo, la Tabla 3). Véanse también Kabat, Chothia, y/o MacCallum et al., (Kabat et al., en "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Edition, U.S. Department of Health and Human Services, 1992; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196, 901; y MacCallum et al., J. Mol. Biol. (1996) 262, 732).

[0062] El término "región codificante" se refiere a las 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 las regiones de una secuencia de nucleótidos que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo, las regiones no traducidas 5' y 3').

[0063] El término "complementario" se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencia entre regiones de dos cadenas de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico. Se sabe que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno específicos ("emparejamiento de bases") con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela a la primera región si el residuo es timina o uracilo. Del mismo modo, se sabe que un residuo de citosina de una primera cadena de ácido nucleico es capaz de emparejarse con un residuo de una segunda cadena de ácido nucleico que es antiparalela a la primera cadena si el residuo es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria de una segunda región del mismo ácido nucleico o de otro diferente si, cuando las dos regiones están dispuestas de forma antiparalela, al menos un residuo nucleotídico de la primera región es capaz de formar un apareamiento de bases con un residuo de la segunda región. Preferiblemente, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo que, cuando la primera y la segunda porciones están dispuestas de forma antiparalela, al menos aproximadamente el 50%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% de los residuos nucleotídicos de la primera porción son capaces de emparejarse con residuos nucleotídicos de la segunda porción. Más preferiblemente, todos los residuos nucleotídicos de la primera porción son capaces de formar pares de bases con residuos nucleotídicos de la segunda porción.

[0064] Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo compuesto" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables que comprenden secuencias de inmunoglobulina de línea germinal o no de línea germinal de dos o más regiones variables no relacionadas. Además, el término "anticuerpo humano compuesto" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana de línea germinal o no de línea germinal y regiones variables que comprenden secuencias humanas de línea germinal o no de línea germinal de dos o más regiones variables humanas no relacionadas. Un anticuerpo humano compuesto es útil como componente eficaz en un agente terapéutico según la presente invención, ya que se reduce la antigenicidad del anticuerpo humano compuesto en el cuerpo humano.

[0065] El término "costimular", tal como se utiliza con referencia a las células inmunitarias activadas, incluye la capacidad de un polipéptido costimulador para proporcionar una segunda señal mediada por un receptor no activador (una "señal costimuladora") que induce la proliferación o la función efectora. Por ejemplo, una señal coestimuladora puede dar lugar a la secreción de citocinas, por ejemplo, en una célula T que ha recibido una señal mediada por un receptor de células T. Las células inmunitarias que han recibido una señal mediada por un receptor celular, por ejemplo, a través de un receptor activador, se denominan en el presente documento "células inmunitarias activadas".

[0066] El término "receptor costimulador" incluye receptores que transmiten una señal costimuladora a una célula inmunitaria, por ejemplo, CD28. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "receptores inhibidores" incluye receptores que transmiten una señal negativa a una célula inmunitaria (por ejemplo, CTLA4 o PD-1). Una señal inhibitoria transducida por un receptor inhibitorio puede producirse incluso si un receptor costimulador (como CD28) no está presente en la célula inmunitaria y, por lo tanto, no es simplemente una función de la competencia entre receptores inhibitorios y receptores costimuladores para la unión de polipéptidos costimuladores (Fallarino et al. (1998) J. Exp. Med. 188:205). La transmisión de una señal inhibitoria a una célula inmunitaria puede provocar la falta de respuesta, la anergia o la muerte celular programada de la célula inmunitaria. Preferiblemente, la transmisión de una señal inhibitoria opera a través de un mecanismo que no implica la apoptosis. En el presente documento, el término "apoptosis" incluye la muerte celular programada que puede caracterizarse mediante técnicas conocidas en la materia. La muerte celular apoptótica puede caracterizarse, por ejemplo, por el encogimiento celular, el sangrado de la membrana y la condensación de la cromatina que culmina en la fragmentación celular. Las células que sufren

apoptosis también muestran un patrón característico de rotura del ADN internucleosómico. Dependiendo de la forma del polipéptido que se une a un receptor, puede transmitirse una señal (por ejemplo, mediante una forma multivalente del polipéptido PD-L2 o una forma de PD-L2 que se une a receptores Fc que da lugar a la reticulación del receptor) o puede inhibirse una señal (por ejemplo, por una forma soluble, monovalente de un PD-L2 o una forma de PD-L2 que carece de receptores Fc), por ejemplo compitiendo con formas activadoras de PD-L2 por la unión al receptor. Sin embargo, hay casos en los que un polipéptido soluble puede ser estimulante. Los efectos de un agente modulador pueden demostrarse fácilmente utilizando ensayos de cribado rutinarios como los aquí descritos.

[0067] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluidas las regiones Fc de secuencia nativa y las regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana suele definirse para que se extienda desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el carboxilo-terminal de la misma. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para su uso en los anticuerpos de la presente invención incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humanas.

[0068] Tal como se utiliza en el presente documento, "receptor 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 nativa. Además, un FcR preferido es el que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas empalmadas alternativamente de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). El término "FcR" incluye a otros FcR, incluidos los que se identifiquen en el futuro.

[0069] Una molécula está "fijada" o "adherida" a un sustrato si está asociada de forma covalente o no covalente con el sustrato de tal forma que el sustrato puede enjuagarse con un fluido (por ejemplo, citrato salino estándar, pH 7,4) sin que una fracción sustancial de la molécula se disocie del sustrato.

[0070] Las "variantes conservativas de la función" son aquellas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y función general del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, la sustitución de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares (como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de modo que el porcentaje de similitud de la secuencia de proteínas o aminoácidos entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70% al 99% según se determine de acuerdo con un esquema de alineación como el Método Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservativa de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60% de identidad aminoacídica determinada por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, aún más preferiblemente al menos un 90%, y aún más preferiblemente al menos un 95%, y que tiene las mismas propiedades o funciones, o sustancialmente similares, que la proteína nativa o parental con la que se compara.

[0071] Tal como se utiliza en el presente documento, 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 secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la que se encuentra en un organismo no consistente en el animal no humano transgénico, y generalmente de una especie distinta a la del animal no humano transgénico.

[0072] El término "homólogo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la similitud de la secuencia de 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, entonces las regiones son homólogas en esa posición. Una primera región es homóloga a una segunda región si al menos una posición de residuo nucleotídico de cada región está ocupada por el mismo residuo. La homología entre dos regiones se expresa en términos de la proporción de posiciones de residuos nucleotídicos de las dos regiones que están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico. 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 un 50% de homología. Preferiblemente, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo que al menos aproximadamente el 50%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% de las posiciones de residuos nucleotídicos de cada una de las porciones están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico. Más preferiblemente, todas las posiciones de residuos nucleotídicos de cada una de las porciones están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico.

[0073] El término "célula huésped" se refiere a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico de la invención, como un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se utilizan indistintamente en el presente documento. Debe entenderse que estos términos se refieren no sólo a la célula en cuestión, sino también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias medioambientales, es posible que dicha progenie no sea idéntica a la célula progenitora, pero aún así se incluye en el ámbito del término tal y como se utiliza en el presente documento.

[0074] El término "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos fabricados por una célula no humana que tiene regiones variables y constantes que han sido alteradas para parecerse más a los anticuerpos que serían fabricados por una célula humana. Por ejemplo, alterando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano para incorporar aminoácidos que se encuentran en las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo, en las CDR. El término "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza aquí, también incluye anticuerpos en los que secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como el ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

[0075] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "región hipervariable", "HVR" o "HV" se refiere a las regiones de un dominio anticuerpo-variable que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de los seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único a la hora de conferir una especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu et al. (2000) Immunity 13, 37-45; Johnson y Wu en Methods in Molecular Biology 248, 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De hecho, los anticuerpos naturales de camélidos formados únicamente por una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera (véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446-448 (1993) y Sheriff et al. (1996) Nature Struct. Biol. 3, 733-736). El término "célula inmunitaria" hace referencia a las células que desempeñan un papel en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias son de origen hematopoyético e incluyen linfocitos, como las células B y T; células asesinas naturales; células mieloides, como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

[0076] El término "respuesta inmunitaria" incluye respuestas inmunitarias mediadas por células T y/o B que se ven influidas por la modulación de la coestimulación de células T. Las respuestas inmunitarias ejemplares incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad celular. Además, el término respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que se efectúan indirectamente mediante la activación de células T, por ejemplo, la producción de anticuerpos (respuestas humores) y la activación de células que responden a citocinas, por ejemplo, macrófagos.

[0077] El término "inhibir" incluye la disminución, limitación o bloqueo de, por ejemplo, una acción, función o interacción particular. Por ejemplo, el cáncer se "inhibe" si al menos un síntoma del cáncer, como el crecimiento hiperproliferativo, se alivia, termina, ralentiza o previene. Tal y como se utiliza aquí, el cáncer también se "inhibe" si la recurrencia o metástasis del cáncer se reduce, ralentiza, retrasa o previene.

[0078] 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 activador (por ejemplo, a través de un TCR, CD3, BCR o polipéptido Fc) y puede provocar, por ejemplo, la inhibición de la generación de segundos mensajeros; 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, incapacidad de la célula inmunitaria para producir mediadores, (como citoquinas (por ejemplo, IL-2) y/o mediadores de respuestas alérgicas); o el desarrollo de anergia.

[0079] 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 lugar a 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). Alternativamente, se puede impedir que una o ambas moléculas de la interacción unan su ligando y, por tanto, se mantengan inactivas con respecto a la actividad de unión del ligando (por ejemplo, la unión de su ligando y la activación o inhibición de la coestimulación). Inhibir una interacción de este tipo tiene 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.

[0080] El término "proteína aislada" se refiere a una proteína que está 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 otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Una proteína "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que se deriva el anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye los preparados de polipéptido en los que la proteína está separada de los componentes celulares de las células de las que se ha aislado o producido recombinantemente. En una realización, el lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína, teniendo menos de aproximadamente 30% (por peso seco) de proteína no deseada (también referida aquí como "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de proteína no deseada, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de proteína no deseada, y más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de proteína no deseada. Cuando se produce recombinantemente un anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión o una porción biológicamente activa del mismo, también es preferible que esté sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, que el medio de cultivo represente menos de aproximadamente el 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% del volumen de la preparación proteica.

[0081] El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

[0082] El término "KD" se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. La afinidad de unión de los anticuerpos de la invención divulgada puede medirse o determinarse mediante ensayos estándar anticuerpo-antígeno, por ejemplo, ensayos competitivos, ensayos de saturación o inmunoensayos estándar como ELISA o RIA.

[0083] El término "modular" incluye la regulación al alza y a la baja, por ejemplo, potenciando o inhibiendo una respuesta.

[0084] El término polipéptido de ácido nucleico "de origen natural" se refiere a un polipéptido de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

[0085] El nivel "normal" de expresión de un marcador es el nivel de expresión del marcador en células de un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, no afectado por un cáncer. Una "sobreexpresión" o un "nivel de expresión significativamente superior" de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de ensayo que es superior al error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión, y es preferiblemente al menos dos veces, y más preferiblemente 2 veces. 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, 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 o más veces superior a la actividad o nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, muestra de un sujeto sano que no padece la enfermedad asociada al marcador) y, preferiblemente, el nivel de expresión medio del marcador en varias muestras de control. Un "nivel de expresión significativamente inferior" de un marcador se refiere a un nivel de expresión en una muestra de ensayo 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, 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 o más bajo que el nivel de expresión del marcador en una muestra de control (por ejemplo, muestra de un sujeto sano que no padece la enfermedad asociada al marcador) y, preferiblemente, el nivel de expresión medio del marcador en varias muestras de control.

[0086] El término "PD-1" se refiere a un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina que funciona como un receptor coinhibitorio que tiene PD-L1 y PD-L2 como ligandos conocidos. PD-1 se identificó previamente utilizando un enfoque basado en la clonación por sustracción para seleccionar proteínas implicadas en la muerte celular apoptótica. PD-1 es un miembro de la familia de moléculas CD28/CTLA-4 basado en su capacidad de unirse a PD-L1. Al igual que CTLA4, PD-1 se induce rápidamente en la superficie de las células en respuesta a antiCD3 (Agata et al. 25 (1996) Int. Immunol. 8:765). Sin embargo, a diferencia de 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 timocitos y células mieloides (Agata et al. (1996) supra; Nishimura et al. (1996) Int. Immunol. 8:773).

[0087] Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de un biomarcador PD-1 humano representativo están disponibles al público en la base de datos GenBank bajo NM_005018.2 y NP_005009.2 y se muestran en la Tabla 1 (véase también Ishida et al. (1992) 20 EMBO J 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704; Patente de EE.UU. 5,698,520). PD-1 tiene una región extracelular que contiene un dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas, un dominio transmembrana y una región intracelular que incluye un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) (Ishida et al. (1992) EMBO J. 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704; Patente de EE.UU. 5.698.520). Estas características también definen una familia más amplia de polipéptidos, denominada receptores inmunoinhibidores, que también incluye gp49B, PIR-B y los receptores inhibidores asesinos (KIR) (Vivier y Daeron (1997) Immunol. Today 18:286). Se suele suponer que el motivo tirosil fosforilado ITIM de estos receptores interactúa con fosfatasa que contienen el dominio SH2, lo que da lugar a señales inhibitorias. Un subconjunto de estos receptores inmunoinhibidores se unen a polipéptidos del CMH, por ejemplo los KIR, y CTLA4 se une a B7-1 y

B7-2. Se ha propuesto que existe una relación filogenética entre los genes MHC y B7 (Henry et al. (1999) Immunol. Today 20(6):285-8). Las secuencias de ácido nucleico y polipeptídicas de PD-1 ortólogos en organismos distintos de los humanos son bien conocidas e 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).

[0088] Los polipéptidos PD-1 son receptores inhibitorios capaces de transmitir una señal inhibitoria a una célula inmunitaria para inhibir así la función efectora de la célula inmunitaria, o son capaces de promover la coestimulación (p. ej., por inhibición competitiva) de células inmunitarias, p. ej., cuando están presentes en forma soluble, monomérica. Los miembros preferidos de la familia 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 antígeno.

[0089] El término "actividad PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de modular una señal inhibitoria en una célula inmunitaria activada, por ejemplo, al enganchar un ligando PD-1 natural en una célula presentadora de antígeno. PD-1 transmite una señal inhibitoria a una célula inmunitaria de forma similar a CTLA4. La modulación de una señal inhibitoria en una célula inmunitaria tiene como resultado la modulación de la proliferación y/o la secreción de citocinas por parte de una célula inmunitaria. Por tanto, el término "actividad PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de unirse a su(s) ligando(s) natural(es), la capacidad de modular las señales coestimuladoras o inhibitorias de las células inmunitarias y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

[0090] El término "ligando de PD-1" se refiere a socios de unión del receptor PD-1 e incluye tanto PD-L1 (Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027) y PD-L2 (Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261). Existen al menos dos tipos de polipéptidos ligandos PD-1 humanos. Las proteínas ligando 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 al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027 para los datos de secuencia) y PD-L2 (véase Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261 para los datos de la 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. Sólo PD-L2 se expresa en páncreas, pulmón e hígado, mientras que sólo PD-L1 se expresa en hígado fetal. Ambos ligandos PD-1 están regulados al alza en monocitos y células dendríticas activados.

[0091] Los ligandos de PD-1 comprenden una familia de polipéptidos que tienen ciertas características estructurales y funcionales conservadas. El término "familia", cuando se utiliza para referirse a proteínas o moléculas de ácido nucleico, se refiere a dos o más proteínas o moléculas de ácido nucleico que tienen un dominio o motivo estructural común y una homología de secuencia de aminoácidos o nucleótidos suficiente, tal como se define en el presente documento. Estos miembros de la familia pueden ser naturales o no naturales y pueden pertenecer a la misma especie o a especies diferentes. Por ejemplo, una familia puede contener una primera proteína de origen humano, así como otras proteínas distintas de origen humano o, alternativamente, puede contener homólogas 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 utiliza en el presente documento, incluye polipéptidos costimuladores que comparten homología de secuencia con polipéptidos B7, por ejemplo, con B7-1, B7-2, B7h (Swallow et al. (1999) Immunity 11:423), y/o ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2). Por ejemplo, las secuencias humanas B7-1 y B7-2 comparten aproximadamente un 26% de identidad aminoacídica cuando se comparan mediante el programa BLAST del NCBI con los parámetros por defecto (matriz Blosum62 con penalizaciones de brecha fijadas en existencia 11 y extensión 1 (véase el sitio web del 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, como los dominios señal, los dominios IgV y los dominios IgC. Los dominios IgV y los dominios IgC son dominios reconocidos como miembros de la superfamilia Ig. Estos dominios corresponden a unidades estructurales que presentan distintos patrones de plegamiento denominados pliegues Ig. Los pliegues de las Ig están formados por un sándwich de dos láminas β , cada una de ellas compuesta por hebras β antiparalelas de 5-10 aminoácidos con un enlace disulfuro conservado entre las dos láminas en la mayoría, pero no en todas, los dominios IgC de las moléculas Ig, TCR y MHC comparten los mismos tipos de patrones de secuencia y se denominan conjunto C1 dentro de la superfamilia Ig. Otros dominios IgC pertenecen a otros conjuntos. Los dominios IgV también comparten patrones de secuencia y se denominan dominios conjunto V. Los dominios IgV son más largos que los dominios IgC y forman un par adicional de hebras β .

[0092] Los polipéptidos B7 preferidos son capaces de proporcionar señales coestimuladoras o inhibitorias a las células inmunitarias para, de este modo, promover o inhibir 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 células T, mientras que los miembros de la familia B7 que se unen a receptores inhibitorios reducen la coestimulación. Además, el mismo miembro de la familia B7 puede aumentar o disminuir la coestimulación de las células T. Por ejemplo, cuando se une a un receptor coestimulador, el ligando PD-1 puede inducir la coestimulación de células inmunitarias o puede inhibir la coestimulación de células inmunitarias, por ejemplo, cuando está presente en forma soluble. Cuando se unen

a un receptor inhibidor, los polipéptidos del ligando PD-1 pueden transmitir una señal inhibidora a una célula inmunitaria. Los miembros preferidos de la familia B7 incluyen B7-1, B7-2, B7h, PD-L1 o PD-L2 y fragmentos solubles o derivados de los mismos. 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 inhibidora o una señal coestimuladora a una célula inmunitaria, preferiblemente una célula T.

[0093] La modulación de una señal coestimuladora tiene como resultado la modulación de la función efectora de una célula inmunitaria. Así, el término "actividad de ligando de PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido ligando de PD-1 de unirse a su(s) receptor(es) natural(es) (por ejemplo, PD-1 o B7-1), la capacidad de modular las señales coestimuladoras o inhibidoras de las células inmunitarias, y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

[0094] El término "PD-L1" se refiere a un ligando PD-1 específico. Se han identificado dos formas de moléculas PD-L1 humanas. Una forma es un polipéptido soluble natural de PD-L1, es decir, que tiene un dominio hidrofílico corto y ningún dominio transmembrana, y se denomina en el presente documento PD-L1S (mostrado en la Tabla 1 como NO ID SEC: 4). La segunda forma es un polipéptido asociado a células, es decir, que tiene un dominio transmembrana y citoplasmático, denominado en el presente documento PD-L1M (mostrado en NO ID SEC: 6). Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de biomarcadores PD-L1 humanos representativos con respecto a PD-L1M también están a disposición del público en la base de datos GenBank bajo NM_014143.3 y NP_054862.1. Las proteínas PD-L1 comprenden una secuencia señal, un dominio IgV y un dominio IgC. La secuencia de señal de la NO ID SEC: 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 18. La secuencia de señal de la NO ID SEC: 6 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 1 hasta aproximadamente el aminoácido 18. El dominio IgV de la NO ID SEC: 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta aproximadamente el aminoácido 134 y el dominio IgV de NO ID SEC: 6 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta aproximadamente el aminoácido 134. El dominio IgC de la NO ID SEC: 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 135 hasta aproximadamente el aminoácido 227 y el dominio IgC de NO ID SEC: 6 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 135 hasta aproximadamente el aminoácido 227. La cola hidrofílica de la PD-L1 ejemplificada en NO ID SEC: 4 comprende una cola hidrofílica mostrada desde aproximadamente el aminoácido 228 hasta aproximadamente el aminoácido 245. El polipéptido PD-L1 ejemplificado en NO ID SEC: 6 comprende un dominio transmembrana que se muestra desde aproximadamente los aminoácidos 239 a aproximadamente el aminoácido 259 de NO ID SEC: 6 y un dominio citoplasmático mostrado desde aproximadamente 30 aminoácidos 260 a aproximadamente aminoácidos 290 de NO ID SEC: 6. Además, las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de los ortólogos de PD-L1 en organismos distintos de los humanos son bien conocidas e 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).

[0095] El término "PD-L2" se refiere a otro ligando PD-1 específico. PD-L2 es un miembro de la familia B7 que se expresa en diversas APC, como células dendríticas, macrófagos y mastocitos derivados de la médula ósea (Zhong et al. (2007) Eur. J. Immunol. 37:2405). La PD-L2 expresada por APC es capaz tanto de inhibir la activación de células T a través de la ligadura de PD-1 como de coestimular la activación de células T, a través de un mecanismo independiente de PD-1 (Shin et al. (2005) J. Exp. Med. 201:1531). Además, la ligadura de PD-L2 expresada por células dendríticas da lugar a una mayor expresión de citocinas y supervivencia de las células dendríticas (Radhakrishnan et al. (2003) J. Immunol. 37:1827; Nguyen et al. (2002) J. Exp. Med. 196:1393). Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de biomarcadores PD-L2 humanos representativos (por ejemplo, NOs ID SEC: 7 y 8) son bien conocidos en la técnica y también están a disposición del público en la base de datos GenBank bajo 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 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 NO ID SEC: 8 comprende una secuencia de señales. Tal como se utiliza en el presente documento, una "secuencia señal" o "péptido señal" sirve para dirigir un polipéptido que contenga dicha secuencia a una bicapa lipídica, y se escinde en polipéptidos secretados y unidos a membrana e incluye un péptido que contiene unos 15 o más aminoácidos que aparece en el extremo N-terminal de polipéptidos secretados y unidos a membrana y que contiene un gran número de residuos de aminoácidos hidrófobos. Por ejemplo, una secuencia señal contiene al menos unos 10-30 residuos de aminoácidos, preferiblemente unos 15- 25 residuos de aminoácidos, más preferiblemente unos 18-20 residuos de aminoácidos, y aún más preferiblemente unos 19 residuos de aminoácidos, y tiene al menos unos 35-65%, preferiblemente unos 38-50%, y más preferiblemente unos 40-45% de residuos de aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, valina, leucina, isoleucina o fenilalanina). En otra realización, los residuos de aminoácidos 220-243 del polipéptido PD-L2 humano nativo y los residuos de aminoácidos 201-243 del polipéptido maduro comprenden un dominio transmembrana. Tal como se utiliza aquí, el término "dominio transmembrana" incluye una secuencia de aminoácidos de unos 15 residuos de aminoácidos de longitud que abarca la membrana plasmática. Más preferiblemente, un dominio transmembrana incluye unos 20, 25, 30, 35, 40 o 45 residuos de aminoácidos y abarca la membrana plasmática. Los dominios transmembrana son ricos en residuos

hidrófobos y suelen tener una estructura alfa-hélice. En una realización preferida, al menos el 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 al. (1996) *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 235-263. En otra realización adicional, los residuos de aminoácidos 20-120 del polipéptido PD-L2 humano nativo 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 nativo y los residuos de aminoácidos 102-200 del polipéptido maduro comprenden un dominio IgC. Tal como se utilizan en el presente documento, los dominios IgV e IgC se reconocen en la técnica como dominios de miembros de la superfamilia Ig. Estos dominios corresponden a unidades estructurales que presentan distintos patrones de plegamiento denominados pliegues Ig. Los pliegues de las Ig se componen de un sándwich de dos láminas β , cada una de ellas formada por antiparalelos (3 hebras 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 las moléculas Ig, TCR y MHC comparten los mismos tipos de patrones de secuencia y se denominan conjunto CI dentro de la superfamilia Ig. Otros dominios IgC pertenecen a otros conjuntos. Los dominios IgV también comparten patrones de secuencia y se denominan dominios conjunto V. Los dominios IgV son más largos que los dominios C y forman un par adicional de filamentos. En otra realización más, los residuos de aminoácidos 1-219 del polipéptido PD-L2 humano nativo y los residuos de aminoácidos 1-200 del polipéptido maduro comprenden un dominio extracelular. Tal como se utiliza aquí, el término "dominio extracelular" representa los aminoácidos N-terminales 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 péptido señal. En otra realización adicional, los residuos de aminoácidos 244-273 del polipéptido PD-L2 humano nativo y los residuos de aminoácidos 225-273 del polipéptido maduro comprenden un dominio citoplásmico. Tal como se utiliza aquí, el término "dominio citoplásmico" representa los aminoácidos C-terminales que se extienden como una cola en el citoplasma de una célula. Además, las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de los ortólogos de PD-L2 en organismos distintos de los humanos son bien conocidas e incluyen, por ejemplo, PDL2 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).

[0096] El término "actividad de PD-L2", "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 sensible a PD-L2, o sobre un compañero de unión del polipéptido de PD-L2, según se determine in vivo o in vitro, de acuerdo con técnicas estándar. En una realización, una actividad de PD-L2 es una actividad directa, como una asociación con un socio de unión de PD-L2. Tal como se utiliza en el presente documento, una "molécula objetivo" o "pareja de unión" es una molécula con la que un polipéptido PD-L2 se une o interactúa en la naturaleza, de tal forma que se consigue la función mediada por PD-L2. En una realización ejemplar, una molécula diana de PD-L2 es el receptor RGMB. Alternativamente, una actividad de PDL2 es una actividad indirecta, como una actividad de señalización celular mediada por la interacción del polipéptido PD-L2 con su socio de unión natural, por ejemplo, RGMB. En el presente documento 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) se unen a y/o modulan la actividad del receptor RGMB, PD-1 u otros socios naturales de unión de PD-L2, 2) modulan la señalización intra o intercelular, 3) modulan la activación de células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, y 4) modulan la respuesta inmunitaria de un organismo, por ejemplo, un ratón o un organismo humano.

[0097] El término "subtipos de células de sangre periférica" se refiere a los tipos de células que normalmente se encuentran en la sangre periférica, incluyendo, pero sin limitarse a, eosinófilos, neutrófilos, células T, monocitos, células NK, granulocitos y células B.

[0098] El término "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante y combinatoria de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas germinales y/o no germinales. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias Ig humanas, a mutagénesis somática in vivo) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

[0099] El término "RGMB" se refiere a un miembro de la familia de moléculas guía repulsivas anclado al glucosilfosfatidilinositol (GPI). Samad et al. 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, no se conocía previamente la interacción entre RGMb y PD-L2. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de biomarcadores RGMb humanos representativos (por ejemplo, NOs ID SEC: 9 y 10) son bien conocidos en la técnica y también están a disposición del público en la base de datos GenBank bajo 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 a notch-3, fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa tipo II beta, proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina-2, trombospondina, precursor del receptor 3 de efrina tipo-B y Slit-2, todos los cuales se sabe que influyen en la guía axonal, el crecimiento de las neuritas y otras funciones de desarrollo neuronal. El C-terminal de RGMb también contiene un dominio hidrofóbico indicativo de un anclaje GPI extracelular de 21 aminoácidos. Además, las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de los ortólogos de la RGMb en organismos distintos de los humanos son bien conocidas e incluyen, por ejemplo, la 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).

[0100] El término "muestra" utilizado para detectar o determinar la presencia o el nivel de al menos un biomarcador suele ser sangre total, plasma, suero, saliva, orina, heces (p. ej., heces fecales), lágrimas y cualquier otro fluido corporal (p. ej., como se ha descrito anteriormente en la definición de "fluidos corporales"), o una muestra de tejido (p. ej., biopsia) como una muestra de intestino delgado, colon o tejido de resección quirúrgica. En ciertos casos, 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.

[0101] El término "molécula pequeña" es un término de la técnica e incluye moléculas que tienen menos de aproximadamente 1000 pesos moleculares o menos de aproximadamente 500 pesos moleculares. En una realización, las moléculas pequeñas no comprenden exclusivamente enlaces peptídicos. En otra realización, las moléculas pequeñas no son oligoméricas. Algunos ejemplos de compuestos de moléculas pequeñas cuya actividad puede examinarse son, entre otros, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, policétidos) (Cane et al. 1998. Science 282:63) y bibliotecas de extractos de productos naturales. En otra realización, los compuestos son pequeños compuestos orgánicos no peptídicos. En otra realización, una molécula pequeña no es biosintética.

[0102] El término "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (KD) de aproximadamente menos de 10⁻⁷ M, tal como aproximadamente menos de 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M o 10⁻¹⁰ M o incluso menor cuando se determina mediante la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento de ensayo BIACORE® utilizando Gal1 humano como analito y el anticuerpo como ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos de 11-, 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 o más que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o de un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

[0103] El término "sujeto" se refiere a cualquier animal, mamífero o ser humano sano, o a cualquier animal, mamífero o ser humano afectado por una enfermedad de interés (por ejemplo, cáncer). El término "sujeto" es intercambiable con "paciente".

[0104] El término "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluye preparaciones de anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión en las que la proteína está separada de precursores químicos u otras sustancias químicas que intervienen en la síntesis de la proteína. En una realización, el lenguaje "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos no anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o no anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, aún más preferiblemente menos del 10% de precursores químicos o productos químicos no anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, y más preferiblemente menos del 5% de precursores químicos o productos químicos no anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión.

[0105] Un "polinucleótido transcrito" o "transcrito nucleotídico" es un polinucleótido (p. ej. un ARNm, ARNhn, ADNc, miARN maduro, pre-miARN, pri-miARN, miARN*, anti-miARN, o un sitio de unión de miARN, o una variante de los mismos o un análogo de dicho ARN o ADNc) que es complementario u homólogo con todo o parte de un ARNm maduro producido por transcripción de un marcador de la invención y procesamiento postranscripcional normal (e.p. ej. empalme), en su caso, del transcrito de ARN, y transcripción inversa del transcrito de ARN.

[0106] El término "célula T" incluye las células T CD4+ y las células T CD8+. El término célula T también incluye tanto las células T de tipo T ayudante 1 como las células T de tipo T ayudante 2. El término "célula presentadora de antígeno" incluye células presentadoras de antígeno profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos).

[0107] Una "subexpresión" o "nivel significativamente inferior de expresión o número de copias" de un marcador (por ejemplo, RGMb, PDL2, o marcador de señalización corriente abajo del mismo) se refiere a un nivel de expresión o número de copias en una muestra de ensayo que es mayor que el error estándar del ensayo empleado para evaluar la expresión o el número 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 número de copias del marcador en una muestra de control (por ejemplo, muestra de un sujeto sano no afectado por el cáncer) y, preferiblemente, el nivel de expresión o número de copias medio del marcador en varias muestras de control.

[0108] El término "vector" se refiere a un ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, los vectores no episomales de mamíferos) se integran en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la misma y, por tanto, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están vinculados operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" o simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen adoptar la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, como los vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

[0109] El término "tolerancia" o "falta de respuesta" incluye la refractividad de las células, como las células inmunitarias, a la estimulación, por ejemplo, la estimulación a través de un receptor activador o una citoquina. La falta de respuesta puede producirse, por ejemplo, por la exposición a inmunosupresores o a dosis elevadas de antígeno. Varios métodos independientes pueden inducir tolerancia. Uno de los mecanismos se denomina "anergia", que se define como un estado en el que las células persisten in vivo como células que no responden en lugar de diferenciarse en células con funciones efectoras. Dicha refractividad suele ser antígeno-específica y persiste tras cesar la exposición al antígeno tolerante. Por ejemplo, la anergia en las células T se caracteriza por la falta de producción de citocinas, por ejemplo, IL-2. La anergia de las células T se produce cuando éstas se exponen al antígeno y reciben una primera señal (un receptor de células T o una señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (incluso si la reexposición se produce en presencia de un polipéptido costimulador) tiene como resultado la no producción de citocinas y, por tanto, la no proliferación. Sin embargo, las células T anérgicas pueden proliferar si se cultivan con citoquinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de los linfocitos T también puede observarse por la falta de producción de IL-2 por los linfocitos T medida por ELISA o por un ensayo de proliferación utilizando una línea celular indicadora. Alternativamente, puede utilizarse una construcción de gen informador. Por ejemplo, las células T anérgicas no consiguen iniciar la transcripción del gen IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador 5' del gen IL-2 o por un multímero de la secuencia AP1 que puede encontrarse dentro del potenciador (Kang et al. (1992) Science 257:1134). Otro mecanismo se conoce como "agotamiento". El agotamiento de las células T es un estado de disfunción de las células T que se produce en muchas infecciones crónicas y en el cáncer. Se define por una pésima función efectora, una expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de las células T efectoras funcionales o de memoria.

[0110] Existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína concreta y las secuencias de nucleótidos que pueden codificar la proteína, tal y como se define en el código genético (que se muestra a continuación). Asimismo, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico concreto y la secuencia de aminoácidos codificada por dicho ácido nucleico, tal y como se define en el código genético.

CÓDIGO GENÉTICO

[0111]

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
- 5 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
- 10 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
- 15 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 (end) TAA, TAG, TGA
- 20 [0112] Una característica importante y bien conocida del código genético es su redundancia, en virtud de la cual, para la mayoría de los aminoácidos utilizados para fabricar proteínas, puede emplearse más de un triplete de nucleótidos codificantes (ilustrado anteriormente). Por lo tanto, varias secuencias de nucleótidos diferentes pueden codificar una secuencia de aminoácidos determinada. Dichas secuencias de nucleótidos se consideran funcionalmente equivalentes, ya que dan lugar a la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos
- 25 (aunque determinados organismos pueden traducir algunas secuencias con mayor eficacia que otras). Además, ocasionalmente, puede encontrarse una variante metilada de una purina o pirimidina en una secuencia de nucleótidos determinada. Estas metilaciones no afectan a la relación de codificación entre el codón trinucleotídico y el aminoácido correspondiente.
- 30 [0113] En vista de lo anterior, la secuencia de nucleótidos de un ADN o ARN que codifica para una proteína de fusión o polipéptido de la invención (o cualquier porción del mismo) puede utilizarse para derivar la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión o polipéptido, utilizando el código genético para traducir el ADN o ARN en una secuencia de aminoácidos. De igual forma, para una secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido de fusión, las secuencias de nucleótidos correspondientes que pueden codificar la proteína o polipéptido de fusión pueden deducirse del código genético (que, debido a su redundancia, producirá múltiples secuencias de ácidos nucleicos para cualquier
- 35 secuencia de aminoácidos dada). Así, debe considerarse que la descripción y/o divulgación en el presente documento de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido de fusión incluye también la descripción y/o divulgación de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. Del mismo modo, debe considerarse que la descripción y/o divulgación de una proteína de fusión o secuencia aminoacídica polipeptídica en el presente documento también incluye la descripción y/o divulgación de todas las secuencias nucleotídicas posibles
- 40 que pueden codificar la secuencia aminoacídica.
- [0114] Por último, la información sobre secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos para moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos útiles en la presente invención es bien conocida en la técnica y está fácilmente disponible en bases de datos de acceso público, como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Por ejemplo, en la
- 45 Tabla 1 se proporcionan secuencias ejemplares de ácidos nucleicos y aminoácidos derivadas de bases de datos de secuencias disponibles públicamente.

Tabla 1

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

cactctgggtg gggctgctcc aggc atg cag atc cca cag gag ccc tgg cca	51
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro	
1 5	
gtc gtc tgg gag gtg cta cca 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 gag agc 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 aac gaa ggg gag 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 tgg 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 gag 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 gag tgc cgc ttc cgt gtc aca cca 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 agc gcc cgg cgc aat gac agc ggc acc tac	387
Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr	
110 115 120	
ctc tgt ggg gcc atc tcc ctg gcc ccc aag gag cag atc aca gag agc	435
Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser	
125 130 135	
ctg cgg gaa gag ctc agc gtc 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 ggc cag ttc cca acc ctg	531
Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Ser Ala Gly Gln Phe Glu Thr Leu	
155 160 165	
gtg gth ggt gtc gtg ggc gcc ctg ctg gcc agc ctg gtg ctg cta gtc	579
Val Val Gly Val Val Gly Gly 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 agc 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 cgc gat ttc cag tgg cga gag aag	723
Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Gln Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys	
220 225 230	
acc cgg 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 ttc cct agc gga atg ggc acc tca tcc ccc gcc cgc agc	819
Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr 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 Glu Pro Leu Arg Pro Glu Asp	
270 275 280	
gga cac tgc tct tgg ccc ctc tgaacggggtt ccttggccac cagtgatctg cag	921
Gly His Cys Ser Trp Pro Leu	
285	

5 NO ID SEC: 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			

10

15

NO ID SEC: 3 Secuencia ácida del ADNc de PD-L1S humano

	gcttccccgag 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 80	
5	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	
	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 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 tatectaatt cctcacctcc	893
	attcatccaa accatatgtgt tacttaataa acattcagca gatattttatg gaataaaaaa	953
	aaaaaaaaa aaaaaa	968

NO ID SEC: 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 Glu 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 Glu 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

```

5

10

15

20

NO ID SEC: 5 Secuencia de ADNc de PD-L1M humano

```

cgaggctccg caccagccgc gcttctgtcc gctcgcaggg cattccagaa agatgagg 58
Met Arg
1
ata tat gct gtc ttc 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 acc atc gaa tgc aac ttc cca gta gaa aac caa tta gac ctg 202
Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Glu Leu Asp Leu
35 40 45
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 ctc 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 acc gat gtg aac 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 aac gtc 442
Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
115 120 125
aat gcc cca tac aac aac 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 gcc tac ccc aag 538
Val Thr Ser Glu His Gln 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
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 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 acc aac tca aag aag caa agt gat aca cat ttg gag gag acc 922

```

NO ID SEC: 5 Secuencia de ADNc de PD-L1M humano

Gln	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu	Glu	Thr		
275					280				285					290			
taatccagca	ttggaacttc	tgatcttcaa	gcagggattc	tcaacctgtg	gtttaggggt	982											
tcacggtggc	tgagcgtgac	aagaggaagg	aatgggccc	tggtatgcag	gcaatgtggg	1042											
acttaaaagg	ccaagcact	gaaaatggaa	cctggcgaaa	gcagaggagg	agaatgaaga	1102											
aagatggagt	caaacaggga	gcctggaggg	agaccttgat	actttcaa	gcctgagggg	1162											
ctcatcgacg	cctgtgacag	ggagaaaagga	tactttctgaa	caaggagcct	ccaagcaaat	1222											
catccattgc	tcacccctagg	aagacgggtt	gagaatccct	aatttgaggg	tcagttcctg	1282											
cagaagtgcc	ctttgcctcc	actcaatgcc	tcaatttggt	ttctgcatga	ctgagagtct	1342											
cagtgttggg	acgggacagt	atztatgtat	gagtttttcc	tattttat	gagtctgtga	1402											
ggctctcttg	tcagtgtgagt	gtggttgtga	atgatttctt	ttgaagatat	attgtagtag	1462											
atgttacaat	tttgtcgcca	aactaaactt	gctgcttaat	gatttgctca	catctagtaa	1522											
aacatggagt	atttgtaaaa	aaaaaaaaaa	a			1553											

5

NO ID SEC: 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	Glu	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																

NO ID SEC: 7 Secuencia de ADNc de PD-L2 humano

5

```

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 gcc 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
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 Glu Leu
65 70 75 80
ccc cta ggg aag gcc tgg 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 ctg 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 ctg tac cag gtc 528
Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Gln Gly Leu Tyr Glu 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 cct 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 ctg 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

```

5 NO ID SEC: 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 Gln Asn
50      55      60
Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Gln 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 Glu
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 Gln 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

```

10

15

NO ID SEC: 9 Secuencia del ADNc de la RGMb humano

```

1  atgataagga agaagaggaa gogaagcgcg cccccgggcc catgccgcag ccacggggccc
61 agaccgcgcca cggcgcccgcc gccgcggccc tcgcccggagc ccacgagacc tgcattggacg
121 ggcatgggct tgagagcagc accttccagc gccgcggctg ccgcccgcga ggttgagcag
181 cgccgcagcc ccgggctctg cccccgcgcg ctggagctgc tgcctgctgt gctgttcagc
241 ctccggctgc tccacgcagg tgactgccaa cagccagccc aatgtcgaat ccagaaatgc
301 accacggact tcgtgtccct gacttctcac ctgaactctg ccgttgacgg ctttgactct
361 gagttttgca aggccttgcg tgcctatgct ggctgcaccc agcgaacttc aaaagcctgc
421 cgtggcaacc tggatatacca ttctgccgtg ttgggtatca gtgacctcat gagccagagg
481 aattgttcca aggatggacc cacatcctct accaaccgcc aagtgaccca tgatccttgc
541 aactatcaca gccacgctgg agccaggga cacaggagag gggaccagaa ccctcccagt
601 tacctttttt gtggcttgtt tggagatcct cacctcagaa ctttcaagga taacttccaa
661 acatgcaaag tagaaggggc ctggccactc atagataata attatctttc agttcaagtg
721 acaaacgtac ctgtggtccc tggatccagt gctactgcta caaataagat cactattatc
781 ttcaaagccc accatgagtg tacagatcag aaagtctacc aagctgtgac agatgacctg
841 ccggccgcct ttgtggatgg caccaccagt ggtggggaca gcgatgcaa gagcctgcgt
901 atcgtggaaa gggagagtgg ccactatgtg gagatgcag cccgctatat agggaccaca
961 gtgttttgca ggcaggtggg tcgctacctg acccttgcca tccgtatgcc tgaagacctg
1021 gccatgtcct acgaggagag ccaggacctg cagctgtgctg tgaacggctg cccctgagt
1081 gaacgcatcg atgacgggca gggccagggtg tctgccatcc tgggacacag cctgcctcgc
1141 acctccttgg tgcaggcctg gcctggctac acactggaga ctgccaacac tcaatgccat
1201 gagaagatgc cagtgaagga catctatttc cagtcctgtg tcttcgacct gctcaccact
1261 ggtgatgcca actttactgc cgcagcccac agtgccttgg aggatgtgga ggccctgcac
1321 ccaaggaagg aacgctggca cattttcccc agcagtgcca atgggactcc ccgtggaggc
1381 agtgatttgt ctgtcagtct aggactcacc tgcttgatcc ttatcgtgtt tttgtag

```

NO ID SEC: 10 Secuencia de aminoácidos de la RGMb humano

```

1  mirkkrkrsa ppgpcrshgp rpatapappp speptrpawt gmglraapss aaaaaaeveg
61 rrspglcpgp lellllllfs lgllhagdcq qpaqcriqkc ttdfvsltsh lnsavdgfds
121 efckalraya gctqrtskac rgnlvysav lgisdmsqr ncskdgptss tnpevthdpc
181 nyhshagare hrrgdqnpss ylfcgldfqp hlrtfkdnfq tckvegawpl idnnylsqvq
241 tnvvpvpgss atatnkitii fkahhctdq kvyqavtddl paafvdgtts ggdsdaksir
301 iveresghyv emharyigtv vfvrgvgryl tlaairmpedl amsyeesqdl qlcvngcpls
361 eriddgggqv sailghslpr tslvqawpgy tletantqch ekmpvkdiyf qscvfdlltt
421 gdanftaaah saledvealh prkerwhifp ssgngtprgg sdlsvslglt clilivfl

```

II. Agentes que modulan la activación de las células inmunitarias

[0115] Aquí se demuestra que PD-L2 se une tanto a RGMb como a PD-1, aunque la unión de RGMb a PD-L2 es más débil que la de PD-L2 a PD-1. Así, los agentes de la presente invención descritos en el presente documento que modulan la interacción entre RGMb y PD-1, ya sea directa o indirectamente, pueden regular al alza o a la baja el sistema inmunitario y, de este modo, regular al alza o a la baja una respuesta inmunitaria. Así, la modulación de la interacción entre RGMb y PD-L2 resulta en la modulación de la respuesta inmunitaria. Los agentes que modulan esta interacción pueden hacerlo directa o indirectamente.

[0116] La interacción entre un polipéptido RGMb y un polipéptido PD-L2 resulta en la entrega de una señal inmune co-inhibitoria. Así, en una realización, los agentes que bloquean directamente la interacción entre RGMb y PD-L2 (p. ej., anticuerpos anti-RGMb y/o anticuerpos bloqueantes anti-PD-L2) pueden impedir la señalización inhibitoria y estimular una respuesta inmunitaria. Alternativamente, los agentes que bloquean indirectamente la interacción entre RGMb y PD-L2 pueden impedir la señalización inhibitoria y aumentar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, PD-L2, al unirse a un polipéptido PD-1, reduce indirectamente la concentración efectiva de polipéptido PD-L2 disponible para unirse a RGMb. Los agentes ejemplares para aumentar 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), pequeñas moléculas o péptidos que bloquean la interacción entre RGMb y PD-L2; proteínas de fusión (p. ej. la porción extracelular de RGMb o PD-L2 fusionada a la porción 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 transcripción o traducción de RGMb y/o PD-L2; una forma no activadora de un ligando natural de RGMb, una forma soluble de un ligando natural de RGMb y una proteína de fusión de ligando natural de RGMb.

Los ligandos naturales de RGMb son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, BMP2, BMP4 y receptores de BMP (Samad et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:14122-1412).

[0117] En otra realización, los agentes que promueven la unión de un polipéptido RGMb a un polipéptido PD-L2 promueven una señal inhibitoria a una célula inmunitaria. Los agentes que modulan esta interacción pueden hacerlo directa o indirectamente. 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 inhibitoria y regular a la baja una respuesta inmunitaria. Alternativamente, los agentes que bloquean la unión de PD-1 a PD-L2 aumentan la concentración efectiva de PD-L2 disponible para unirse a RGMb. Los agentes ejemplares para regular a la baja una respuesta inmunitaria incluyen anticuerpos contra RGMb o PD-L2 que activan o promueven la interacción entre RGMb y PD-L2; pequeñas moléculas o péptidos que activan o promueven la interacción entre RGMb y PD-L2; y anticuerpos bloqueantes que se unen a PD-1 e inhiben la interacción entre PD-1 y PD-L2.

[0118] Agentes adicionales útiles en los métodos de la presente invención incluyen anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, ligandos naturales, y derivados de ligandos naturales, que pueden unirse y/o activar o inhibir biomarcadores proteicos de la invención, incluyendo los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de los mismos; ARN de interferencia, antisentido, aptámeros de ácido nucleico, etc. que pueden regular a la baja la expresión y/o actividad de los biomarcadores de la invención, incluidos los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de los mismos.

[0119] En una realización, moléculas de ácido nucleico aisladas que hibridan específicamente con o codifican uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o porciones biológicamente activas de los mismos. Tal y como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (es decir, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (es decir, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que está separada de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas correspondientes a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden contener menos de aproximadamente 5 kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico (es decir, una célula de linfoma). Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o de medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente.

[0120] Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de uno o más 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%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95% o más (por ejemplo, alrededor del 98%) homóloga a la secuencia de nucleótidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o una parte de los mismos (es decir, 100, 200, 300, 400, 450, 500 o más nucleótidos), puede aislarse utilizando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, se puede aislar un ADNc humano a partir de una línea celular humana (de Stratagene, LaJolla, CA, o Clontech, Palo Alto, CA) utilizando toda o parte de la molécula de ácido nucleico, o fragmento de la misma, como sonda de hibridación y técnicas de hibridación estándar (es decir, como se describe en Sambrook, J., Fritsh, 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, una molécula de ácido nucleico que abarque toda o una parte de la secuencia de nucleótidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o una secuencia de nucleótidos que sea al menos de aproximadamente el 50%, preferiblemente al menos de aproximadamente el 60%, más preferiblemente al menos de aproximadamente el 70%, aún más preferiblemente al menos de aproximadamente el 80%, aún más preferiblemente al menos de aproximadamente el 90%, y más preferiblemente al menos un 95% o más homóloga a la secuencia nucleotídica, o fragmento de la misma, puede aislarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores oligonucleotídicos diseñados basándose en la secuencia de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de los mismos, o la secuencia nucleotídica homóloga. Por ejemplo, el ARNm puede aislarse a partir de células musculares (es decir, mediante el procedimiento de extracción con guanidinio-tiocianato de Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-5299) y el ADNc puede prepararse utilizando transcriptasa inversa (es decir, transcriptasa inversa Moloney MLV, disponible en Gibco/BRL, Bethesda, MD; o transcriptasa inversa AMV, disponible en Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Los cebadores oligonucleotídicos sintéticos para la amplificación por PCR pueden diseñarse según métodos bien conocidos en la técnica. Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, como molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados según las técnicas estándar

de amplificación por PCR. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de la secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de nucleótidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden prepararse mediante técnicas sintéticas estándar, es decir, utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

5 [0121] Las sondas basadas en las secuencias nucleotídicas de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden utilizarse para detectar o confirmar los transcritos deseados o las secuencias genómicas que codifican las mismas proteínas u otras homólogas. En realizaciones preferidas, la sonda comprende además un grupo de etiqueta unido a ella, es decir, el grupo de etiqueta puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas pueden utilizarse como parte de un kit de prueba diagnóstica para identificar
10 células o tejidos que expresen uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, como por ejemplo midiendo un nivel de ácido nucleico de uno o más biomarcadores en una muestra de células de un sujeto, es decir, detectando los niveles de ARNm de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

[0122] También se contemplan moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas correspondientes a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 de diferentes especies. Por ejemplo, el ADNc de rata o mono puede identificarse basándose en la secuencia de nucleótidos de una secuencia humana y/o de ratón, y dichas secuencias son bien conocidas en la técnica. En una realización, la(s) molécula(s) de ácido nucleico de la invención codifica(n) una proteína o porción de la misma que incluye(n) una secuencia de aminoácidos que es(n) suficientemente homóloga(s) a una secuencia de aminoácidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, de tal manera que la proteína o porción de la misma modula(n) (por ejemplo, mejorar), una o más de las siguientes actividades biológicas: a) unión al biomarcador; b) modulación del número de copias del biomarcador; c) modulación del nivel de expresión del biomarcador; y d) modulación del nivel de actividad del biomarcador.
15
20

[0123] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "suficientemente homóloga" se refiere a proteínas o porciones de las mismas que tienen secuencias de aminoácidos que incluyen un número mínimo de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar a un residuo de aminoácido en uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento del mismo) a una secuencia de aminoácidos del biomarcador, o fragmento del mismo, de tal manera que la proteína o porción de la misma modula (por ejemplo, potencie) una o más de las siguientes actividades biológicas: a) unión al biomarcador; b) modulación del número de copias del biomarcador; c) modulación del nivel de expresión del biomarcador; y d) modulación del nivel de actividad del biomarcador.
25

[0124] 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 a la secuencia completa de aminoácidos del biomarcador, o un fragmento del mismo.
30

[0125] Las porciones de proteínas codificadas por moléculas de ácido nucleico de uno o más biomarcadores enumerados en las Tablas 1-9 son preferiblemente porciones biológicamente activas de la proteína. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "porción biológicamente activa" de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pretende incluir una porción, por ejemplo, un dominio/motivo, que tiene una o más de las actividades biológicas de la proteína de longitud completa.
35

[0126] Pueden realizarse ensayos de unión estándar, por ejemplo, inmunoprecipitaciones y ensayos de levadura de dos híbridos, como se describe en el presente documento, o ensayos funcionales, por ejemplo, experimentos de ARNi o sobreexpresión, para determinar la capacidad de la proteína o de un fragmento biológicamente activo de la misma para mantener una actividad biológica de la proteína de longitud completa.
40

[0127] La invención abarca además moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de la misma debido a degeneración del código genético y codifican así la misma proteína que la codificada por la secuencia de nucleótidos, o fragmento de la misma. En otra realización, una molécula aislada 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 biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de los mismos, o una proteína que tiene 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 a la secuencia de aminoácidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de los mismos. En otra realización, un ácido nucleico que codifica un polipéptido consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de un fragmento de longitud completa de interés que es menor a 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 en longitud.
45
50

[0128] Se apreciará por los expertos en la materia que los polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 pueden existir dentro de una población (por ejemplo, una población de mamíferos y/o humana). Estos polimorfismos genéticos
55

pueden existir entre individuos de una misma población debido a la variación alélica natural. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, preferiblemente una proteína de mamífero, por ejemplo, humana. Tales variaciones alélicas naturales pueden dar lugar típicamente a una variación del 1-5% en la secuencia de nucleótidos de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Todas y cada una de dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 se pretende que estén dentro del alcance de la invención. Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 proteínas de otras especies.

[0129] Además de las variantes alélicas de origen natural de la secuencia de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 que pueden existir en la población, el artesano experto apreciará además que los cambios pueden introducirse por mutación en la secuencia de nucleótidos, o fragmento de la misma, dando lugar así a 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, en la secuencia, o fragmento de la misma, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos que den lugar a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales". Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse de la secuencia de tipo salvaje de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 sin alterar la actividad de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" es necesario para la actividad de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1. Sin embargo, otros residuos de aminoácidos (por ejemplo, los que no están conservados o sólo están semiconservados entre el ratón y el ser humano) pueden no ser esenciales para la actividad y, por lo tanto, es probable que se puedan alterar sin alterar la actividad de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

[0130] El término "identidad u homología de secuencia" se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas polipeptídicas o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad monomérica de aminoácidos, 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 secuencia en esa posición. El porcentaje de homología o identidad de secuencia entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones de dos secuencias son iguales, entonces las dos secuencias son homólogas en un 60% o tienen una identidad de secuencia del 60%. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten un 50% de homología o identidad de secuencia. Por lo general, la comparación se realiza cuando dos secuencias se alinean para obtener la máxima homología. A menos que se especifique lo contrario, las "regiones de bucle saliente", por ejemplo, las derivadas de delecciones o inserciones en una de las secuencias, se cuentan como discordancias.

[0131] La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede realizarse utilizando un algoritmo matemático. Preferiblemente, la alineación puede realizarse mediante el método Clustal. Los parámetros de alineación múltiple incluyen Penalización Gap =10, Penalización de longitud Gap = 10. Para las alineaciones de ADN, los parámetros de alineación por pares pueden ser Htuple=2, Penalización Gap=5, Ventana=4 y Diagonal salvada=4. Para los alineamientos de proteínas, los parámetros de alineamiento por pares pueden ser Ktuple=1, Penalización Gap=3, Ventana=5, y Diagonales salvadas=5.

[0132] En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el método 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), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de separación de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra realización preferida más, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el programa GAP del paquete de software GCG (disponible en línea), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de separación de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En otra realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en línea), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

[0133] Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína homóloga a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento de la misma, puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos, o fragmento de la misma, o una secuencia de nucleótidos homóloga de tal manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos se realizan

en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales previstos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos con 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 previsto en uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 se sustituye preferentemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden examinarse para una actividad descrita en el presente documento para identificar mutantes que retengan la actividad deseada. Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse recombinantemente según métodos bien conocidos en la técnica y la actividad de la proteína puede determinarse utilizando, por ejemplo, ensayos descritos en el presente documento.

[0134] Los niveles de uno o más biomarcadores enumerados en los niveles de la Tabla 1 pueden evaluarse mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de una molécula o proteína transcrita. Ejemplos no limitantes de tales 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.

[0135] En realizaciones preferidas, los niveles de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 se determinan midiendo el transcrito génico (por ejemplo, ARNm), midiendo la cantidad de proteína traducida o midiendo la actividad del producto génico. Los niveles de expresión pueden controlarse de diversas maneras, por ejemplo, detectando los niveles de ARNm, los niveles de proteínas o la actividad de las proteínas, cualquiera de los cuales puede medirse mediante técnicas estándar. La detección puede implicar la cuantificación del nivel de expresión génica (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, proteína o actividad enzimática) o, alternativamente, puede ser una evaluación cualitativa del nivel de expresión génica, en particular en comparación con un nivel de control. El tipo de nivel detectado quedará claro por el contexto.

[0136] En una realización particular, el nivel de expresión de ARNm puede determinarse tanto por formatos in situ como in vitro en una muestra biológica utilizando métodos conocidos en la técnica. El término "muestra biológica" incluye tejidos, células, fluidos biológicos y sus aislados, aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Muchos métodos de detección de la expresión utilizan ARN aislado. Para los métodos in vitro, cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione contra el aislamiento de ARNm puede utilizarse para la purificación de ARN a partir de células (véase, por ejemplo, Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York 1987-1999). Además, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de muestras de tejido utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de un solo paso de Chomczynski (1989, patente estadounidense nº 4.843.155).

[0137] El ARNm aislado puede utilizarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, entre otros, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y arrays de sondas. Un método de diagnóstico preferido para la detección de los niveles de ARNm consiste en poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones estrictas con un ARNm o ADN genómico que codifique uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1. En el presente documento se describen otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que se están expresando uno o más biomarcadores de los enumerados en la Tabla 1.

[0138] En un formato, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, haciendo pasar el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, como la nitrocelulosa. En un formato alternativo, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) en una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una matriz de chips de genes, por ejemplo, una matriz de chips de genes Affymetrix™. Un artesano experto puede adaptar fácilmente métodos conocidos de detección de ARNm para su uso en la detección del nivel de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 niveles de expresión de ARNm.

[0139] 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 expuesta en Mullis, 1987, Patente de EE.UU. Nº 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), replicasa Q-Beta (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197), replicación en círculo rodante (Lizardi et al., U.S. Patent No. 5,854,033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en cantidades muy bajas. Tal como se utilizan aquí, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden unirse a las regiones 5' o 3' de un gen (hebras positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta intermedia. En general, los cebadores de amplificación tienen entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de entre 50 y 200 nucleótidos de longitud. En condiciones 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.

[0140] Para los métodos in situ, no es necesario aislar el ARNm de las células antes de la detección. En tales métodos, una muestra de células o tejido se prepara/procesa utilizando métodos histológicos conocidos. A continuación, la muestra se inmoviliza en un soporte, normalmente un portaobjetos de vidrio, y luego se pone en contacto con una sonda que puede hibridar con el Uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 ARNm.

[0141] Como alternativa a realizar determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado de uno o más biomarcadores listados en la Tabla 1. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto mediante la comparación de su expresión con la expresión de un gen no biomarcador, por ejemplo, un gen de mantenimiento que se exprese de forma constitutiva. Entre los genes adecuados para la normalización se incluyen genes de mantenimiento, como el gen de la 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 diferentes fuentes.

[0142] El nivel o actividad de una proteína correspondiente a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 también puede detectarse y/o cuantificarse detectando o cuantificando el polipéptido expresado. El polipéptido puede detectarse y cuantificarse por cualquiera de los medios conocidos por los expertos en la materia. Pueden incluir métodos bioquímicos analíticos como la electroforesis, la electroforesis capilar, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de hiperdifusión y similares, o diversos métodos inmunológicos como las reacciones de precipitina fluida o en gel, inmunodifusión (simple o doble), inmunolectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, Western blotting, y similares. Un experto puede adaptar fácilmente métodos conocidos de detección de proteínas/anticuerpos para determinar si las células expresan el biomarcador de interés.

[0143] La presente invención proporciona además formas polipeptídicas solubles, purificadas y/o aisladas de uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de los mismos. Además, debe entenderse que todos y cada uno de los atributos de los polipéptidos descritos en el presente documento, como identidades porcentuales, longitudes polipeptídicas, fragmentos polipeptídicos, actividades biológicas, anticuerpos, etc. pueden combinarse en cualquier orden o combinación con respecto a cualquier biomarcador enumerado en la Tabla 1 y combinaciones de los mismos.

[0144] En un aspecto, un polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos de longitud completa correspondiente a uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o una secuencia de aminoácidos de longitud completa con 1 a aproximadamente 20 sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las descritas en el presente documento 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 describe en el presente documento, bien conocida en la técnica, o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la presente invención contempla una composición que comprende un polipéptido aislado correspondiente a uno o más biomarcadores enumerados en el polipéptido de la Tabla 1 y menos de aproximadamente el 25%, o alternativamente el 15%, o alternativamente el 5%, de macromoléculas o polipéptidos biológicos contaminantes.

[0145] La presente invención proporciona además composiciones relacionadas con la producción, detección o caracterización de dichos polipéptidos, o fragmentos de los mismos, tales como ácidos nucleicos, vectores, células huésped 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.

[0146] Un polipéptido aislado o un fragmento del mismo (o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido) correspondiente a uno o más biomarcadores de la invención, incluidos los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 o fragmentos de los mismos, puede utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a dicho inmunógeno, utilizando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales según

métodos bien conocidos en la técnica. Un péptido antigénico comprende al menos 8 residuos de aminoácidos y engloba un epítipo presente en la respectiva molécula de longitud completa, de manera que un anticuerpo criado contra el péptido forma un complejo inmunitario específico con la respectiva molécula de longitud completa. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos. En una realización, dichos epítopos pueden ser específicos para una molécula polipeptídica dada de una especie, como el ratón o el ser humano (es decir, se utiliza como inmunógeno un péptido antigénico que abarca una región de la molécula polipeptídica que no se conserva entre especies; dichos residuos no conservados pueden determinarse utilizando un alineamiento como el que se proporciona en el presente documento).

[0147] En una realización, un anticuerpo se une sustancialmente de forma 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 sustancialmente de forma específica a PD-L2 e inhibe o potencia tanto la interacción de PD-L2 con RGMb como 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 tanto entre PD-L2 y RGMb como entre PD-L2 y PD-1. En otra realización adicional, un anticuerpo se une de forma sustancialmente específica a RGMb e inhibe o potencia la interacción de PD-L2 con RGMb.

[0148] Por ejemplo, un inmunógeno polipeptídico se utiliza típicamente para preparar anticuerpos inmunizando 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 recombinantemente o sintetizada químicamente o un fragmento de la misma frente a la que se desea generar la respuesta inmunitaria. El preparado puede incluir además un adyuvante, como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulante similar. La inmunización de un sujeto adecuado con un preparado inmunogénico induce una respuesta de anticuerpos policlonales frente al péptido antigénico contenido en el mismo.

[0149] Los anticuerpos policlonales pueden prepararse como se ha descrito anteriormente inmunizando a un sujeto adecuado con un inmunógeno polipeptídico. El título de anticuerpos del polipéptido en el sujeto inmunizado puede monitorizarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, como un ensayo inmunoenzimático (ELISA) con polipéptido inmovilizado. Si se desea, el anticuerpo dirigido contra el antígeno puede aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse posteriormente mediante técnicas bien conocidas, como la cromatografía de proteína A, para obtener la fracción IgG. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpos son más altos, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, como la técnica del hibridoma (descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (véase también Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh et al. (1976) *Proc. Acad. Sci.* 76:2927-31; Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica más reciente del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del EBV-hibridoma (Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o las técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales es bien conocida (véase en general Kenneth, R. H. en *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 al. (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). Brevemente, una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) se fusiona con linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se analizan para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se una al antígeno polipeptídico, preferiblemente de forma específica.

[0150] Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos utilizados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse con el fin de generar un anticuerpo monoclonal contra uno o más biomarcadores de la invención, incluidos los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento de los mismos (véase, por ejemplo, Galfre, G. et al. (1977) *Nature* 266:55052; Geffer et al. (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; Kenneth (1980) *supra*). Por otra parte, el trabajador experto ordinario apreciará que hay muchas variaciones de tales métodos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, pueden fabricarse hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con un preparado inmunogénico de la presente invención con una línea celular inmortalizada de ratón. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las líneas celulares de mieloma de ratón sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Cualquiera de las diversas líneas celulares de mieloma puede utilizarse como pareja de fusión según las técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/OAg14. Estas líneas de mieloma están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. Normalmente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol ("PEG"). A continuación, las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan utilizando el medio HAT, que elimina las células de mieloma no fusionadas y las fusionadas improproductivamente (los esplenocitos no fusionados mueren al cabo de varios días porque no se transforman). Las

células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan examinando los sobrenadantes de cultivo de hibridoma en busca de anticuerpos que se unen a un polipéptido dado, por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA estándar.

[0151] Como alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un monoclonal específico para uno de los polipéptidos descritos anteriormente mediante el cribado de una biblioteca combinatoria de inmunoglobulinas recombinantes (por ejemplo, una biblioteca de visualización de fagos de anticuerpos) con el polipéptido apropiado para aislar así los miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen al polipéptido. Existen kits comerciales para generar y cribar bibliotecas de visualización de fagos (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, nº de catálogo 27-9400-01; y el Kit de Visualización de Fagos Stratagene SurfZAP™, No. de catálogo 240612). Además, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos especialmente adecuados para generar y cribar una biblioteca de visualización de anticuerpos en, por ejemplo, Ladner et al. Patente estadounidense No. 5.223.409; Kang et al. Publicación internacional No. WO 92/18619; Dower et al. Publicación internacional No. WO 91/17271; Winter et al. Publicación internacional No. WO 92/20791; Markland et al. Publicación internacional No. WO 92/15679; Breittling et al. Publicación internacional No. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación internacional No. WO 92/01047; Garrard et al. Publicación internacional No. WO 92/09690; Ladner et al. Publicación internacional No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1369-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; y McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554.

[0152] Puesto que es bien conocido en la técnica que los dominios CDR3 de cadena pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo para un antígeno, los anticuerpos monoclonales recombinantes de la presente invención preparados como se ha expuesto anteriormente comprenden preferentemente los CDR3 de cadena pesada y ligera de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, incluyendo las secuencias de la Tabla 3, o porciones de las mismas). Los anticuerpos pueden comprender además las CDR2 de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, incluyendo las secuencias de la Tabla 3, o porciones de las mismas). Los anticuerpos pueden comprender además las CDR1 de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, incluyendo las secuencias de la Tabla 3, o porciones de las mismas). En otras realizaciones, los anticuerpos pueden incluir cualquier combinación de CDR.

[0153] Las regiones CDR1, 2, y/o 3 de los anticuerpos de ingeniería descritos anteriormente pueden comprender la(s) secuencia(s) exacta(s) de aminoácidos como las de las regiones variables de la presente invención (por ejemplo, incluyendo las secuencias de la Tabla 3, o porciones de las mismas) divulgadas en el presente documento. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que puede ser posible cierta desviación de las secuencias CDR exactas, manteniendo la capacidad del anticuerpo de unirse eficazmente a RGMb o PD-L2 (por ejemplo, modificaciones conservadoras de la secuencia). Por consiguiente, en otra realización, el anticuerpo diseñado puede estar compuesto de 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, incluyendo las secuencias de la Tabla 3, o porciones de las mismas).

[0154] Las características estructurales de anticuerpos no humanos o humanos (por ejemplo, un anticuerpo de rata anti-ratón/antihumano RGMb descrito en el presente documento) pueden utilizarse para crear anticuerpos humanos estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la presente invención, como la unión a PD-L2 y/o RGMb. Otra propiedad funcional incluye la inhibición de la unión de los anticuerpos originales conocidos, no humanos o humanos, en un ensayo ELISA de competición.

[0155] En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos monoclonales capaces de unirse a PD-L2 humana y/o RGMb, que comprenden una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia que es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 100% idéntica del grupo de CDR de dominio variable de cadena pesada presentado en la Tabla 3.

[0156] Del mismo modo, también se proporcionan anticuerpos monoclonales capaces de unirse a PD-L2 humana y/o RGMb, que comprenden una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia que es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 100% idéntica del grupo de CDR de dominio variable de cadena ligera presentado en la Tabla 3.

[0157] Anticuerpos monoclonales capaces de unirse a PD-L2 humana y/o RGMb, que comprenden una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia que es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 100% idéntica del grupo de CDR de dominio variable de cadena pesada presentado en la Tabla 3; y que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia que es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 100% idéntica del grupo de CDR de dominio variable de cadena ligera presentado en la Tabla 3. También se proporcionan.

[0158] Un experto observará que tal porcentaje de homología es equivalente y puede lograrse introduciendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de una CDR dada.

5 [0159] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden comprender una cadena pesada, en la 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 presentadas en la Tabla 3 y una cadena ligera, en la 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 ligera presentadas en la Tabla 3.

10 [0160] Tales anticuerpos monoclonales pueden comprender una cadena ligera, en la que 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, como se describe en el presente documento; y/o una cadena pesada, en la que 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, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales
15 capaces de unirse a Gal1 humana comprenden o están formados por CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, como se describe en el presente documento.

[0161] El dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales de la presente invención puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos vH establecida 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
20 aminoácidos vk establecida en la Tabla 3.

[0162] La presente invención proporciona además fragmentos de dichos anticuerpos monoclonales que incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diabodies; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, varias moléculas inmunoinhibidoras, como PD-L1, PD-1, CTLA-4 y similares, pueden unirse de forma biespecífica o multiespecífica.

25 [0163] También se contemplan otros fragmentos de los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por ejemplo, se proporcionan cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina individuales, en las que los dominios variables de las mismas 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 que es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 100% idéntica del grupo de CDR de dominio variable de
30 cadena pesada o cadena ligera presentado en la Tabla 3. En otra realización, una cadena ligera de inmunoglobulina comprende al menos una CDR que tiene una secuencia que es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 100% idéntica del grupo de CDR de dominio variable de cadena ligera o cadena pesada descrito en el presente documento (por ejemplo, presentado en la Tabla 3).

[0164] En algunas realizaciones, la cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina comprende un dominio variable que
35 comprende al menos uno de los CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3 descritos en el presente documento. Dichas cadenas pesadas de inmunoglobulina pueden comprender o consistir en al menos una de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Dichas cadenas ligeras de inmunoglobulina pueden comprender o consistir en al menos una de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3.

[0165] En otras realizaciones, una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina según la presente invención
40 comprende o consiste en una secuencia de dominio variable vH o vk, respectivamente, proporcionada en la Tabla 3.

[0166] La presente invención proporciona además polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada del grupo que consiste en dominio variable vH, dominio variable vk, secuencias CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 descritas en el presente documento.

[0167] Los anticuerpos, inmunoglobulinas y polipéptidos de la invención pueden utilizarse en forma aislada (p. ej.,
45 purificada) o contenidos en un vector, como una membrana o vesícula lipídica (p. ej., un liposoma).

[0168] Se contemplan la(s) modificación(es) de la(s) secuencia(s) de aminoácidos de los anticuerpos aquí descritos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente injertando sólo CDRs en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FRs de VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión al antígeno se
50 reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios residuos de aminoácidos de la VH y VL del anticuerpo no humano, no sólo en las CDR sino también en las FR, están directa o indirectamente asociados con la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos diferentes derivados de FRs de la VH y VL del anticuerpo humano

reduciría la actividad de unión y puede corregirse sustituyendo los aminoácidos por residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

[0169] Se pueden 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 codifique un anticuerpo y un polipéptido con características deseables. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de actividad. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen su actividad biológica funcional, es posible realizar determinadas sustituciones de aminoácidos en la secuencia de una proteína y, por supuesto, en su secuencia de codificación de ADN, obteniendo sin embargo una proteína con propiedades similares. Así pues, se contempla la posibilidad de introducir diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o en las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos polipéptidos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

[0170] Al realizar los cambios en las secuencias amino del polipéptido, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos a la hora de conferir una función biológica interactiva a una proteína es de conocimiento general en la materia. 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 ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga: 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 (-0,8,9); 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 (-3,5); aspartato (<RTI 3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

[0171] Es conocido en la materia que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tengan un índice o puntuación hidropática similar y aún así resultar en una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún así obtener una proteína biológica funcionalmente equivalente.

[0172] Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en cuenta varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

[0173] Otro tipo de modificación de aminoácidos del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glicosilación original del anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la estabilidad. Por "alterar" se entiende suprimir una o más partes carbohidratadas que se encuentran en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos suele estar ligada a N. "N-ligado" se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptidas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptidas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados al N). Otro tipo de modificación covalente consiste en acoplar química o enzimáticamente glucósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula huésped que tenga capacidad de glicosilación para la glicosilación N- u O-ligada. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Por ejemplo, tales métodos se describen en el documento WO87/05330.

[0174] De forma similar, la eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo puede realizarse química o enzimáticamente. La deglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento provoca la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el anticuerpo. La deglicosilación química está descrita por Sojhr et al. (1987) y por Edge et al. (1981). La escisión enzimática de los restos de carbohidratos en los anticuerpos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas, tal y como describen Thotakura et al. (1987).

[0175] Otras modificaciones pueden implicar la formación de inmunoconjugados. Por ejemplo, en un tipo de modificación covalente, los anticuerpos o las proteínas se unen covalentemente a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxiálquilenos, de la manera expuesta en Pat. de EE.UU. No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

[0176] La conjugación de anticuerpos u otras proteínas de la presente invención con agentes heterólogos puede hacerse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales incluyendo pero no limitado a N-succinimidil (2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bisactivos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, el ácido 1-isotiocianatobencilmetil dietil entriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (WO 94/11026).

[0177] En otro aspecto, la presente invención presenta anticuerpos conjugados con una fracción terapéutica, como una citotoxina, un fármaco y/o un radioisótopo. Cuando se conjugan con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpos se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, que las mate). Algunos ejemplos son taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina, así como sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tieopa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo radiactivo, para generar radiofármacos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado, como un cáncer.

[0178] Los anticuerpos conjugados pueden usarse diagnóstica o pronósticamente para monitorizar los niveles de polipéptidos en el tejido como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplando (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables son diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la P-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados se incluyen la estreptavidina/biotina y la avidina/biotina; Algunos ejemplos de materiales fluorescentes adecuados son la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína (FITC), la rodamina, la fluoresceína diclorotriazinilamina, el cloruro de dansilo o la ficoeritrina (PE); un ejemplo de material luminiscente es el luminol; algunos ejemplos de materiales bioluminiscentes son la luciferasa, la luciferina y la aequorina, y algunos ejemplos de material radiactivo adecuado son ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H. [0134] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, pretende abarcar el marcado directo del anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) al anticuerpo, así como el marcado indirecto del anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable.

[0179] Los conjugados de anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica determinada. La porción terapéutica no debe interpretarse como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, como la abrina, la ricina A, la exotoxina de Pseudomonas o la toxina diftérica; una proteína como el factor de necrosis tumoral o el interferón- γ ; o, modificadores de la respuesta biológica como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otras citocinas o factores de crecimiento.

[0180] Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 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 al. (eds.), pp. 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 al. (eds.), pp. 303 16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of AntibodyToxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119 58 (1982).

[0181] En algunas realizaciones, las conjugaciones pueden hacerse utilizando un "enlazador escindible" que facilite la liberación del agente citotóxico o del agente inhibidor del crecimiento en una célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador lábil al ácido, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilado o un enlazador que contenga disulfuro (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. No. 5.208.020). Alternativamente, puede fabricarse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo y el agente citotóxico o el agente inhibidor del crecimiento, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifique un péptido enlazador que no destruya las propiedades deseadas del conjugado.

[0182] Además, los anticuerpos polipeptídicos recombinantes, como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que pueden fabricarse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando los métodos descritos en Robinson et al. Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira et al. Solicitud de Patente Europea 184.187; Taniguchi, M. Solicitud de patente europea 171.496; Morrison et al. Solicitud de patente europea 173.494; Neuberger et al. Solicitud PCT WO 86/01533; Cabilly et al. Patente estadounidense nº 4.816.567; Cabilly et al. Solicitud de patente europea 125.023; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) Biotechniques 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534; y Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

[0183] Además, los anticuerpos humanizados pueden fabricarse según protocolos estándar como los divulgados en la Patente de EE.UU. 5,565,332. En otra realización, las cadenas de anticuerpos o los miembros del par de unión específicos pueden producirse por recombinación entre vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una fusión de una cadena polipeptídica de un miembro del par de unión específico y un componente de un paquete de visualización genérico replicable y vectores que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican una segunda cadena polipeptídica de un miembro del par de unión único utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes estadounidenses 5.565.332, 5.871.907 o 5.733.743. El uso de anticuerpos intracelulares para inhibir la función de proteínas en una célula también es conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2638-2646; Biocca, S. et al. (1990) EMBO J. 9:101-108; Werge, T. M. et al. (1990) FEBS Lett. 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-7428; Marasco, W. A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Biocca, S. et al. (1994) Biotechnology (NY) 12:396-399; Chen, S.-Y. et al. (1994) Hum. Gene Ther. 5:595-601; Duan, L et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-5079; Chen, S.-Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-5936; Beerli, R. R. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936; Beerli, R. R. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672; Mhashilkar, A. M. et al. (1995) EMBO J. 14:1542-1551; Richardson, J. H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; Publicación PCT nº WO 94/02610 de Marasco et al.; y Publicación PCT No. WO 95/03832 de Duan et al.).

[0184] Además, podrían fabricarse anticuerpos totalmente humanos contra biomarcadores de la invención, incluidos los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de los mismos. Se pueden fabricar anticuerpos totalmente humanos en ratones transgénicos para genes de inmunoglobulina humana, por ejemplo, según Hogan, et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory. Brevemente, los ratones transgénicos son inmunizados con inmunógeno purificado. Se recogen células del bazo y se fusionan con 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 totalmente humanos reducirían la inmunogenicidad de dichos anticuerpos en un humano.

[0185] En una realización, un anticuerpo para 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 secuencial. Los triomas y los hibridomas híbridos son dos ejemplos de líneas celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. En la patente estadounidense 4.474.893 se describen ejemplos de anticuerpos biespecíficos producidos por un hibridoma híbrido o un trioma. Se han construido anticuerpos biespecíficos por medios químicos (Staerz et al. (1985) Nature 314:628, y Perez et al. (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 de EE.UU. 5.959.084. Los fragmentos de anticuerpos biespecíficos se describen en la Patente de EE.UU. 5.798.229.

[0186] Los agentes biespecíficos también pueden generarse fabricando heterohibridomas mediante la fusión de hibridomas u otras células que fabriquen anticuerpos diferentes, seguida de la identificación de clones que produzcan y coensamben ambos anticuerpos. También pueden generarse por conjugación química o genética de cadenas completas de inmunoglobulina o porciones de las mismas, como las secuencias Fab y Fv. El componente anticuerpo

puede unirse a un polipéptido o a un fragmento del mismo de uno o más biomarcadores de la invención, incluyendo uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento del mismo. En una realización, el anticuerpo biespecífico podría unirse específicamente tanto a un polipéptido o a un fragmento del mismo como a su(s) compañero(s) natural(es) de unión o a un fragmento(s) del mismo.

[0187] En otro aspecto de esta invención, los péptidos o miméticos peptídicos pueden usarse para antagonizar o agonizar la actividad de uno o más biomarcadores de la invención, incluyendo uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento(s) de los mismos. 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 el cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento, para la actividad antagonista. En una realización, una biblioteca variegada de variantes se genera por mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y está codificada por una biblioteca variegada de genes. Se puede producir una biblioteca abigarrada de variantes, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos a secuencias génicas de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias polipeptídicas potenciales sea expresable como polipéptidos individuales que contengan el conjunto de secuencias polipeptídicas en él. Existen diversos métodos que pueden utilizarse para producir bibliotecas de variantes polipeptídicas a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. La síntesis química de una secuencia genética degenerada puede realizarse en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético ligarse después a un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite disponer, en una sola mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias polipeptídicas potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, S. A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

[0188] Además, las bibliotecas de fragmentos de una secuencia codificante polipeptídica pueden utilizarse para generar una población variada de fragmentos polipeptídicos para el cribado y posterior selección de variantes de un polipéptido dado. En una realización, puede generarse una biblioteca de fragmentos de secuencias codificantes tratando un fragmento PCR bicatenario de una secuencia codificante polipeptídica con una nucleasa en condiciones en las que el mellado sólo se produce aproximadamente una vez por polipéptido, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar ADN bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos mellados, eliminando las porciones monocatenario de los dúplex reformados mediante tratamiento con nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifique fragmentos N-terminal, C-terminal e internos de varios tamaños del polipéptido.

[0189] Se conocen varias técnicas en la materia para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para el cribado de bibliotecas de ADNc en busca de productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para el cribado rápido de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos. Las técnicas más utilizadas, susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el cribado de grandes bibliotecas de genes suelen incluir la clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se ha detectado. La mutagénesis recursiva de conjunto (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de interés (Arkin y Youvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delagrave et al. (1993) *Protein Eng.* 6(3):327-331). En una realización, los ensayos basados en células pueden explotarse para analizar una biblioteca de polipéptidos abigarrada. Por ejemplo, una biblioteca de vectores de expresión puede transfectarse en una línea celular que normalmente sintetiza uno o más biomarcadores de la invención, incluyendo uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento de los mismos. A continuación, las células transfectadas se cultivan de forma que se produzca el polipéptido de longitud completa y un polipéptido mutante concreto, 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. A continuación, se puede recuperar el ADN plasmídico de las células que puntúan para la inhibición o, alternativamente, la potenciación de la actividad del polipéptido de longitud completa, y los clones individuales se caracterizan aún más.

[0190] La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede utilizarse para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia aminoacídica polipeptídica 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); por ejemplo, añadiendo residuos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

[0191] Las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento permitirán a los expertos en la materia producir polipéptidos correspondientes a secuencias peptídicas y variantes de secuencia de las mismas. Dichos polipéptidos pueden producirse en células huésped procariontas o eucariotas mediante la expresión de polinucleótidos que codifican la secuencia peptídica, frecuentemente como parte de un polipéptido mayor. Alternativamente, dichos péptidos pueden sintetizarse por métodos químicos. Los métodos para la expresión de proteínas heterólogas en huéspedes recombinantes, la síntesis química de polipéptidos y la traducción in vitro son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger y Kimmel, *Methods in Enzymology*, Volume 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 al. (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,).

[0192] Los péptidos pueden ser producidos, típicamente por síntesis química directa. Los péptidos pueden producirse como péptidos modificados, con elementos no peptídicos unidos por enlace covalente al N-terminal y/o al C-terminal. En ciertas realizaciones preferidas, el carboxi-terminal o el amino-terminal, o ambos, se modifican químicamente. Las modificaciones más comunes de los grupos amino y carboxilo terminales son la acetilación y la amidación, respectivamente. En diversas realizaciones de la invención pueden incorporarse modificaciones aminoterminales como la acilación (por ejemplo, acetilación) o la alquilación (por ejemplo, metilación) y modificaciones carboxi-terminales como la amidación, así como otras modificaciones terminales, incluida la ciclación. Ciertas modificaciones aminoterminales y/o carboxi-terminales y/o extensiones peptídicas de la secuencia central 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 deseables, y otras. Los péptidos aquí divulgados pueden utilizarse terapéuticamente para tratar enfermedades, por ejemplo, alterando la coestimulación en un paciente.

[0193] Los peptidomiméticos (Fauchere, J. (1986) *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber y Freidinger (1985) *TINS* p.392; y Evans et al. (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229) suelen desarrollarse con ayuda de modelos moleculares informatizados. Los peptidomiméticos estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden utilizarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, por métodos conocidos en la técnica y descritos con más detalle en las siguientes referencias: Spatola, A. F. en "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins" Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo de 1983), Vol. 1, número 3, "Peptide Backbone Modifications" (revisión general); Morley, J. S. (1980) *Trends Pharm. Sci.* pp. 463-468 (revisión general); Hudson, D. et al. (1979) *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185 (-CH₂NH-, CH₂CH₂-); Spatola, A. F. et al. (1986) *Life Sci.* 38:1243-1249 (-CH₂S-); Hann, M. M. (1982) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 307-314 (-CH-CH-, cis y trans); Almquist, R. G. et al. (190) *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (-COCH₂-); Jennings-White, C. et al. (1982) *Tetrahedron Lett.* 23:2533 (-COCH₂-); Szelke, M. et al. *European Appln. EP 45665* (1982) CA: 97:39405 (1982)(-CH(OH)CH₂-); Holladay, M. W. et al. (1983) *Tetrahedron Lett.* (1983) 24:4401-4404 (-C(OH)CH₂-); y Hruby, V. J. (1982) *Life Sci.* (1982) 31:189-199 (-CH₂S-). Un enlace no peptídico particularmente preferido es -CH₂NH-. Tales miméticos peptídicos pueden tener ventajas significativas sobre las realizaciones polipeptídicas, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (vida media, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otras. El etiquetado de peptidomiméticos suele implicar la unión covalente de una o varias etiquetas, directamente o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida), a una o varias posiciones no interferentes del peptidomimético que se predicen mediante datos cuantitativos de estructura-actividad y/o modelización molecular. Dichas posiciones no interferentes suelen ser posiciones que no forman contactos directos con el macropolipéptido o los macropolipéptidos a los que se une el peptidomimético para producir el efecto terapéutico. La derivitización (por ejemplo, el etiquetado) de los peptidomiméticos no debe interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del peptidomimético.

[0194] También se incluyen en la presente invención las moléculas pequeñas que pueden modular (ya sea aumentar o inhibir) las interacciones, por ejemplo, entre los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 y sus socios de unión naturales. Las pequeñas moléculas de la presente invención pueden obtenerse utilizando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas paralelas espacialmente direccionables en fase sólida o en fase disolución; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el método de bibliotecas de "una perla, un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas que utilizan selección por cromatografía de afinidad. (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

[0195] Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt et al. (1993) *Proc. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303; Carrell et al. (1994) *Angew.*

Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y en Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233.

[0196] Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421), o en perlas (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 al. (1992) Proc. 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 al. (1990) Proc. Acad. Sci. USA 87:6378-6382); (Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310); (Ladner supra.). Los compuestos pueden analizarse en ensayos celulares o no celulares. Los compuestos pueden analizarse en grupos (por ejemplo, varios compuestos en cada muestra de análisis) o como compuestos individuales. [0197] La invención también se refiere a proteínas quiméricas o de fusión de los biomarcadores de la invención, incluidos los biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de los mismos. Tal como se utiliza en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende uno o más biomarcadores de la invención, incluidos uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o un fragmento de los mismos, unido operativamente a otro polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga al biomarcador respectivo. En una realización preferida, la proteína de fusión comprende al menos una porción biológicamente activa de uno o más biomarcadores de la invención, incluyendo uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmentos de los mismos. Dentro de la proteína de fusión, el término "operativamente vinculado" pretende indicar que las secuencias biomarcadoras y las secuencias no biomarcadoras están fusionadas en el marco entre sí de tal manera que preservan las funciones exhibidas cuando se expresan independientemente de la fusión. Las secuencias "otro" pueden fusionarse al N-terminal o al C-terminal de las secuencias biomarcadoras, respectivamente. [0198] Dicha proteína de fusión puede producirse por 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 una fracción que altere 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 porción de una molécula biológicamente activa (por ejemplo, la porción extracelular del polipéptido o la porción de unión al ligando). El segundo péptido puede incluir una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Cy1 humano o un dominio Cy4 (por ejemplo, las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgCy1 humana, o IgC y4 humana, véase, por ejemplo, Capon et al. Patentes estadounidenses 5.116.964; 5.580.756; 5.844.095 y similares). Dichas regiones constantes pueden conservar las regiones que median la función efectora (por ejemplo, la 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 (es decir, el número de sitios de unión disponibles por polipéptido) alteradas 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 mediante técnicas recombinantes pueden secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contenga la proteína o el péptido. Alternativamente, la proteína o el péptido pueden ser retenidos citoplasmáticamente y las células cosechadas, lisadas y la proteína aislada. Un cultivo celular suele incluir células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la materia. Las proteínas y los péptidos pueden aislarse a partir de medios de cultivo celular, células huésped, o ambos, utilizando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas y péptidos. Las técnicas para transfectar células huésped y purificar proteínas y péptidos son conocidas en la materia.

[0199] Preferiblemente, una proteína de fusión de la invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan entre sí en el marco de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo empleando extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de los extremos cohesivos según proceda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden ser recocidos y reamplificados para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992).

[0200] Las proteínas de fusión Ig particularmente preferidas incluyen la porción de dominio extracelular o dominio similar a región variable de RGMb, PD-L2, PD-1 u otro biomarcador humano enumerado en la Tabla 1, acoplado a una región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, la región Fc). La región constante de la inmunoglobulina puede contener modificaciones genéticas que reduzcan o eliminen la actividad efectora inherente a la estructura de la inmunoglobulina. Por ejemplo, el ADN que codifica la porción extracelular de un polipéptido de interés puede unirse al ADN que codifica las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgGy1 y/o IgGy4 humanas modificadas por mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, como se enseña en WO 97/28267.

[0201] En otra realización, la proteína de fusión contiene una secuencia señal heteróloga en su N-terminal. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamíferos), la expresión y/o secreción de un polipéptido puede incrementarse mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

[0202] Las proteínas de fusión de la invención pueden utilizarse como inmunógenos para producir anticuerpos en un sujeto. Dichos anticuerpos pueden utilizarse para purificar los respectivos polipéptidos naturales a partir de los cuales se generaron las proteínas de fusión, o en ensayos de cribado para identificar polipéptidos que inhiban las interacciones entre uno o más polipéptidos biomarcadores o un fragmento de los mismos y su(s) compañero(s) natural(es) de unión o un fragmento(s) de los mismos.

[0203] También se proporcionan en el presente documento 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 en antisentido o derivados de los mismos, en las que dichos ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos en antisentido o derivados de los mismos en una célula hibridan específicamente (por ejemplo, se unen) en condiciones celulares, con ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, pequeños ARNs no codificantes tales como miARNs, pre-miARNs, primiARNs, miARN*, anti-miARN, un sitio de unión a miARN, una variante y/o variante funcional de los mismos, mARNs celulares o fragmentos de los mismos). En una realización, la expresión de los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de los mismos en una célula puede potenciar o regular al alza una o más actividades biológicas asociadas con los correspondientes ácidos nucleicos pequeños de tipo silvestre, naturales o sintéticos. En otra realización, la expresión de los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de los mismos en una célula puede inhibir la expresión o actividad biológica de ácidos nucleicos y/o proteínas celulares, por ejemplo, inhibiendo la transcripción, traducción y/o procesamiento de ácidos nucleicos pequeños de, por ejemplo, uno o más biomarcadores de la invención, incluyendo uno o más biomarcadores enumerados en la Tabla 1, o fragmento(s) de los mismos. En una realización, los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de los mismos son ARN pequeños (por ejemplo, microARN) o complementos de ARN pequeños. En otra realización, los ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de los mismos pueden ser de cadena simple o doble y tener al menos seis nucleótidos de longitud y 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. En otra realización, una composición puede comprender una biblioteca de ácidos nucleicos que comprenda o sea capaz de expresar ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de los mismos, o conjuntos de dichos ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de los mismos. Un conjunto de ácidos nucleicos puede comprender unos 2-5, 5-10, 10-20, 10-30 o más ácidos nucleicos que comprendan o sean capaces de expresar ácidos nucleicos pequeños u oligonucleótidos antisentido o derivados de los mismos.

[0204] En una realización, la unión puede ser por complementariedad convencional de pares de bases, o, por ejemplo, en el caso de unión a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, "antisentido" se refiere a la gama de técnicas generalmente empleadas en el arte, e incluye cualquier proceso que se base en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

[0205] Es bien conocido en la técnica que se pueden realizar modificaciones en la secuencia de un miARN o un pre-miARN sin interrumpir la actividad del miARN. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "variante funcional" de una secuencia de miARN se refiere a una secuencia de oligonucleótidos que varía de la secuencia natural de miARN, pero que conserva una o más características funcionales del miARN (por ejemplo, inhibición de la proliferación de células cancerosas, inducción de la apoptosis de células cancerosas, aumento de la susceptibilidad de células cancerosas a agentes quimioterapéuticos, inhibición de dianas específicas de miARN). En algunas realizaciones, una variante funcional de una secuencia de 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 aproximadamente un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica al miARN o precursor del mismo en 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 que la variante funcional hibrida con el complemento del miARN o precursor del mismo en condiciones de hibridación estrictas. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobases de una variante funcional es capaz de hibridar con una o más secuencias diana del miARN.

[0206] Los miARNs y sus correspondientes secuencias stem-loop aquí descritas pueden encontrarse en miRBase, una base de datos en línea de secuencias y anotaciones de miARN, disponible en la web microrna.sanger.ac.uk. Las entradas de la base de datos miRBase Sequence representan una porción de horquilla prevista de un transcrito de miARN (el bucle del tallo), con información sobre la ubicación y la secuencia de la secuencia madura de miARN. Las secuencias stem-loop de miARN de la base de datos no son estrictamente miARN precursores (pre-miARN), y en algunos casos pueden incluir el pre-miARN y alguna secuencia flanqueante del presunto transcrito primario. Las secuencias de nucleobase de miARN aquí descritas abarcan cualquier versión del miARN, incluidas 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. La liberación de la base de datos de secuencias puede dar lugar al cambio de nombre de algunos miARN. Una liberación de la base de datos de secuencias puede dar lugar a una variación de la secuencia de un miARN maduro.

- [0207] En algunas realizaciones, las secuencias de miARN de la invención pueden estar asociadas con una segunda secuencia de ARN que puede estar localizada en la misma molécula de ARN o en una molécula de ARN separada de la secuencia de miARN. En tales casos, la secuencia de miARN puede denominarse cadena activa, mientras que la segunda secuencia de ARN, que es al menos parcialmente complementaria de la secuencia de miARN, puede denominarse cadena complementaria. Las cadenas activa y complementaria se hibridan para crear un ARN de doble cadena similar a un precursor de miARN natural. La actividad de un miARN puede optimizarse maximizando la captación de la cadena activa y minimizando la captación de la cadena complementaria por el complejo proteico miARN que regula la traducción génica. Esto puede hacerse mediante la modificación y/o el diseño de la cadena complementaria.
- [0208] En algunas realizaciones, la cadena complementaria se modifica de manera que un grupo químico distinto de un fosfato o hidroxilo en su extremo 5'. La presencia de la modificación 5' elimina aparentemente la captación de la cadena complementaria y favorece posteriormente la captación de la cadena activa por el complejo proteico miARN. La modificación 5' puede ser cualquiera de una variedad de moléculas conocidas en la materia, incluyendo NH₂, NHCOCH₃, y biotina.
- [0209] En otra realización, la captación de la cadena complementaria por la vía del miARN se reduce incorporando nucleótidos con modificaciones de azúcar en los primeros 2-6 nucleótidos de la cadena complementaria. Cabe señalar que estas modificaciones del azúcar pueden combinarse con las modificaciones del terminal 5' descritas anteriormente para potenciar aún más las actividades de los miARN.
- [0210] En algunas realizaciones, la cadena complementaria se diseña de manera que los nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria no sean complementarios a la cadena activa. Esto da lugar a ARN híbridos de doble cadena 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 aumenta la captación de la cadena activa por la vía de los miARN, al tiempo que reduce la captación de la cadena complementaria, lo que aumenta la actividad de los miARN.
- [0211] Las construcciones de ácido nucleico pequeño y/o antisentido de los métodos y composiciones aquí presentados pueden entregarse, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una porción única de ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, ARN pequeños, ARNm y/o ADN genómico). Alternativamente, las pequeñas moléculas de ácido nucleico pueden producir ARN que codifique ARNm, miARN, pre-miARN, pri-miARN, miARN*, anti-miARN, o un sitio de unión a miARN, o una variante de los mismos. Por ejemplo, la selección de plásmidos adecuados para expresar los miARN, los métodos para insertar secuencias de ácido nucleico en el plásmido y los métodos para administrar el plásmido recombinante a las células de interés están dentro de los conocimientos de la materia. Véase, por ejemplo, Zeng et al. (2002), Molecular Cell 9:1327-1333; Tuschl (2002), Nat. Biotechnol. 20:446-448; Brummelkamp et al. (2002), Science 296:550-553; Miyagishi et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500; Paddison et al. (2002), Genes Dev. 16:948-958; Lee et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:500-505; y Paul et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:505-508.
- [0212] Alternativamente, los ácidos nucleicos pequeños y/o las construcciones antisentido son sondas de oligonucleótidos que se generan ex vivo y que, cuando se introducen en la célula, dan lugar a la hibridación con los ácidos nucleicos celulares. Dichas sondas oligonucleotídicas 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 ejemplares para su uso como ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido son los análogos fosforamidato, fosfotioato y metilfosfonato del ADN (véanse también las Patentes EE.UU. 5.176.996; 5.264.564; y 5.256.775). Además, los enfoques generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido han sido revisados, por ejemplo, por Van der Krol et al. (1988) BioTechniques 6:958-976; y Stein et al. (1988) Cancer Res 48:2659-2668.
- [0213] Los enfoques antisentido pueden implicar el diseño de oligonucleótidos (ya sea ADN o ARN) que sean complementarios a los 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 doble cadena, puede analizarse una sola cadena del ADN dúplex, o puede ensayarse la formación de tríplex. La capacidad de hibridación dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico hibridante, más desajustes de bases con un ácido nucleico (por ejemplo, ARN) puede contener y aun así formar un dúplex (o triplex, según el caso) estable. Un experto en la materia puede determinar un grado tolerable de desajuste utilizando procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.
- [0214] Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo, la secuencia no traducida 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar más eficientemente en la inhibición de la traducción. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNm (Wagner, R. (1994) Nature 372:333). Por lo tanto, los oligonucleótidos complementarios a las regiones no codificantes no traducidas 5' o 3' de los

genes podrían utilizarse en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de los 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 codificantes del ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción, pero también podrían utilizarse de acuerdo con los métodos y composiciones aquí presentados. Tanto si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante de los ARNm celulares, los ácidos nucleicos pequeños y/o los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis nucleótidos de longitud, y pueden tener menos de unos 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.

[0215] Independientemente de la elección de la secuencia diana, se prefiere realizar primero estudios in vitro para cuantificar la capacidad del oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión génica. En una realización, estos estudios utilizan controles que distinguen entre la inhibición del gen antisentido y los efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. En otra realización, estos estudios comparan los niveles del ácido nucleico o proteína diana con los de un ácido nucleico o proteína de control interno. Además, se prevé que los resultados obtenidos utilizando el oligonucleótido antisentido se comparen con los obtenidos utilizando 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.

[0216] Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden modificarse en la fracción de base, la fracción de azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc., y pueden incluir otros grupos anexos como péptidos (por ejemplo, para dirigirse a los receptores de la célula huésped) o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; Publicación PCT No. WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT No. WO89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión activados por hibridación. (Véase, por ejemplo, Krol et al. (1988) BioTechniques 6:958-976) o agentes intercalantes. (Véase, por ejemplo, Zon (1988), Pharm. Res. 5:539-549). Con este fin, los ácidos nucleicos pequeños y/o los oligonucleótidos antisentido pueden conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de reticulación desencadenado por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión desencadenado por hibridación, etc.

[0217] Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos una fracción de base modificada que se selecciona del grupo que incluye pero no se limita a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxietil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, 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-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metilester del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-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 pueden comprender al menos una fracción de azúcar modificada seleccionada del grupo que incluye pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

[0218] En ciertas realizaciones, un compuesto comprende un oligonucleótido (por ejemplo, un miARN u oligonucleótido codificante de miARN) conjugado con una o más moléculas que mejoran la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido resultante. En ciertas realizaciones, la fracción es una fracción de colesterol (por ejemplo, antagonistas) o una fracción lipídica o conjugado liposomal. Otras moléculas de conjugación son los hidratos de carbono, los fosfolípidos, la biotina, la fenazina, el folato, la fenantridina, la antraquinona, la acridina, las fluoresceínas, las rodaminas, las cumarinas y los colorantes. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado se une directamente al oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado se une al oligonucleótido mediante una fracción de enlace seleccionada entre amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (por ejemplo, dobles o triples), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), ácido 6-aminohexanoico (AHX o AHA), alquilo C1-C10 sustituido, alqueno C2-C10 sustituido o no sustituido, y alquilo C2-C10 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, un grupo sustituyente se selecciona entre hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

[0219] En ciertas realizaciones de este tipo, el compuesto comprende el oligonucleótido que tiene uno o más grupos estabilizadores que están unidos a uno o ambos extremos del oligonucleótido para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. En los grupos estabilizadores se incluyen las estructuras de tapones. Estas modificaciones terminales protegen al oligonucleótido de la degradación por exonucleasas, y pueden ayudar en la

entrega y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el extremo 5'-terminal (5'-cap), o en el extremo 3'-terminal (3'-cap), o puede estar presente en ambos extremos. Las estructuras de la tapa incluyen, por ejemplo, tapas desoxi abásicos invertidos.

[0220] Las estructuras de tapa adecuadas incluyen un nucleótido 4',5'-metileno, un nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosil), un nucleótido 4'-tio, un nucleótido carbocíclico, un nucleótido 1,5-anhidrohexitol, un nucleótido L, un nucleótido alfa, un nucleótido de base modificada, un enlace fosforoditioato, un nucleótido treo-pentofuranosil, un nucleótido acíclico 3',4'-seco, un nucleótido acíclico 3,4-dihidroxibutil, un nucleótido acíclico 3,5-dihidroxipentilo, una fracción de nucleótido 3'-3'-invertido, una fracción abásica 3'-3'-invertida, una fracción nucleotídica 3'-2'-invertida, una fracción abásica 3'-2'-invertida, un fosfato de 1,4-butanodiol, un 3'-fosforamidato, un hexilfosfato, un aminohexilfosfato, un 3'-fosfato, un 3'-fosforotioato, un fosforoditioato, una fracción de metilfosfonato puente y una fracción de metilfosfonato no puente 5'-aminoalquilfosfato, un 1,3-diamino-2-propilfosfato, 3-aminopropilfosfato, un 6-aminohexilfosfato, un 1,2-aminododecilfosfato, un hidroxipropilfosfato, una fracción de nucleótido 5'-5'-invertida, una fracción abásica 5'-5'-invertida, un 5'-fosforamidato, un 5'-fosforotioato, un 5'-amino, un 5'-fosforamidato puente y/o no puente, un fosforotioato y una fracción de 5'-mercapto.

[0221] Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido también pueden contener un esqueleto neutro similar a un péptido. Estas moléculas se denominan oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14670 y en Eglom et al. (1993) Nature 365:566. Una de las ventajas de los oligómeros de PNA es su capacidad para unirse al ADN complementario independientemente de la fuerza iónica del medio debido a la estructura neutra del ADN. En otra realización, los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido comprenden al menos un esqueleto de fosfato modificado seleccionado del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosforordiamidato, un metilfosfonato, un alquilfosfotriester y un formacetal o análogo de los mismos.

[0222] En otra realización, los ácidos nucleicos pequeños y/o los oligonucleótidos antisentido son oligonucleótidos α -anoméricos. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos específicos de doble cadena con ARN complementario en los que, contrariamente a las unidades β habituales, las cadenas discurren paralelas entre sí (Gautier et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15:6625-6641). El oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15:6131-6148), o un análogo quimérico de RNADNA (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330).

[0223] Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido de los métodos y composiciones aquí presentados pueden sintetizarse por métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (como los disponibles comercialmente en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, los oligonucleótidos de fosforotioato pueden sintetizarse por el método de Stein et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:3209, los oligonucleótidos de metilfosfonato pueden prepararse mediante el uso de soportes poliméricos de vidrio de poro controlado (Sarin et al. (1988) Proc. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc. Por ejemplo, un miARN aislado puede sintetizarse químicamente o producirse recombinantemente mediante métodos conocidos en la técnica. En algunos casos, los miARN se sintetizan químicamente utilizando fosforamiditas ribonucleósidas adecuadamente protegidas y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Entre los proveedores comerciales de moléculas de ARN sintético o reactivos de síntesis se encuentran, por ejemplo, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, Colo., EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, Ill., EE.UU.), Glen Research (Sterling, Va., EE.UU.), ChemGenes (Ashland, Mass., EE.UU.), Cruachem (Glasgow, Reino Unido) y Exiqon (Vedbaek, Dinamarca).

[0224] Los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden administrarse a las células in vivo. Se han desarrollado varios métodos para administrar pequeños ácidos nucleicos y/u oligonucleótidos antisentido de ADN o ARN a las células; por ejemplo, las moléculas antisentido pueden inyectarse directamente en el lugar del tejido, o pueden administrarse sistemáticamente moléculas antisentido modificadas, diseñadas para dirigirse a las células deseadas (por ejemplo, antisentido unido a péptidos o anticuerpos que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados en la superficie de la célula diana).

[0225] En una realización, los ácidos nucleicos pequeños y/u oligonucleótidos antisentido pueden comprender o generarse a partir de ARN interferentes pequeños de doble cadena (siARN), en los que secuencias totalmente complementarias a secuencias de ácidos nucleicos celulares (p. ej., ARNm) median la degradación o en los que secuencias incompletamente complementarias a secuencias de ácidos nucleicos celulares (p. ej., ARNm) median la represión traslacional cuando se expresan dentro de las células. En otra realización, los ARNs bicatenarios pueden procesarse en ARN antisentido monocatenarios que se unen a ARN celulares monocatenarios (p. ej., microARN) e inhiben su expresión. El ARN de interferencia (ARNi) es el proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales y plantas, iniciado por ARN de doble cadena (ARNdc) homólogo en secuencia al gen silenciado. in vivo, el ARNdc largo es escindido por la ribonucleasa III para generar ARNs de 21 y 22 nucleótidos. Se ha demostrado que los dúplex de ARNs de 21 nucleótidos suprimen específicamente la expresión de genes endógenos y heterólogos en diferentes líneas celulares de mamíferos, incluidas las células de riñón embrionario humano (293) y HeLa (Elbashir et al. (2001) Nature 411:494-498). En consecuencia, se puede inhibir la traducción de

un gen en una célula poniéndola en contacto con ARN bicatenario corto que tenga una longitud de entre 15 y 30 nucleótidos o de entre 18 y 21 nucleótidos o de entre 19 y 21 nucleótidos. Alternativamente, se puede introducir en una célula diana un vector que codifique para tales ARNs o ARN de horquilla corta (ARNhc) que se metabolizan en ARNs (véanse, por ejemplo, McManus et al. (2002) RNA 8:842; Xia et al. (2002) Nature Biotechnology 20:1006; y Brummelkamp et al. (2002) Science 296:550). Los vectores que pueden utilizarse están disponibles comercialmente, por ejemplo, en OligoEngine con el nombre pSuper RNAi System™.

[0226] Las moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm celular también pueden utilizarse para impedir la traducción de los ARNm celulares y la expresión de los polipéptidos celulares, o ambos (Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT WO90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver et al. (1990) Science 247:1222-1225 y la Patente de EE.UU. No. 5.093.246). Aunque las ribozimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas pueden utilizarse para destruir ARNm celulares, se prefiere el uso de ribozimas de cabeza de martillo. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden ARNm en lugares dictados por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm objetivo. El único requisito es que el ARNm objetivo tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo es bien conocida en la técnica y se describe con más detalle en Haseloff y Gerlach (1988) Nature 334:585-591. La ribozima puede diseñarse de modo que el sitio de reconocimiento de corte esté situado cerca del extremo 5' de los ARNm celulares; es decir, para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales.

[0227] Las ribozimas de los métodos y composiciones aquí presentados también incluyen endorribonucleasas de ARN (en adelante "ribozimas de tipo Cech") como la que se produce de forma natural en *Tetrahymena thermophila* (conocida como el IVS, o ARN L-19 IVS) y que ha sido descrita ampliamente por Thomas Cech y colaboradores (Zaug, et al. (1984) Science 224:574-578; Zaug, et al. (1986) Science 231:470-475; Zaug, et al. (1986) Nature 324:429-433; solicitud de patente internacional publicada No. WO88/04300 por University Patents Inc.; Been, et al. (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, tras lo cual se produce la escisión del ARN objetivo. Los métodos y composiciones aquí presentados abarcan aquellas ribozimas de tipo Cech que se dirigen a secuencias de sitio activo de ocho pares de bases que están presentes en genes celulares.

[0228] Como en el enfoque antisentido, las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (p. ej., para mejorar la estabilidad, la orientación, etc.). Un método preferido de administración implica el uso de una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un fuerte promotor constitutivo de pol III o pol II, de modo que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajes celulares endógenos e inhibir la traducción. Dado que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular más baja para que sean eficaces.

[0229] Las moléculas de ácido nucleico que se utilizarán en la formación de triple hélice para la inhibición de la transcripción de genes celulares son preferiblemente monocatenarias y compuestas de desoxirribonucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos debería favorecer la formación de triples hélices a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren la presencia de tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Las secuencias de nucleótidos pueden estar basadas en pirimidinas, lo que dará lugar a tripletes TAT y CGC en las tres hebras asociadas de la triple hélice resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases a una región rica en purina de una sola hebra del dúplex en una orientación paralela a esa hebra. Además, pueden elegirse moléculas de ácido nucleico ricas en purinas, por ejemplo, que contengan un tramo de residuos G. Estas moléculas formarán una triple hélice con un dúplex de ADN rico en pares GC, en el que la mayoría de los residuos de purina se encuentran en una sola hebra del dúplex objetivo, lo que da lugar a tripletes CGC en las tres hebras del triplex.

[0230] Alternativamente, las secuencias potenciales a las que se puede apuntar para la formación de la triple hélice pueden incrementarse creando una molécula de ácido nucleico llamada "switchback". Las moléculas Switchback se sintetizan de forma alterna 5'-3', 3'-5', de manera que se emparejan primero con una cadena del dúplex y luego con la otra, eliminando la necesidad de que haya un tramo considerable de purinas o pirimidinas en una cadena del dúplex.

[0231] Los ácidos nucleicos pequeños (p. ej., miARNs, pre-miARNs, pri-miARNs, miARN*, anti-miARN, o un sitio de unión a miARN, o una variante de los mismos), oligonucleótidos antisentido, ribozimas y moléculas de triple hélice de los métodos y composiciones aquí presentados pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Entre ellas se incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidas en la materia como, por ejemplo, la síntesis química de fosforamida en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN pueden generarse por 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 ARN polimerasa adecuados, como los promotores de la polimerasa T7 o SP6. Alternativamente, se pueden introducir de forma estable en líneas celulares

construcciones de ADNc antisentido que sinteticen ARN antisentido de forma constitutiva o inducible, dependiendo del promotor utilizado.

[0232] Además, pueden introducirse varias modificaciones bien conocidas en las moléculas de ácido nucleico para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, entre otras, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de enlaces fosforotioato o 2' O-metil en lugar de fosfodiesterasa dentro de la espina dorsal del oligodesoxirribonucleótido. Un experto en la materia comprenderá fácilmente que los polipéptidos, los ácidos nucleicos pequeños y los oligonucleótidos antisentido pueden unirse además a otro péptido o polipéptido (por ejemplo, un péptido heterólogo), por ejemplo, que sirva como medio de detección de proteínas. Ejemplos no limitantes de péptidos o polipéptidos etiquetados útiles para la detección en la invención incluyen, sin limitación, enzimas adecuadas como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; etiquetas epitópicas, como las etiquetas FLAG, MYC, HA o HIS; fluoróforos, como la proteína verde fluorescente; colorantes; 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, 2ª edición (julio de 1999).

[0233] Los agentes moduladores aquí descritos (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 sola molécula o agente de este tipo o cualquier combinación de agentes descritos en el presente documento. Los "agentes activos únicos" aquí descritos pueden combinarse con otros compuestos farmacológicamente activos ("segundos agentes activos") conocidos en la técnica según los métodos y composiciones aquí proporcionados. Se cree que ciertas combinaciones actúan de forma sinérgica en el tratamiento de afecciones que se beneficiarían de la moldeación de las respuestas inmunitarias. Los segundos agentes activos pueden ser moléculas grandes (por ejemplo, proteínas) o pequeñas (por ejemplo, moléculas sintéticas inorgánicas, organometálicas u orgánicas). Por ejemplo, los anticuerpos anti-RGMb pueden combinarse con anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-CTLA4, etc. y en cualquier combinación de los mismos.

[0234] Ejemplos de agentes activos de molécula grande incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento hematopoyético, citoquinas y anticuerpos monoclonales y policlonales. Los agentes activos típicos de grandes moléculas son las moléculas biológicas, como las proteínas naturales o artificiales. Las proteínas que son particularmente útiles en esta invención incluyen proteínas que estimulan la supervivencia y/o proliferación de células precursoras hematopoyéticas y células poieticas inmunológicamente activas in vitro o in vivo. Otros estimulan la división y diferenciación de progenitores eritroides comprometidos en células in vitro o in vivo. Las proteínas particulares incluyen, pero no se limitan a: interleucinas, como IL-2 (incluyendo IL-II recombinante ("rIL2") e IL-2 canarypox), IL-10, IL-12, e IL-18; interferones, 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.

[0235] Las proteínas particulares que pueden usarse en los métodos y composiciones aquí proporcionados incluyen, pero no se limitan a: filgrastim, que se vende en los Estados Unidos bajo el nombre comercial Neupogen® (Amgen, Thousand Oaks, California); sargramostim, que se vende en los Estados Unidos bajo el nombre comercial Leukine® (Immunex, Seattle, Washington); y EPO recombinante, que se vende en los Estados Unidos bajo el nombre comercial Epogen® (Amgen, Thousand Oaks, California). Las formas recombinantes y mutadas de GM-CSF pueden prepararse como se describe en las Pat. de EE.UU. Nos. 5,391,485; 5,393,870; y 5,229,496. Las formas recombinantes y mutadas de G-CSF pueden prepararse como se describe en las Pat. de EE.UU. Nos. 4,810,643; 4,999,291; 5,528,823; y 5,580,755. III. Métodos de Selección de Agentes que modulan la Activación de las células inmunitarias

[0236] Otro aspecto de la invención se refiere a métodos de selección de agentes (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) que modulan una respuesta inmunitaria modulando la coestimulación, tales como agentes que inhiben o promueven la interacción de RGMb con PD-L2. Dichos métodos utilizan ensayos de cribado, incluidos ensayos celulares y no celulares. 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).

[0237] En una realización, la invención se refiere a ensayos para el cribado de compuestos candidatos o de prueba que se unen a, 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 PDL2. 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 tanto la interacción entre RGMb y PD-L2 como la interacción entre PD-1 y PD-L2. Tales agentes incluyen, sin limitación, anticuerpos, proteínas, proteínas de fusión, pequeñas moléculas y ácidos nucleicos.

[0238] En una realización, un método para identificar un agente que mejora una respuesta inmune implica determinar la capacidad del agente candidato para mejorar la interacción entre RGMb y PD-L2 (por ejemplo, con o sin modular la interacción entre PD-1 y PD-L2).

[0239] En otra realización, un método para identificar un agente para estimular 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 modular la interacción entre PD-1 y PD-L2) y seleccionar un agente que inhiba la interacción entre RGMb y PD-L2. En otra realización, un método para identificar un agente para regular a la baja una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad del agente candidato para potenciar la interacción entre RGMb y PD-L2 (por ejemplo, con o sin modular la interacción entre PD-1 y PD-L2) y seleccionar un agente que potencie la interacción entre RGMb y PD-L2.

[0240] 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 ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo 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 realizarse, por ejemplo, midiendo la unión directa o midiendo un parámetro de activación de las células inmunitarias.

[0241] Por ejemplo, en un ensayo de unión directa, los polipéptidos pueden acoplarse con una etiqueta radioisotópica o enzimática de tal manera que la unión de RGMb y PD-L2 puede determinarse detectando la proteína etiquetada en un complejo. Por ejemplo, los polipéptidos pueden marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , directa o indirectamente, y el radioisótopo puede detectarse por recuento directo de la radioemisión o por recuento por centelleo. Alternativamente, los polipéptidos pueden ser marcados enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la etiqueta enzimática detectada mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

[0242] También está dentro del alcance de esta invención determinar la capacidad de un compuesto para modular la interacción entre RGMb y PD-L2, sin el etiquetado de ninguno de los interaccionantes. Por ejemplo, se puede utilizar un microfisiómetro para detectar la interacción de RGMb y PD-L2 sin etiquetar ninguno de los dos polipéptidos (McConnell, H. M. et al. (1992) Science 257:1906-1912). Tal y como se utiliza en el presente documento, un "microfisiómetro" (por ejemplo, un citosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su entorno utilizando un sensor potenciométrico direccionable por luz (LAPS). Los cambios en esta tasa de acidificación pueden utilizarse como indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

[0243] 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 determinando la actividad de uno o más miembros del conjunto de polipéptidos. Por ejemplo, la actividad de RGMb o PDL2 puede determinarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, actividad tirosina cinasa), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen informador (que comprende un elemento regulador sensible a la diana unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectando una respuesta celular regulada por RGMb y/o PD-L2. La determinación de la capacidad del agente bloqueante para unirse o interactuar con dicho polipéptido puede realizarse, por ejemplo, midiendo la capacidad de un compuesto para modular la coestimulación o inhibición de células inmunitarias en un ensayo de proliferación, o interfiriendo en la capacidad de dicho polipéptido para unirse a anticuerpos que reconocen una porción del mismo. En una realización, se determina la capacidad del compuesto de ensayo 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 citoquinas y modular la proliferación celular. En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo tiene un efecto seleccionado del grupo que consiste en (a) regula al alza la señalización de PD-L2/RGMb y, de ese modo, regula a la baja la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (b) regula a la baja la señalización de PD-L2/RGMb y, de ese modo, regula al alza la fosforilación de ERK 1 o ERK 2; (c) regula al alza la señalización de PD-L2/RGMb y, en consecuencia, regula a la baja la fosforilación de PKC- θ ; d) regula a la baja la señalización de PD-L2/RGMb y, en consecuencia, regula al alza la fosforilación de PKC- θ ; (e) regula al alza la señalización de PD-L2/RGMb y, por tanto, regula al alza la fosforilación de SHP-2; y (f) regula a la baja la señalización de PD-L2/RGMb y, por tanto, regula a la baja la fosforilación de SHP-2.

[0244] FoxP3, ERK1/ERK2, PKC- θ , y SHP-2 son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, FOXP3 interviene en la regulación del desarrollo de células B, células T y células T reguladoras CD25+/CD4+. Se expresa en la leucemia/linfoma de células T en adultos y se utiliza ampliamente como marcador de una población de células T reguladoras (Tregs) que controlan la inmunotolerancia y permiten a las células tumorales evadir la respuesta del huésped (Bignone y Banham (2008) EOB 8:1897-1920). La SHP-2 (también conocida como Syp, SHPTP2, PTP2C, PTPN11, PTP1D y BPTP3) es un miembro de la familia de las tirosinas fosfatasas no de membrana (Patente de

EE.UU. No. 5,589,375 y Patente de EE.UU. No. 5,831,009). La proteína SHP-2 contiene dos dominios de homología src 2 (SH2), regiones conservadas de aproximadamente 100 aminoácidos identificadas originalmente en las proteínas tirosina cinasas Src, que promueven las interacciones proteína-proteína mediante la unión de residuos fosfotirosílicos (Neel, Semin. Cell. Bioi. 4: 419-432 (1993)). Se ha demostrado que estos dos dominios presentan funciones diferenciales en la regulación de la fosfatasa SHP-2 y, en consecuencia, afectan a diferentes vías de señalización. El dominio SH2 N-terminal sirve como dominio regulador y reclutador, produciendo un efecto autoinhibidor a través de interacciones intramoleculares con el dominio fosfatasa catalítico interno. Mientras que el dominio SH2 C-terminal actúa meramente para reclutar otras proteínas para interacciones intermoleculares necesarias para la transducción de señales (Pei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 1141-1145 (1996)). El estado de fosforilación de la molécula SHP-2 regula su actividad fosfatasa. Las proteínas-tirosina fosfatasas, incluidas las fosfatasas que contienen SH2, están muy conservadas entre los eucariotas, desde especies tan diversas como los mamíferos, incluidos los humanos, hasta las levaduras y *Xenopus*. Se ha demostrado que SHP-2 desempeña un papel fundamental en las respuestas inmunológicas aberrantes (por ejemplo, en la respuesta alérgica. (Pazdrak et al., J. Exp. Med. 186: 561-568 (1997)). La fosforilación de SHP-2 es fácilmente detectable por métodos conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, la detección de la movilidad alterada de la molécula SHP-2 en un gel PAGE, ensayos de fosforilación y ensayos que miden la actividad de la molécula SHP-2. La detección de la fosforilación de SHP-2 puede ser directa o indirecta, por ejemplo, mediante la detección de una actividad o evento posterior.

[0245] ERK1 y ERK2 (también conocidas como MAPK1 y MAPK2) son a su vez quinasas (Boulton, et al., Cell 65: 663-675, (1991)). La activación de la molécula ERK se produce a través de la fosforilación en serina/treonina o la fosforilación en tirosina. La inhibición de la activación de ERK 1 y 2 puede resultar de la inhibición de la fosforilación corriente arriba de las moléculas ERK 1 y 2, o puede resultar de la activación de una fosfatasa que desfosforila ERK1 y 2, para reducir la actividad. Se sabe que las proteínas ERK se activan por fosforilación de la molécula MEK, una cinasa de doble especificidad. Tras su activación, ERK1 y ERK2 se trasladan al núcleo, donde pueden fosforilar directamente y activar diversos factores de transcripción, como c-Myc, C/EBP~, p62, TCF/Elk-1, ATF-2 y c-Jun. El estado de fosforilación/activación de las moléculas ERK1 y 2 tras la activación de las células T es un indicador de la señalización a través de PD-1. El profesional experto puede determinar fácilmente el estado de fosforilación/estado de activación de ERK 1 y 2 mediante ensayos fácilmente disponibles en la materia. Por ejemplo, el estado de fosforilación de las moléculas ERK1 y 2 puede determinarse utilizando un anticuerpo específico para la forma fosforilada de las proteínas p42/44 ERK1/2 (fosfo-Thr202/Tyr204 específico), varios de los cuales están disponibles comercialmente. Alternativamente, el estado de fosforilación de las moléculas ERK1 y 2 puede determinarse por su movilidad en un gel, utilizando un anticuerpo que reconozca ERK1 y 2, independientemente del estado de fosforilación) para su identificación. Alternativamente, el estado de activación de ERK1 y 2 puede determinarse ensayando la actividad cinasa de las moléculas ERK1 y 2. La determinación del estado de fosforilación/activación de ERK1 y 2 también puede realizarse por métodos indirectos, por ejemplo, la detección de una actividad o evento corriente abajo.

[0246] Las isoenzimas PKC juegan un papel 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 lugar a la activación transcripcional de un constructo impulsado por el promotor de la interleucina-2 (Baier et al., Eur. J Biochem. 225: 195-203(1994)), lo que indica que la PKC-θ desempeña un papel en las vías de señalización de las células T. También se ha demostrado que la PKC-θ se activa en el curso de la activación de células T mediada por receptores de células T, y esta activación se correlaciona con la translocación de la molécula PKC-θ a la membrana plasmática en el sitio de contacto APC (Patente de EE.UU. No. 6,040,152). La PKC-θ también se ha implicado en otros procesos celulares, incluida la apoptosis (Datta et al., J Biol. Chem. 272: 20317-20320 (1997)), la disposición del citoesqueleto (Pietromonaco et al., J Biol. Chem. 273: 7594-7603 (1998); Simons et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 253: 561-565 (1998)), proliferación (Passalacqua et al., Biochem. J 337: 113-118 (1999)), y angiogénesis y reparación de heridas (Tang et al., J Biol. Chem. 272: 28704- 25 28711 (1997)). El estado de fosforilación refleja el estado de activación de la molécula PKC-θ con fosforilación indicando activación. El profesional experto puede determinar fácilmente el estado de fosforilación/estado de activación o PKC-θ mediante ensayos fácilmente disponibles en la técnica. Por ejemplo, el estado de fosforilación de la molécula PKC-θ puede determinarse utilizando un anticuerpo específico para la forma fosforilada de la proteína PKC-θ (por ejemplo, anti-fosfo T538), que está disponible comercialmente. Alternativamente, el estado de fosforilación de la molécula PKC-θ puede determinarse por su movilidad en un gel, utilizando para la detección un anticuerpo que reconozca la PKC-θ (independientemente del estado de fosforilación). Alternativamente, el estado de activación de PKC-θ puede determinarse ensayando la actividad quinasa de la molécula PKC-θ (Kupfer et al., Patente de EE.UU. No. 6.040.152), o ensayando la translocación a la membrana en el punto de contacto APC (Kupfer et al., Patente de EE.UU. No. 6.040.152). La determinación del estado de fosforilación/activación de la PKC-θ también puede realizarse por métodos indirectos, por ejemplo, la detección de una actividad o evento corriente abajo.

[0247] Los agentes que potencian las interacciones entre RGMb y PD-L2 o bloquean o inhiben la interacción de PD-L2 con un receptor coestimulador pueden identificarse por su capacidad de inhibir la proliferación de células inmunitarias, y/o la función efectora, o de inducir anergia, deleción clonal, y/o agotamiento cuando se añaden a un

ensayo in vitro. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en presencia de un agente que estimule la transducción de señales a través de un receptor activador. Se pueden emplear varias lecturas reconocidas de la activación celular para medir la proliferación celular o la función efectora (por ejemplo, producción de anticuerpos, producción de citocinas, fagocitosis) en presencia del agente activador. La capacidad de un agente de ensayo para bloquear esta activación puede determinarse fácilmente midiendo la capacidad del agente para provocar una disminución de la proliferación o de la función efectora que se está midiendo, utilizando técnicas conocidas en la materia.

[0248] Por ejemplo, los agentes de esta invención pueden probarse para la capacidad de inhibir o mejorar la coestimulación en un ensayo de células T, como se describe en Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027 y Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261. Las células T CD4+ pueden aislarse de PBMC humanas y estimularse con anticuerpos activadores anti-CD3. La proliferación de las células T puede medirse mediante la incorporación de timidina 3H. Un ensayo puede realizarse con o sin coestimulación de CD28 en el ensayo. Pueden realizarse ensayos similares con células T Jurkat y blastos PHA de PBMC.

[0249] Alternativamente, los agentes de la presente invención pueden ser probados para la capacidad de modular la producción celular de citoquinas que son producidas por o cuya producción es aumentada o inhibida en células inmunes en respuesta a la modulación de la actividad de 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, las células T pueden estimularse con éster de forbol, anticuerpo anti-CD3 o preferiblemente antígeno en asociación con una molécula MHC de clase II, y recibir una señal coestimuladora, por ejemplo, por una forma estimuladora del antígeno de la familia B7, por ejemplo por una célula transfectada con ácido nucleico que codifica un polipéptido B7 y que expresa el péptido en su superficie o por una forma soluble y estimuladora del péptido. Las citocinas conocidas liberadas en el medio pueden identificarse mediante ELISA o por 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, Genzyme (Cambridge, MA) dispone de un kit ELISA para la IL-4, así como de un anticuerpo bloqueante de la IL-7. Los anticuerpos bloqueantes contra IL-9 e IL-12 están disponibles en Genetics Institute (Cambridge, MA). A continuación, se puede determinar el efecto de estimular o bloquear la interacción de RGMb y PD-L2 en el perfil de citocinas. Un ensayo de coestimulación de células inmunitarias in vitro como el descrito anteriormente también puede utilizarse en un método para identificar citocinas nuevas que pueden modularse mediante la modulación de la actividad de RGMb/PD-L2. Por ejemplo, si una actividad particular inducida tras la coestimulación, por ejemplo, la proliferación de células inmunitarias, no puede inhibirse mediante la adición de anticuerpos bloqueantes de citoquinas conocidas, la actividad puede ser el resultado de la acción de una citoquina desconocida. Tras la coestimulación, esta citoquina puede purificarse del medio por métodos convencionales y su actividad puede medirse por su capacidad para inducir la proliferación de células inmunitarias. Para identificar las citocinas que pueden desempeñar un papel en la inducción de la tolerancia, puede utilizarse un ensayo de coestimulación de células T in vitro como el descrito anteriormente. En este caso, las células T recibirían la señal de activación primaria y entrarían en contacto con una citoquina seleccionada, pero no recibirían la señal coestimuladora. Tras lavar y poner en reposo las células inmunitarias, se les volvería a enviar una señal de activación primaria y una señal coestimuladora. Si las células inmunitarias no responden (por ejemplo, proliferan o producen citocinas), se han tolerado y la citocina no ha impedido la inducción de la tolerancia. Sin embargo, si las células inmunitarias responden, la citocina ha impedido la inducción de la tolerancia. Las citocinas capaces de impedir la inducción de tolerancia pueden bloquearse in vivo junto con reactivos que bloqueen los antígenos de los linfocitos B como medio más eficaz de inducir tolerancia en receptores de trasplantes o sujetos con enfermedades autoinmunes.

[0250] En otra realización más, un ensayo de la presente invención es un ensayo libre de células para el cribado de compuestos que modulan la unión de PD-L2 a RGMb que comprende poner en contacto una proteína PD-L2 o RGMb, o porción biológicamente activa de la misma, con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la unión entre la proteína PD-L2 o RGMb, o porción biológicamente activa de la misma. La unión del compuesto de ensayo puede determinarse directa o indirectamente, como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida, el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido, o la porción biológicamente activa del mismo, con su compañero de unión para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con el polipéptido en la mezcla de ensayo, donde determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente al polipéptido o a la porción biológicamente activa del mismo, en comparación con el compañero de unión.

[0251] Por ejemplo, RGMb y PD-L2 pueden utilizarse para formar una mezcla de ensayo y la capacidad de un polipéptido para bloquear esta interacción puede ensayarse determinando la capacidad de RGMb para unirse a PD-L2 mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. En algunas realizaciones, ya sea para ensayos basados en células o libres de células, el compuesto de ensayo puede ensayarse además para determinar si afecta a la unión y/o actividad de la interacción entre PD-1 y PD-L2. Otros métodos útiles de análisis de la unión incluyen el uso del Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real (Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Tal y como se utiliza aquí,

"BIA" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin etiquetar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR) pueden utilizarse como indicación de reacciones en tiempo real entre polipéptidos biológicos. Los polipéptidos de interés se pueden inmovilizar en un chip BIAcore y se pueden probar múltiples agentes (anticuerpos bloqueantes, proteínas de fusión, péptidos o pequeñas moléculas) para ver si se unen al polipéptido de interés. Un ejemplo de utilización de la tecnología BIA es el descrito por Fitz et al. (1997) Oncogene 15:613.

[0252] Los ensayos libres de células de la presente invención se prestan al uso de formas de proteínas solubles y/o unidas a membranas. En el caso de ensayos libres de células en los que se utiliza una proteína de forma unida a la membrana (por ejemplo, una RGMb o PD-L2 de la superficie celular) puede ser deseable utilizar un agente solubilizante tal que la forma unida a la membrana de la proteína se mantenga en solución. Ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos como el n-octilglucósido, ndodecilglucósido, n-dodecilmaltosido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecitopoli (éter de etilenglicol)n, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]-1-sulfonato de propano (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamminio]-2-hidroxi-1-sulfonato de propano (CHAPSO), o N-dodecil=N,N-dimetil-3-ammonio-1-sulfonato de propano.

[0253] En una o más realizaciones de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser deseable inmovilizar cualquiera de los polipéptidos para facilitar la separación de las formas complejas de las no complejas de una o ambas proteínas, así como para facilitar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a un polipéptido puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de estos recipientes son las placas de microtitulación, los tubos de ensayo y los tubos de microcentrifuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión del polipéptido glutatión-S-transferasa/RGMb, o las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/objetivo, pueden adsorberse en perlas de sefarsa glutatión (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o en placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que luego se combinan con el compuesto de ensayo, y la mezcla se incuba en condiciones propicias para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Tras la incubación, las microesferas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz inmovilizada en el caso de las microesferas, complejo determinado directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz y determinarse el nivel de unión o actividad del polipéptido mediante técnicas estándar.

[0254] 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 como se describió anteriormente para ensayos basados en células, como por ejemplo determinando la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de un polipéptido que funciona corriente abajo del polipéptido. Por ejemplo, pueden determinarse los niveles de segundos mensajeros, la actividad del polipéptido interactivo sobre una diana adecuada, o la unión del interactor a una diana adecuada, como se ha descrito anteriormente.

[0255] Esta invención se refiere además a nuevos agentes identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente. En consecuencia, está dentro del alcance de esta invención utilizar además un agente identificado como se describe en el presente documento en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un agente identificado como se describe en el presente documento puede utilizarse en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, un agente identificado como se describe en el presente documento puede utilizarse en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, esta invención se refiere a los usos de nuevos agentes identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente para los tratamientos descritos en el presente documento. IV. Composiciones farmacéuticas

[0256] Los agentes que modulan (por ejemplo, inhiben o promueven) la interacción de RGMb y PD-L2, con o sin bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L2, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos bloqueantes, péptidos, proteínas de fusión o moléculas pequeñas, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Tales composiciones comprenden típicamente el anticuerpo, el péptido, la proteína de fusión o la molécula pequeña y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También pueden incorporarse a las composiciones compuestos activos suplementarios.

[0257] Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen la parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un

diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede presentarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

[0258] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida hasta el punto de que se pueda jeringar fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse 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 como el manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0259] Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados 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 la liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estérilmente.

[0260] Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden presentarse en cápsulas de gelatina o comprimidos. Para fines de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trozos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un portador fluido para su uso como enjuague bucal, en el que el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se enjuaga y expectorado o tragado. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, troques y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente como almidón o lactosa, un agente desintegrador como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

[0261] Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas como el dióxido de carbono, o un nebulizador.

[0262] La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes adecuados a la barrera que se desea permeabilizar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la materia.

[0263] Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

[0264] En una realización, los agentes moduladores se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de entrega microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, como el etilvinilacetato, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres y el ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones deberían ser evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también

pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) también pueden utilizarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense No. 4,522,811.

[0265] Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención es dictada por, y directamente dependiente en, las características únicas del compuesto activo, el efecto terapéutico particular para ser logrado, y las limitaciones inherentes en el arte de componer tal un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

[0266] La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque se pueden utilizar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al lugar del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

[0267] Los datos obtenidos de los ensayos en cultivos celulares y los estudios en animales pueden utilizarse en la formulación de una gama de dosis para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

[0268] Los agentes moduladores descritos anteriormente pueden administrarse en forma de ácidos nucleicos expresables que codifican dichos agentes. Tales ácidos nucleicos y composiciones en las que están contenidos, también están incluidos en la presente invención. 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 al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del 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 que se incrusta el vehículo de administración génica. Alternativamente, cuando el vector de administración de genes completo pueda producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, el preparado farmacéutico puede incluir una o más células que produzcan el sistema de administración de genes.

[0269] Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con las instrucciones de administración. V.

Usos y Métodos de la Invención

[0270] Los agentes moduladores descritos en el presente documento pueden utilizarse de acuerdo con una serie de métodos relacionados con la modulación de la interacción entre RGMb y PD-L2 y la correspondiente modulación (por ejemplo, regulación al alza o a la baja) de las respuestas inmunitarias. 1.

Métodos Profilácticos

[0271] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o condición asociada con una respuesta inmune no deseada o menos que deseable. Los sujetos con riesgo de padecer una enfermedad que se beneficiarían del tratamiento con los agentes o métodos reivindicados pueden identificarse, por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la materia. La administración de un agente profiláctico puede producirse antes de la manifestación de síntomas asociados a una respuesta inmunitaria no deseada o menos que deseable. El agente apropiado utilizado para el tratamiento (por ejemplo, anticuerpos, péptidos, proteínas de fusión o moléculas pequeñas) puede determinarse en función de las

indicaciones clínicas y puede identificarse, por ejemplo, mediante ensayos de cribado descritos en el presente documento.

2. Métodos Terapéuticos

5 [0272] Otro aspecto de la invención se refiere a métodos terapéuticos para modular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, modulando la interacción entre RGMb y PD-L2.

10 [0273] Los métodos moduladores de la presente invención implican el contacto de una célula con un agente que modula la interacción entre RGMb y PD-L2. Anteriormente se han descrito agentes ejemplares que modulan la interacción entre RGMb y PD-L2. Por ejemplo, un agente que modula la actividad del polipéptido RGMb o PD-L2 incluye un ácido nucleico o una molécula proteica, una molécula diana natural de la proteína RGMb o PD-L2 (por ejemplo, PD-1, BMP-2, BMP-4, receptores BMP), un anticuerpo anti-RGMb o anti-PD-L2, agonistas o antagonistas de RGMb o PD-L2 (por ejemplo, molécula de ácido nucleico antisentido, oligonucleótido triplex y ribozimas), un peptidomimético de un agonista o antagonista de RGMb o PD-L2, agonistas o antagonistas de ácido nucleico de la expresina o actividad de RGMb o PD-L2, u otra molécula pequeña.

15 [0274] 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 triplex, una ribozima o un vector recombinante para la expresión de una proteína RGMb o PD-L2.

20 [0275] Estos agentes moduladores pueden administrarse in vitro (por ejemplo, poniendo en contacto la célula con el agente) o, alternativamente, in vivo (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tal, la presente invención se refiere a métodos de tratamiento de un individuo afectado por una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la modulación de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, mediante la modulación de la interacción entre RGMb y PD-L2.

3. Regulación a la baja de las Respuestas Inmunes mediante la Modulación de las Interacciones RGMb/PD-L2

25 [0276] Existen numerosas realizaciones de la invención para aumentar la función inhibidora resultante de la interacción de RGMb con PD-L2 para, de este modo, regular a la baja las respuestas inmunitarias (p. ej., agentes que promueven la unión de PD-L1 a RGMb). La regulación a la baja puede adoptar la forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria ya en curso, o puede implicar la prevención de la inducción de una respuesta inmunitaria. Las funciones de las células inmunitarias activadas pueden inhibirse regulando a la baja las respuestas de las células inmunitarias, o induciendo una anergia específica en las células inmunitarias, o ambas cosas.

30 [0277] En una realización de la invención, la tolerancia se induce contra antígenos específicos coadministrando 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, se puede inducir tolerancia a proteínas específicas. En una realización, se pueden inhibir las respuestas inmunitarias a alérgenos (por ejemplo, alérgenos alimentarios) o a proteínas extrañas frente a las que no se desea una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los pacientes que reciben Factor VIII suelen generar anticuerpos contra este factor de coagulación. La administración conjunta de un agente que potencie una señal inhibidora mediada por RGMb/PD-L2 en combinación con el factor VIII recombinante (o por unión física al factor VIII, por ejemplo, mediante reticulación) puede dar lugar a una modulación a la baja. De manera similar, se puede inducir una reducción de la eliminación clonal y/o un aumento del agotamiento (por ejemplo, agotamiento de células T).

40 [0278] En otra realización, los métodos de tratamiento pueden utilizar además agentes que bloquean una actividad de las vías costimuladoras, como la de otros antígenos de linfocitos B como B7-1, B7-2 o B7-3) para reducir aún más las respuestas inmunitarias. Dos agentes distintos que modulan a la baja las respuestas inmunitarias pueden combinarse en una única composición o administrarse por separado (simultánea o secuencialmente) para regular a la baja de forma más eficaz las respuestas inmunitarias mediadas por células inmunitarias en un sujeto. Además, una cantidad terapéuticamente activa de uno o más de los agentes en cuestión, puede utilizarse junto con otros reactivos downmodulating para influir en las respuestas inmunes. Ejemplos de otros reactivos inmunomoduladores incluyen, sin limitación, 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 CD40, o contra citocinas), proteínas de fusión (por ejemplo, CTLA4-Fc), y fármacos inmunosupresores, (por ejemplo, rapamicina, ciclosporina A o FK506).

50 [0279] La regulación a la baja 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 (EICH), o en enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple, la alergia, un trasplante, , la respuesta de hipersensibilidad, un trastorno que requiera una mayor producción o función de células T CD4+, un trastorno que requiera una mayor eficacia de la vacunación, un trastorno que requiera una mayor producción o función de células T reguladoras, y un trastorno que requiera una mayor eficacia de la vacunación. Por ejemplo, el bloqueo de

la función de las células inmunitarias reduce la destrucción de tejidos en los trasplantes. Normalmente, en los trasplantes de tejidos, el rechazo del trasplante se inicia a través de 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 el presente documento antes o en el momento del trasplante puede promover la generación de una señal inhibidora. Además, la inhibición también puede ser suficiente para anergizar las células inmunitarias, induciendo así la tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia a largo plazo evita la necesidad de administrar repetidamente estos reactivos bloqueantes.

[0280] La modulación a la baja de las respuestas inmunitarias también es útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Muchos trastornos autoinmunes son el resultado de una activación inadecuada de células inmunitarias reactivas contra el tejido propio que favorecen la producción de citoquinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. La prevención de la activación de las células inmunitarias autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. La administración de los agentes aquí descritos es útil para prevenir la generación de autoanticuerpos o citoquinas que puedan estar implicados en el proceso de la enfermedad. Además, los agentes que promueven una función inhibidora mediada por la interacción entre RGMB y PD-L2 pueden inducir una tolerancia antígeno-específica de las células inmunitarias autoreactivas, lo que podría conducir a un alivio a largo plazo de la enfermedad. La eficacia de los reactivos para prevenir o aliviar los trastornos autoinmunitarios puede determinarse utilizando varios modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Algunos ejemplos son la encefalitis autoinmune experimental murina, el lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o ratones híbridos NZB, la artritis autoinmune murina por colágeno, la diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB, y la miastenia gravis experimental murina (véase, por ejemplo, Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, Tercera Edición 1993, capítulo 30).

[0281] La inhibición de la activación de las células inmunitarias también es útil terapéuticamente en el tratamiento de la alergia y las reacciones alérgicas, por ejemplo, inhibiendo la producción de IgE. Las reacciones alérgicas pueden ser de naturaleza sistémica o local, dependiendo de la vía de entrada del alérgeno y del patrón de depósito de IgE en mastocitos o basófilos. Así, la inhibición de las respuestas alérgicas mediadas por células inmunitarias (por ejemplo, a los alimentos) a nivel local o sistémico mediante la administración de un agente descrito en el presente documento que promueve una función inhibidora mediada por RGMB y PD-L2.

[0282] La inhibición de la activación de células inmunes también puede ser importante terapéuticamente en infecciones parasitarias y virales de células inmunes. Por ejemplo, en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la replicación vírica se ve estimulada por la activación de las células inmunitarias. La modulación de estas interacciones puede inhibir la replicación viral y, por tanto, mejorar el curso del SIDA. La modulación de estas interacciones también puede ser útil para favorecer el mantenimiento del embarazo. Las mujeres con riesgo de aborto espontáneo (por ejemplo, las que han sufrido previamente un aborto espontáneo o las que han tenido dificultades para concebir) debido al rechazo inmunológico del embrión o el feto pueden ser tratadas con agentes que modulen estas interacciones.

[0283] La regulación a la baja de una respuesta inmune mediante la modulación de la interacción entre RGMB y PD-L2 también puede ser útil en el tratamiento de un ataque autoinmune de tejidos autólogos. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención modular afecciones exacerbadas por el ataque autoinmune, como trastornos autoinmunes, así como afecciones como enfermedades cardíacas, infarto de miocardio y aterosclerosis.

4. Regulación a la alta de las Respuestas Inmunes mediante la Modulación de las Interacciones RGMB/PD-L2

[0284] Los agentes descritos en el presente documento también se pueden utilizar para aumentar las respuestas inmunitarias. En una realización, el bloqueo de la interacción entre RGMB y PD-L2 resulta en el aumento de una respuesta inmunitaria. La estimulación de las respuestas inmunitarias puede consistir en potenciar una respuesta inmunitaria existente o en provocar una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, la potenciación de una respuesta inmunitaria mediante las composiciones y métodos objeto de estudio es útil en el tratamiento del cáncer, una enfermedad infecciosa (por ejemplo, bacterias, virus o parásitos), una infección parasitaria, el asma asociada a una alteración de la tolerancia de las vías respiratorias, una enfermedad neurológica y una enfermedad inmunosupresora.

[0285] Trastornos infecciosos ejemplares incluyen enfermedades virales de la piel, tales como Herpes o culebrilla, en cuyo caso tal agente puede ser administrado tópicamente a la piel. Además, las enfermedades víricas sistémicas, como la gripe, el resfriado común y la encefalitis, podrían aliviarse mediante la administración sistémica de dichos agentes. En una realización preferida, los agentes que estimulan la respuesta inmunitaria descritos en el presente documento son útiles para modular el equilibrio arginasa/iNOS durante la infección por Trypanosoma cruzi con el fin de facilitar una respuesta inmunitaria protectora contra el parásito.

[0286] Alternativamente, las respuestas inmunitarias pueden mejorarse en un paciente infectado mediante un enfoque ex vivo, por ejemplo, extrayendo células inmunitarias del paciente, poniendo en contacto las células inmunitarias in vitro con un agente que module la interacción entre RGMB y PD-L2 y reintroduciendo las células inmunitarias estimuladas in vitro en el paciente.

[0287] En ciertos casos, puede ser deseable administrar además otros agentes que aumenten la respuesta inmunitaria, por ejemplo, formas de otros miembros de la familia B7 que transducen señales a través de receptores coestimuladores, con el fin de aumentar aún más la respuesta inmunitaria.

5 [0288] Los agentes que estimulan una respuesta inmune pueden usarse profilácticamente en vacunas contra varios polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos derivados de patógenos). La inmunidad contra un patógeno (por ejemplo, un virus) puede inducirse mediante la vacunación con una proteína vírica junto con un agente que estimule la respuesta inmunitaria, en un adyuvante apropiado.

[0289] En otra realización, la regulación o mejora de una función de respuesta inmune, como se describe aquí, es útil en la inducción de inmunidad tumoral.

10 [0290] En otra realización, la respuesta inmune puede ser estimulada por los métodos aquí descritos, de tal manera que se supere la tolerancia preexistente, la delección clonal y/o el agotamiento (por ejemplo, el agotamiento de células T). Por ejemplo, las respuestas inmunitarias contra antígenos contra los que un sujeto no puede montar una respuesta inmunitaria significativa, p. ej., contra un antígeno autólogo, como los antígenos específicos de un tumor, pueden inducirse administrando los agentes apropiados descritos en el presente documento que regulan la respuesta inmune.

15 En una realización, puede coadministrarse un antígeno autólogo, como un antígeno específico de tumor. En otra realización, se puede estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno (por ejemplo, un antígeno autólogo) para tratar un trastorno neurológico. En otra realización, los agentes en cuestión pueden utilizarse como adyuvantes para potenciar las respuestas a antígenos extraños en el proceso de inmunización activa.

20 [0291] En una realización, las células inmunitarias se obtienen de un sujeto y se cultivan ex vivo en presencia de un agente como el descrito en el presente documento, para ampliar la población de células inmunitarias y/o mejorar la activación de las células inmunitarias. En una realización posterior, las células inmunitarias se administran a un sujeto. Las células inmunitarias pueden estimularse in vitro, por ejemplo, proporcionando a las células inmunitarias una señal de activación primaria y una señal coestimuladora, como se conoce en la materia. También pueden utilizarse diversos agentes para coestimular la proliferación de células inmunitarias. En una realización, las células inmunitarias se

25 cultivan ex vivo según el método descrito en la solicitud PCT No. WO 94/29436. El polipéptido costimulador puede ser soluble, estar unido a una membrana celular o a una superficie sólida, como una perla.

[0292] En otra realización, los agentes descritos en el presente documento útiles para la regulación de respuestas inmunitarias pueden vincularse o unirse operativamente a toxinas mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, reticulación o mediante técnicas de ADN recombinante. Dichos agentes pueden provocar la destrucción

30 celular de las células deseadas. En una realización, una toxina puede conjugarse con un anticuerpo, como un anticuerpo biespecífico. Dichos anticuerpos son útiles para dirigirse a una población celular específica, por ejemplo, utilizando un marcador que sólo se encuentra en un determinado tipo de célula, por ejemplo, una célula que exprese RGMb y/o PD-L2. La preparación de inmunotoxinas es, en general, bien conocida en el arte (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. Nos. 4,340,535, y EP 44167). Se conocen numerosos tipos de enlaces disulfuro que pueden emplearse

35 con éxito para conjugar la fracción de toxina con un polipéptido. En una realización, se prefieren los enlazadores que contienen un enlace disulfuro que está "obstaculizado" estéricamente, debido a su mayor estabilidad in vivo, evitando así la liberación de la fracción de toxina antes de la unión en el lugar de acción. Se conoce una amplia variedad de toxinas que pueden conjugarse con polipéptidos o anticuerpos de la invención. Algunos ejemplos son: numerosas toxinas útiles derivadas de plantas, hongos o incluso bacterias, que, a modo de ejemplo, incluyen varias toxinas de

40 cadena A, en particular la ricina de cadena A, proteínas inactivadoras de ribosomas como la saporina o la gelonina, α -sarcina, aspergilina, restrictocina, ribonucleasas, como la ribonucleasa placentaria, angiogénica, toxina diftérica y exotoxina de *Pseudomonas*, etc. Una fracción de toxina preferida para su uso en relación con la invención es la cadena A de toxina que ha sido tratada para modificar o eliminar residuos de carbohidratos, cadena A desglicosilada. (Pat. de EE.UU. 5,776,427). La infusión de uno o una combinación de tales agentes citotóxicos (por ejemplo, fusiones de ricina)

45 en un paciente puede provocar la muerte de las células inmunitarias.

V. Administración de Agentes

[0293] Los agentes inmunomoduladores de la invención se administran a los sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración farmacéutica in vivo, para potenciar o suprimir las respuestas inmunitarias

50 mediadas por células inmunitarias. Por "forma biológicamente compatible adecuada para la administración in vivo" se entiende una forma de la proteína que se va a administrar en la que cualquier efecto tóxico se ve compensado por los efectos terapéuticos de la proteína. El término "sujeto" incluye a los organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, los mamíferos. Ejemplos de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. La administración de un agente tal como se describe en el presente documento puede realizarse en cualquier forma farmacológica que incluya una cantidad terapéuticamente activa de

55 un agente solo o en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

[0294] La administración de una cantidad terapéuticamente activa de la composición terapéutica de la presente invención se define como una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un agente puede variar en función de factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del péptido para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas al día o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

[0295] Los agentes o la invención aquí descritos pueden administrarse de manera conveniente, como por inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica o administración rectal. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse de un material para protegerlo de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, para la administración de agentes, por vías distintas a la parenteral, puede ser deseable recubrir el agente con, o coadministrar el agente con, un material para prevenir su inactivación.

[0296] Un agente puede administrarse a un individuo en un portador, diluyente o adyuvante apropiado, coadministrado con inhibidores enzimáticos o en un portador apropiado como liposomas. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones tampón acuosas. Adyuvante se utiliza en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto inmunoestimulante como el interferón. Los adyuvantes aquí contemplados incluyen resorcinolos, tensioactivos no iónicos como el polioxietileno oleil éter y el n-hexadecil polietileno éter. Entre los inhibidores enzimáticos se encuentran el inhibidor de la tripsina pancreática, el diisopropilfluorofosfato (DEEP) y el trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Sterna et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

[0297] El agente también puede administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados pueden contener un conservante para evitar la proliferación de microorganismos.

[0298] Las composiciones farmacéuticas de agentes adecuados para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la composición será preferiblemente estéril y deberá ser fluida hasta el punto de que se pueda jeringar fácilmente. Preferiblemente, será estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conservará frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse 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 como el manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0299] Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando un agente de la invención (por ejemplo, un anticuerpo, péptido, proteína de fusión o molécula pequeña) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados 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 la liofilización, que producen un polvo del agente más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estérilmente.

[0300] Cuando el agente está convenientemente protegido, como se ha descrito anteriormente, la proteína puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Tal como se utiliza en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse a las composiciones compuestos activos suplementarios.

[0301] Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La "Forma unitaria de dosificación", tal como se utiliza aquí,

se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas farmacéuticas de la invención están dictadas por, y dependen directamente de, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe conseguirse, y (b) las limitaciones inherentes al arte de componer dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

[0302] En una realización, un agente de la invención es un anticuerpo. Tal como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo (es decir, una dosis eficaz) oscila entre aproximadamente 0,001 y 30 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,01 y 25 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg, 2 y 9 mg/kg, 3 y 8 mg/kg, 4 y 7 mg/kg, o 5 y 6 mg/kg de peso corporal. El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero no limitándose a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, 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 un intervalo de entre 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre 3 y 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante 4, 5 o 6 semanas. También se apreciará que la dosis efectiva de anticuerpo utilizada para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo de un tratamiento concreto. Los resultados de las pruebas diagnósticas pueden dar lugar a cambios en la posología.

[0303] La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

EJEMPLOS

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

A. Ratones

[0304] Los ratones BALB/cJ de tipo salvaje (WT), los ratones BALB/cByJ y los ratones C57BL/6 se adquirieron en el Jackson Laboratory. Se han descrito ratones PD-L2 KO sobre fondo BALB/c (Keir et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26:677-704). Se utilizaron ratones DO11.10 transgénicos con TCR de OVA como donantes de células T CD4+ específicas de OVA (Tsitoura et al. (1999) J. Immunol. 163:2592-2600). Se utilizaron ratones hembras de la misma edad, de 6 a 12 semanas. Los protocolos con animales fueron aprobados por los Comités de Cuidado y Uso de Animales del Hospital Infantil de Boston, el Instituto Oncológico Dana-Farber y la Facultad de Medicina de Harvard.

B. Células y medios de cultivo

[0305] Las células de la línea celular 300 pre-B de ratón fueron transfectadas por electroporación con ADNc de mRGMb o hRGMb en el vector de expresión pEFGFPuro. Las células se seleccionaron en medios con puomicina, se clasificaron y se subclonaron. La expresión en la superficie celular de mRGMb y hRGMb se verificó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal mRGMb (I+D) y un mAb hRGMb (I+D), respectivamente. Otras células transfectadas, como 300-mPD-L2, 300-mPDL1, 300-mPD-1 y JurkathPD-1, se han realizado previamente utilizando el mismo método. Las células se cultivaron en RPMI-1640 (Mediatech) suplementado con 10% de FBS inactivado por calor (Invitrogen), 1% de estreptomycin/penicilina, 15 mg/ml de gentamicina (Invitrogen), 1% de glutamax (Invitrogen) y 50mM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) a 37°C con 5% de CO₂.

[0306] Las líneas celulares aquí utilizadas se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC), excepto la SN12C que se obtuvo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI).

[0307] Las células de bazo o LN de ratón para los experimentos de tolerancia se cultivaron en DMEM de alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% de FBS, 1% de glutamax, 50 mM de β -mercaptoetanol a 37°C en un incubador con 10% de CO₂.

C. Clonación de la expresión de RGMb en células COS

[0308] Un panel de bibliotecas de expresión de ADNc de linfocitos activados murinos se transfectó transitoriamente en células COS utilizando DEAE-Dextran o Lipofectamine como facilitador (Freeman et al. (1989) J. Immunol. 143:2714-2722). Después de 44 horas, se cosecharon las células COS y se colocaron en placas de Petri recubiertas con mPD-L2-mIgG2a/IgA. Se recuperó el ADN episomal y se electroporó en E. coli DH10B/P3. La fusión de esferoplastos se utilizó para reintroducir los plásmidos en células COS para posteriores rondas de expresión y panificación. Antes de la segunda y tercera rondas, se eliminaron las células COS que expresaban PD-1 mediante incubación con PD-1 mAb seguida de depleción con microesferas magnéticas IgG de cabra antirrata. Tras la tercera ronda de panificación, se

transfectaron plásmidos individuales en células COS y se verificó la unión de PD-L2-Ig a RGMb mediante citometría de flujo en células COS transfectadas transitoriamente con mRGMb. Se aislaron al menos cuatro clones independientes de ADNc de mRGMb.

D. Generación de anticuerpos

- 5 [0309] Las ratas fueron inmunizadas 3 veces mediante inyección intramuscular e intravenosa del ADNc del plásmido mRGMb (Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261-268), y reforzadas 3 veces con mRGMb-HIS recombinante (I+D) mediante inyección i.p. y s.c. Los sobrenadantes de hibridoma se analizaron por citometría de flujo en 300 células transfectadas con mRGMb o por ELISA en placas recubiertas con mRGMb recombinante (I+D). Los hibridomas se subclonaron para conseguir estabilidad y los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo
- 10 mediante cromatografía de afinidad con proteína G, y se verificó que tenían 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 aquí descritos. Además, la Tabla 2 proporciona un resumen de las capacidades de bloqueo de varios anticuerpos monoclonales mRGMb y mPD-L2.

Tabla 2: Capacidad de bloqueo de los mAbs mRGMb y mPD-L2

15

Anticuerpos	mRGMb a mPD-L2	mPD-L2 a mPD-1	mRGMb a mBMP-2/4
mRGMb mAbs			
307.9D1, 307.8B2	Si	N.A.	Si
307.1H6, 307.9D3, 307.5G1	No	N.A.	No
mPD-L2 mAbs			
GF17.2C9	Si	No	N.A.
3.2, Ty25	Si	Si	N.A.

N.A.: No aplicable

- 20 [0310] Finalmente, la Tabla 3 proporciona secuencias para el anticuerpo monoclonal aislado RGMb 9D1 de rata anti-ratón/anti-humano. Brevemente, se ha secuenciado el dominio variable de las cadenas ligera y pesada del mAb 9D1 y se han proporcionado los dominios de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las mismas. La numeración se muestra según las posiciones de los ácidos nucleicos y los correspondientes residuos de aminoácidos, correspondientes a las CDR, por ejemplo, pueden identificarse fácilmente basándose en las traducciones proporcionadas.

Tabla 3: Secuencias de mAb 9D1

Secuencias de ADN y Aminoácidos de la Cadena ligera 9D1 variable (VK)			
LOCUS	9D1_LS-VK	378 bp	ADN
DEFINICIÓN	9D1, ADN 378 bases.		
CARACTERÍSTICAS			
		Ubicación/Calificadores	
	J_segmento	349..378/ etiqueta =JK	
	V_segmento	325..348/ etiqueta =CDR3	
	V_región	229..324/ etiqueta =FWR3	
	V_segmento	208..228/ etiqueta =CDR2	
	V_región	163..207/etiqueta=FWR2	
	V_segmento	130..162/etiqueta=CDR1	
	V_región	61..129/ etiqueta =FWR1	
	sig_peptido	1..50/mifkey="93"/etiqueta=LS	
	CDS	1..378/etiqueta=9D1LS-VK	
/ traducción "MMAVQLDGLLILCLRAKCDIQKTSFSLSAFVGRKVT LSGRYSQNIYNTLNWYKGLGKAPKLLIYTFSLQKIPSRPSGSGCQDYLIT ESLQPEQVATFCQKTSQNTFGGNTXLEK"			
RECUENTO DE ORIGEN BASE			
	100a	91 c	88 g
	1 atgataagctg cagttcagct attaaggctt ttctgtctt gcttcaggc catgaaatgtt 61 gacatccaga tgaaccagtc tctctccacc ctgtccagat ctgtgggaga cagagtcact 101 ctccagctgc agtaagctc gaattattac agttacttac actgttatca gcaaaaactt 141 ggagaagctc caaaactctt gatattattac aaagctttt tgaaaacggg catccagctc 181 aggttcagtg gaattgggac tgggtacagac tacacacaca caaccagcag ccttcagcct 221 gaagatgty caacatact ctgcacagag tattatagcg gttgagctc cgttgaggc 261 accaagctgg aattgaaa		
			95 t
Secuencias de ADN y Aminoácidos de la Cadena pesada 9D1 variable			
LOCUS	9D1_LS-VH	408 bp	ADN
DEFINICIÓN	9D1, ADN		
CARACTERÍSTICAS			
		Ubicación/Calificadores	
	J_segmento	376..408/label =JH	
	V_segmento	352..375/label=CDR3	
	V_región	256..351/label=FWR3	
	V_segmento	205..255/label=CDR2	
	V_región	163..204/label=FWR2	
	V_segmento	146..162/label=CDR1	
	V_región	88..147/label=FWR1	

(continuación)

Secuencias de ADN y Aminoácidos de la Cadena pesada 2D1 variable

seq. péptido

1..67 / etiqueta=LS

CD8 1..408 / etiqueta=2D1LS-VH

/ traducción = "MGRQIILELVAATTCVNSQVQIQDSOTELVKEIGSSVRLS
 CRASDPTSDVNHRIQDQSGCLNIGIWIYPCNHHKYNQXKFGAATLTADKS
 ESTAYQLSLITSDYAVIFCARQFESGIFDYNQSNMIVSS"

RECuento DE ORIGEN BASE 107 a 97 c 108 g 98 t

1 atggggttga gacagatcat tctctttttg ttggcagaaa ctactgtgtt cccctcccag
 61 gacagctac accaatcagg gctcgaactg gtgaagcttg gttcttcagt gaactctctc
 121 tgcaggout ctggggacac ctccacccagt gactatgtgc acgggataag gacgagcct
 181 gaaagtggc ttgagtggat tgggtgggtt tatctctgaa atggtataac taagtacaa
 241 caaagtctg atggggaagg acacactcact gcagaaact cctcagagac agctatcttg
 301 cagctcagc tctctgcatc ttgggactat gcagtcctat tctgtgcag acgacgagag
 361 gattactctg attacttggg caaaggagtc atggtacag tctctctca

E. Generación de proteínas de fusión Ig

[0311] Las proteínas de fusión mRGMb-Ig se generaron uniendo el dominio extracelular de mRGMb a la porción Fc de la proteína IgG2a de ratón, mutada para reducir la unión al FcR (Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261-268).

- 5 Las proteínas de fusión mPD-L2- hlgG1/IgA se generaron uniendo el dominio extracelular de PD-L2 con la porción Fc de hlgG1 y la cola de hlgA. Las proteínas de fusión Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos de células CHO mediante cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G y se verificó que presentaban niveles de endotoxinas inferiores a 2 EU/mg de proteína. Otras proteínas de fusión Ig utilizadas se han descrito anteriormente (Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261-268).

10 F. Ensayo de conjugación celular

[0312] Se desarrolló un ensayo para la unión receptor-ligando basado en la unión célula a célula determinada por citometría de flujo. Un tipo de célula transfectada se marcó con el colorante rojo PKH26 (Sigma) y la otra célula transfectada con el colorante verde PKH67 (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Las células marcadas con colorante rojo y verde (105 de cada tipo) se incubaron en 200 ml de tampón HBSS sin calcio ni magnesio (GIBCO)

suplementado con 10% de FBS inactivado por calor (Invitrogen), 15 mg/ml de gentamicina (Invitrogen) y 1% de HEPES (Invitrogen) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 45 min a 37°C. Cuando se utilizó el ensayo de conjugación celular para comprobar la capacidad de bloqueo de los anticuerpos, un tipo de células transfectadas se preincubó 30 min a RT con anticuerpos antes de añadir el otro tipo de células transfectadas. La formación de conjugados se analizó inmediatamente mediante citometría de flujo utilizando el canal PE para el colorante rojo y el canal FITC para el colorante verde. Se utilizó el recolector de placas automatizado FACSCanto (BD Biosciences) para lograr la uniformidad del procesamiento celular. Los ajustes del instrumento fueron los siguientes, modo de rendimiento: estándar, ajustes del cargador: caudal de muestra a 0,5 ml/segundo, volumen de muestra y volumen de mezcla a 100 ml, velocidad de mezcla a 50 ml/segundo, número de mezclas a 2 y volumen de lavado a 400 ml.

10 G. Citometría de flujo

[0313] Las células se tiñeron con anticuerpos diana y controles de isotipo utilizando procedimientos estándar de citometría de flujo, y se analizaron en un FACSCanto (BD Biosciences) y el software FlowJo 9.2 (TreeStar).

15 [0314] Para verificar inicialmente la expresión de RGMb en células transfectadas con mRGMb o hRGMb, se utilizaron 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 mg/ml.

20 [0315] Para probar las especificidades de unión de los anticuerpos mRGMb, se incubaron 300 células transfectadas con mRGMb o hRGMb con diluciones seriadas de sueros, sobrenadantes de cultivos o anticuerpos purificados, y luego se detectó la unión con 5mg/ml de IgG-PE de cabra antirrata (SouthernBiotech). Para el mAb 9D1 mRGMb conjugado con biotina, se utilizó 1,4 mg/ml de estreptavidina-PE.

25 [0316] Para el ensayo de unión receptor-ligando, las células 300 transfectadas con mRGMb o hRGMb y las células control (células 300 y células T Jurkat transfectadas con hPD-1) se tiñeron con diluciones seriadas de mPD-L2-hlgG1/IgA o control-hlgG1/IgA más 5 mg/ml de Fab2 anti-hlgG-PE de cabra (absorbido por ratón, SouthernBiotech), o con diluciones seriadas de mPD-L1-mIgG2a o control-mIgG2a más 10 mg/ml de anti-mIgG2a-PE de cabra (SouthernBiotech). Se transfectaron 300 células mPD-L2 y se tiñeron 300 células con diluciones seriadas de mRGMb-mIgG2a o control-mIgG2a más 5 mg/ml de anti-mIgG2a-PE de cabra Fab2 (SouthernBiotech).

[0317] Para evaluar la expresión en la superficie celular de RGMb y PD-L2 en las líneas celulares de ratón RAW264.7, J774.1 y C2C12, se utilizó mAb 9D1 mRGMb conjugado con PE, mAb TY25 mPD-L2 o IgG2a de rata a 5 mg/ml; las líneas celulares RAW264.7 y J774.1 se preincubaron con mAb de receptor Fc de ratón (2.4G2).

30 [0318] Para analizar la expresión de la superficie celular de RGMb en líneas celulares de cáncer humano, se utilizó mRGMb mAb 1H6 o rata IgG2a a 10 mg/ml más cabra anti-rata IgG-PE (SouthernBiotech) a 5 mg/ml.

35 [0319] 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. Tras la preincubación con mAb de receptor Fc de ratón (2.4G2), se tiñeron las células para detectar marcadores de superficie con diferentes combinaciones de los siguientes anticuerpos (BioLegend): CD3-Pacific Azul, CD4-PE-cy7, CD8-aloficocianina (APC), CD19-PE-cy7, CD11c-APC y F4/80-APC. A continuación, las células se permeabilizaron utilizando el kit de fijación/permeabilización BD Cytotfix/Cytoperm™. Se utilizó PBS con un 3% de BSA y un 0,1% de Triton X-100 para el lavado y la incubación de anticuerpos en los siguientes procedimientos. Si se utilizaban anticuerpos conjugados con biotina, la biotina endógena se bloqueaba con el kit Endogenous Biotin-Blocking (Molecular Probes), según las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron con mRGMb mAb 9D1 conjugado con PE o IgG2a de rata a 5 mg/ml, o mRGMb mAb 9D1 conjugado con biotina o IgG2a de rata a 2,5 mg/ml más estreptavidina-PE o -APC (BD Biosciences) a 1 mg/ml tras preincubación con receptor Fc mAb de ratón (2.4G2) y hlgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Para la tinción de Foxp3 se utilizaron reactivos de fijación/permeabilización de Foxp3 de eBioscience y Foxp3-PE (BioLegend). 300 y células transfectadas con mPD-L2 300 se utilizaron como controles negativos.

45 [0320] Las células T DO11.10 se identificaron mediante tinción con TCRβ-APC-eFluor 780, CD4-PerCP y KJ1-26-APC (eBio-science). Las células Treg DO11.10 se identificaron utilizando CD25-FITC (BioLegend), seguido de tinción intracelular con Foxp3- PE como se ha descrito anteriormente.

H. ELISA

50 [0321] Para examinar la especificidad de los mAbs mRGMb, placas de 96 pocillos fueron recubiertas con 2 mg/ml de mRGMaHIS recombinante, mRGMb-HIS, o mRGMc-HIS (R&D). A continuación, se añadieron diluciones seriadas de mAbs mRGMb y controles de isotipo y se incubaron durante 1 hora (h) a 37°C. Para la detección se utilizó IgG de ratón antirrata (y-específica)-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 1:2500.

[0322] Para examinar la interacción RGMa/RGMb/RGMc y PD-L2, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos con 2 ó 5 mg/ml de mRGMa-HIS recombinante, mRGMb-HIS, mRGMc-HIS, o hRGMb-HIS (I+D). A continuación, se añadieron diluciones seriadas de las proteínas de fusión mPD-L2- hlgG1/IgA, mPD-L2-mIgG2a/IgA, hPD-L2-mIgG2a o control-Ig y se incubaron durante 1h a 37°C. Para la detección se utilizó anti-hlgG-HRP de cabra Fab2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) o anti-mIgG2a-HRP de rata (BD Biosciences) a 1:1000 o 1:10000.

[0323] Para probar las capacidades de los anticuerpos mRGMb y las proteínas de fusión mPD-L2 para bloquear la unión de RGMb a BMP-2/4, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos con 1 mg/ml de BMP-2 de ratón recombinante (GIBCO) o BMP-4 (R&D). Los anticuerpos mRGMb, los controles de isotipo, mPD-L2-hlgG1/IgA, mPD-L2-mIgG2a/IgA, o las proteínas de fusión Ig de control a las concentraciones indicadas se preincubaron con 20 mg/ml de mRGMb-HIS (I+D) durante 45 min. a 4°C, después se añadieron a las placas y se incubaron durante 1h a 37°C. Para la detección se utilizó anti-penta-HIS-HRP (Qiagen) a 1:1000.

[0324] Para determinar si RGMb se une a PD-L2 y BMP-2/4 simultáneamente, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos con BMP2/4 como se indicó anteriormente. Las proteínas de fusión mPD-L2-hlgG1/IgA, mPD-L2-hlgG (I+D), mPD-L1-hlgG (I+D) o control-Ig a 10 mg/ml se preincubaron con 10 mg/ml mRGMb-HIS (I+D) o tampón solo durante 15 min. a temperatura ambiente (TA), luego se añadieron a las placas y se incubaron durante 1h a 37°C. Alternativamente, 10 mg/ml mRGMb-HIS (R&D) o tampón solo se añadió primero a las placas y se incubó durante 1h a 37°C. Después del lavado, se añadieron las proteínas de fusión mPD-L2-Ig o control-Ig y se incubaron durante 1h a 37°C. Para la detección se utilizó anti-hlgG-HRP de cabra Fab2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 1:10000.

[0325] El sustrato para HRP fue TMB microwell peroxidase substrate system (KPL).

I. Aislamiento y estimulación celular

[0326] Las células del bazo y del timo se aislaron mediante disrupción mecánica de los tejidos. Los esplenocitos se trataron con tampón de lisis de hematíes (Sigma).

[0327] Para obtener células pulmonares para citometría de flujo y western blotting o para analizar DCs esplénicas, se digirieron trozos de tejido pulmonar o esplénico en RPMI 1640 con 5% FBS, 1 mg/ml de colagenasa IV (Sigma) y 200 U/ml de DNasa I (Roche) y luego se trataron con tampón de lisado de glóbulos rojos (Sigma).

[0328] Los macrófagos alveolares pulmonares y los macrófagos intersticiales para el análisis Western blot se clasificaron por citometría de flujo basándose en su expresión diferencial de F4/80 y CD11c (F4/80+CD11c+ para macrófagos alveolares y F4/80+ CD11c para macrófagos intersticiales), como se describió previamente en Bedoret et al. (2009) J. Clin. Invest. 119:3723-3738.

[0329] Los macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato para Western blotting se obtuvieron de ratones BALB/c el día 4 después de la inyección i.p. con tioglicolato al 3% (DIFCO).

[0330] Las células CD4+ y CD8+ para Western blotting se purificaron a partir de esplenocitos de ratón utilizando el kit de aislamiento de células T CD4+ y el kit de aislamiento de células T CD8+ (Miltenyi Biotec Inc.).

[0331] Los esplenocitos estimulados con FLT-3L se obtuvieron de ratones 2 semanas después de la inyección s.c. de la línea tumoral RENCA transfectada con FLT-3L.

[0332] Se prepararon células T activadas estimulando esplenocitos o timocitos con mAb CD3 2C11 recubierto en placa (BD Biosciences) a 10 mg/ml y/o mAb CD28 soluble 37.51 (BD Biosciences) a 1 mg/ml durante 6 días, luego se lavaron y se volvieron a estimular con mAb CD3 recubierto en placa (10 mg/ml) solo o junto con mAb CD28 soluble (1 mg/ml) durante 2 días. Las células de los días 1 y 3 tras la estimulación primaria y del día 2 tras la estimulación secundaria se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real Taqman o citometría de flujo.

J. RT-PCR en tiempo real Taqman

[0333] Las muestras de ARN total se aislaron utilizando el mini kit RNeasy (QIAGEN). La transcripción inversa se realizó con el kit de transcripción inversa Quantitect (QIAGEN). Se utilizaron ensayos de expresión génica Taqman (Applied Biosystems) para mRGMb (Mm00724273_m1), mPD-L2 (Mm00451734_m1), mPD-1 (Mm00435532_m1) y el control endógeno GAPDH de ratón (Mm99999915_g1) en la PCR en tiempo real realizada en un sistema 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems). El cambio de pliegues en comparación con GAPDH se calculó mediante el método $\Delta\Delta Ct$.

K. Transferencia de tipo Western

[0334] Se prepararon lisados celulares utilizando tampón RIPA con pastillas inhibidoras de proteínas cOmplete ULTRA (Roche). Los lisados (60-80 mg/l para líneas celulares y células primarias y 0,5 o 1 mg/l para células 300 transfectadas con RGMb) se pasaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y se realizó Western blot utilizando mRGMb mAb

1H6 de rata (10 mg/ml) más IgG-HRP de cabra antirrata (Santa Cruz Biotechnology) (1:5000). Para seccionar el control de carga, las membranas se trataron con Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) y se secaron con ratón anti-ratón β -actina (Abcam) (1:5000) más cabra anti-ratón IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) (1:4000). Las bandas de proteínas en las membranas se visualizaron mediante técnicas quimioluminiscentes estándar.

5 L. Tinción inmunohistoquímica y microscopía confocal

[0335] Las células se sembraron en cubreobjetos en medio de cultivo el día anterior a la tinción. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS que contenía 0,5% de BSA, las células se permeabilizaron en PBS que contenía 0,5% de BSA y 0,5% de Triton X-100 durante 30 minutos. La biotina endógena se bloqueó con Endogenous Biotin-Blocking kit (Molecular Probes), según las instrucciones del fabricante, seguido de bloqueo en PBS que contenía 3% de BSA y 0,1% de Triton X-100 durante 30 min a temperatura ambiente y tres lavados en PBS que contenía 0,5% de BSA y 0,1% de Triton X-100. A continuación, las células se incubaron con mRGMb mAb 1H6 conjugado con biotina o con IgG2a de rata conjugada con biotina a 0,5 mg/ml en PBS que contenía 1% de BSA y 0,1% de Triton X-100 durante dos horas a temperatura ambiente, seguido de tres lavados como se ha indicado anteriormente. Posteriormente, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 0,5 mg/ml en PBS que contenía 1% de BSA y 0,1% de Triton X-100 durante una hora a temperatura ambiente, seguida de tres lavados como se ha indicado anteriormente. Por último, las células se tiñeron con Phalloidin-TRIC (Sigma) a 50 mg/ml para marcar la F-actina, y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje. Las imágenes se tomaron utilizando 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

[0336] Para inducir tolerancia, ratones WT BALB/cByJ o PD-L2^{-/-} ligeramente anestesiados recibieron 100 mg de OVA libre de LPS (Worthington Biochemical) en PBS o PBS solo (control) por instilación intranasal en los días 0, 1 y 2. En algunos experimentos, los ratones fueron tratados con RGMb, PD-L2, PD-L1, o PD-1 mAb bloqueante o anticuerpo de control i.p. el día -1 (400 mg/ratón) y el día 2 (200 mg/ratón). El día 12, se inmunizó a los ratones con 50 mg de OVA (ICN Biomedical) adsorbido en 2 mg de alumbre. Los bazo se cosecharon el día 19 y los esplenocitos o los esplenocitos B agotados (Figura 8D) se volvieron a estimular in vitro con OVA. Los cultivos se pulsaron con 1 mCi de 3H-timidina durante las últimas 17 horas y se cosecharon a las 96 horas. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron a las 96 horas para el ELISA de IL-4.

N. Transferencia de células T DO11.10 y tolerancia respiratoria

[0337] Las células T DO11.10 se seleccionaron positivamente a partir del bazo de ratones DO11.10 Tg incubándolas con microesferas magnéticas CD4⁺ y clasificándolas mediante columnas MACS (Miltenyi Biotec Inc.). Cada receptor recibió 2 3105 o 5 3106 células T DO11.10 i.v. seguidas de tres dosis intranasales de 100 mg de OVA libre de LPS en los días 0, 1, 2 y mAbs como se indica. Las células de los LN mediastínicos se analizaron mediante citometría de flujo en los días 3, 5 ó 7.

O. Análisis Estadístico

[0338] Se realizaron pruebas t de Student de dos colas y ANOVA de dos vías seguidas de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o Dunnett utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para MacOS X, GraphPad Software, La Jolla California EE.UU. (disponible en la World Wide Web en graphpad.com. $p < 0,05$ se consideró significativo. Los datos son media $\pm$ SEM.

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

[0339] RGMb, también conocido como DRAGON, es un miembro de la familia RGM que consiste en RGMa, RGMb y RGMc/hemojuvelina (Severyn et al. (2009) Biochem J. 422:393-403). Las RGM son proteínas de membrana ancladas al glicosilfosfatidilinositol (gpi) que se unen a las proteínas morfogénicas óseas (BMP) y a la neogenina (Conrad et al. (2010) Mol. Cell Neurosci. 43:222-231). Las BMP constituyen una familia con más de 20 miembros relacionados con la familia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Bragdon et al. (2011) Cell Signal. 23:609-620 y Yoshioka et al. (2012) Eur. J. Immunol. 42:749-759). RGMb se une directamente a BMP-2 o BMP-4, que a su vez se unen a receptores de tipo I (ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6) y receptores de tipo II (BMPRII, ActRIIa y ActRIIb) (Corradini et al. (2009) Cytokine Growth Factor Rev. 20:389-398 y Yoshioka et al. (2012) Eur. J. Immunol. 42:749-759). Los RGM coordinan la utilización de receptores BMP específicos (Corradini et al. (2009) Cytokine Growth Factor Rev. 20:389-398). Los RGM no señalizan directamente pero pueden actuar como correceptores (por ejemplo, RGMb se une directamente a BMP-2/4) que modulan la señalización de BMP (Samad et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:14122-14129).

[0340] RGMb se expresa y funciona en el sistema nervioso (Severyn et al., 2009). Además, la expresión de RGMb se observa en macrófagos y otras células del sistema inmunitario (Xia et al., 2010). La función de la RGMb en el sistema inmunitario está empezando a emerger (Galligan et al., 2007; Xia et al., 2010). Los ratones deficientes en RGMb presentan un fenotipo letal precoz.

[0341] Así, se determinó si PD-L1 interactúa con RGMb. Las células del tipo "célula 300.19" transfectadas con RGMb de ratón (mRGMb), también denominadas "células 300-mRGMb", expresan la proteína RGMb y son capaces de unirse a las proteínas de fusión mPD-L2-Ig, pero no a la proteína de fusión mPD-L1-Ig ni a otras proteínas de fusión Ig relacionadas con la familia B7, según se determinó mediante análisis de citometría de flujo (Figuras 1A-1C). De forma similar, las células transfectadas con mPD-L2 también se unen a la proteína de fusión mRGMb-Ig (Figuras 1D-1E). Las células del tipo celular 300 transfectadas con RGMb humana (hRGMb) también se unen a la proteína de fusión Ig mPD-L2 (Figuras 1F-1G).

[0342] Los análisis de ensayo inmunoenzimático (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). Así pues, la interacción 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).

[0343] Para probar la interacción RGMb:PD-L2 en condiciones más fisiológicas, se utilizó un ensayo de conjugación celular en el que un tipo de célula transfectada se marcó con un colorante rojo y el otro tipo de célula transfectada con un colorante verde. La unión de los dos tipos de células se evaluó mediante citometría de flujo y se indicó mediante eventos doblemente positivos (puntos amarillos). En las Figuras 1K, 1M, 1O y 1Q, el panel superior muestra los gráficos FSC-SSC y el panel inferior los gráficos de puntos correspondientes. Las figuras 1L, 1N, 1P y 1R muestran sólo los gráficos de puntos sin los correspondientes gráficos FSC-SSC. Como era de esperar, 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 tanto a las células mPD-L2 como a las mPD-L1 (Figuras 1M-1N). Los ensayos de unión de control negativo presentaron 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 RGMb y PD-L2 de superficie celular a superficie celular.

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

[0344] 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 (véanse, por ejemplo, las Figuras 2A-2F). Los datos ELISA muestran que los anticuerpos anti-mRGMb se unen a mRGMb, pero no a mRGMa o mRGMc (Figura 2G).

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

[0345] Se utilizó un ensayo de conjugación celular para probar las capacidades de bloqueo de anticuerpos y 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.

[0346] La Figura 3A muestra las capacidades de bloqueo de anticuerpos anti-mRGMb ejemplares. 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.

[0347] Las Figuras 3B y 3C muestran las capacidades de bloqueo de los anticuerpos anti-PD-L2. En concreto, el anticuerpo anti-PD-L2 2C9 bloqueó la unión de mRGMb a mPD-L2, pero no la de mPD-1 a mPD-L2. Por el contrario, los anticuerpos anti-PD-L2 3.2, TY25 y MIH37 bloquearon tanto la unión de mRGMb a mPD-L2 como la de mPD-1 a mPD-L2. Por último, el anticuerpo anti-PD-L2 4H3 no bloqueó ni la unión de mRGMb a mPD-L2 ni la de mPD-1 a mPD-L2. La existencia de mAbs de PD-L2 bloqueantes simples y dobles indica que los sitios de unión de PD-1 y RGMb en PD-L2 son próximos pero distintos.

[0348] Las Figuras 3D y 3E muestran que mPD-1-Ig redujo la unión de mRGMb a mPD-L2, mientras que mRGMb-Ig no tuvo efecto en 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.

[0349] Como RGMb se une directamente a BMP-2/4, se analizó la capacidad de los anticuerpos RGMb para bloquear la unión de RGMb a BMP2/4. 9D1 y 8B2 bloquearon la unión de RGMb a BMP-2/4 en un ELISA (Figuras 3F-3G) y, por tanto, son bloqueantes 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 (Figura 3F-3G). Estos datos indican que los sitios de unión en RGMb para PD-L2 y BMP son cercanos pero distintos.

[0350] También se determinó si el anticuerpo anti-PD-L2 bloqueador único 2C9 se une a un epítipo diferente 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 de TY25.

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

[0351] Para probar si RGMb puede unir 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 a BMP-2/4 inmovilizada en presencia o ausencia de RGMb. PD-L2 no podía unirse directamente a BMP-2/4, pero en presencia de RGMb podía formar un complejo con BMP cuando RGMb y PD-L2-Ig se añadían simultáneamente (Figuras 4A-4B) o secuencialmente a BMP-2/4. Estos datos son consistentes con que RGMb tiene sitios 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.

[0352] Estos datos concuerdan con los resultados de otros estudios, incluyendo Corradini et al. (2009) Cytokine Growth Factor Rev. 20:389-98 y Yoshioka et al. (2012) Eur. J. Immunol. 42:749-59, en los que se propone aquí que existe un complejo de señalización que implica las interacciones de RGMb, PD-L2, BMP-2/4 y receptores BMP de tipo I y tipo II (Figura 4C, panel izquierdo). Los dímeros de BMP-2 o BMP-4 unen el RGMb a los receptores BMP de tipo I, que a su vez reclutan receptores BMP de tipo II que fosforilan a los receptores BMP de tipo I en un complejo de señalización. El complejo fosforila Smad1/5/8 o la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 y la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), lo que conduce a la transcripción del gen diana aguas abajo. El panel derecho de la Figura 4C muestra la unión de PD-L2 a PD-1, que provoca la fosforilación en tirosina del dominio citoplasmático de PD-1, el reclutamiento de tirosina fosfatasas, en particular SHP-2, y la atenuación de las señales del receptor de antígeno. Así pues, PD-L2, que puede unirse tanto a PD-1 como a RGMb, puede participar en dos importantes circuitos de señalización, las vías de señalización PD-1 y BMP.

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

[0353] El ARNm de RGMb se ha descrito en macrófagos pulmonares de ratón, en la línea celular de macrófagos RAW264.7 y en la línea celular de mioblastos C2C12 (Xia et al. (2010) J. Immunol. 186:1369-1376), pero no se determinó la expresión proteínica. La expresión de ARNm de RGMb se confirmó en las líneas celulares de macrófagos de ratón RAW264.7 y J774.1 mediante RT-PCR en tiempo real (Figura 5A) y la expresión de la superficie celular de la proteína RGMb se demostró en estas líneas celulares mediante citometría de flujo utilizando RGMb mAb 9D1 (Figura 5B).

[0354] La expresión de la proteína RGMb también fue confirmada por transferencia tipo Western usando RGMb mAb 1H6. Se detectaron una banda mayor (~37kD) y una banda menor (~49 Kilodaltons (kD)) en células RAW264.7, J774.1 y C2C12, así como en células 300 transfectadas con mRGMb (Figuras 5C-5D). No se observaron bandas de este tipo en 300 células (Figura 5C), lo que concuerda con la ausencia de ARNm de RGMb (Figura 5A). La transferencia tipo Western demostró la expresión de RGMb en macrófagos peritoneales de ratón y en macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato (Figura 5E), así como en macrófagos alveolares e intersticiales de pulmón (Figura 5F). El mAb 1H6 también detectó RGMb humano mediante Western blotting en células 300 transfectadas con hRGMb y células T Jurkat humanas (Figura 5C).

[0355] La Figura 5G muestra cómo la escisión proteolítica de RGMb explica estas múltiples bandas de proteína. RGMb contiene una porción de un dominio tipo D del factor von Willebrand (vWF) con un sitio de corte proteolítico entre Asp171 y Pro172. Tras la escisión, los dos fragmentos de RGMb permanecen unidos por enlace(s) disulfuro. Se prevé que el peso molecular de la RGMb sin escindir sea de 40 kD y que la RGMb escindida tenga fragmentos N-terminal y C-terminal de 13 kD y 27 kD, respectivamente. Cada fragmento tiene un sitio de glicosilación ligado al N previsto, lo que debería aumentar el peso molecular de cada fragmento en 5-10 kD. El mAb 1H6 reacciona con un epítipo en el fragmento C-terminal y reconoce la forma escindida de 37 kD así como la forma no escindida de 49 kD. El análisis de la transferencia tipo Western muestra que la mayor parte de la RGMb nativa es la forma escindida.

Ejemplo 7: Superficie celular y expresión intracelular de RGMb por líneas celulares de cáncer humano

[0356] Estudios anteriores han informado de la presencia de RGMb en células tumorales de mama y próstata (Li et al. (2012) Int. J. Oncol. 40:544-550 y Li et al. (2012) J. Cell Biochem. 113:2523-2531). Se demostró que tanto RGMb como PD-L2 se expresaban en la superficie celular de las líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-231, SKBR-3 y MCF-7, en la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H226, así como en la línea celular de cáncer renal humano SN12C, mediante análisis de citometría de flujo (Figura 6A). Estos resultados de expresión se confirmaron mediante Western blot (Figura 6B). La localización de RGMb en células SKBR-3 mediante microscopía confocal mostró cantidades sustanciales de RGMb en el interior de la célula, aunque es detectable en la superficie

celular (Figura 6C). Esto concuerda con un estudio inmunohistoquímico de Li et al. (2012) *Int. J. Oncol.* 40:544-550 que muestra RGMb principalmente en el citoplasma de las células tumorales de próstata.

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

[0357] RT-PCR en tiempo real y Western blot mostraron expresión de RGMb en células de bazo, timo y pulmón, así como en células T CD4+ y CD8+ esplénicas purificadas de ratones ingenuos (Figuras 7A-7B). Sin embargo, la expresión de RGMb en la superficie celular no fue detectable mediante citometría de flujo con PE o RGMb mAb 9D1 conjugado con biotina. Los niveles de ARNm y proteína de RGMb no aumentaron en las células T por la activación de CD3 y/o CD28, lo que indica que RGMb no es una molécula de activación de células T. La tinción por citometría de flujo intracelular con RGMb mAb 9D1 conjugado con PE no detectó expresión de RGMb en células T esplénicas (CD3+), células B (CD19+) o DC (CD11c+) de ratones ingenuos (Figura 7C, panel superior), pero se detectaron niveles bajos de expresión de RGMb en estas células de ratones tratados con ligando de tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT-3L) para ampliar las poblaciones de DC (Figura 7C, panel central). Utilizando el sistema fuerte de biotina/estreptavidina-PE y tinción intracelular, se detectaron niveles bajos de proteína RGMb en células no estimuladas de bazo, timo y pulmón de ratón (Figura 7D). Los hallazgos de la expresión intracelular de RGMb concuerdan con la expresión intracelular observada en microscopía confocal de células SKBR-3 (Figura 6C) y tinción inmunohistoquímica de células cancerosas (Li et al. (2012) *Int. J. Oncol.* 40:544-550).

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

[0358] El bloqueo de PD-L2 tiene efectos particularmente fuertes sobre las respuestas inmunitarias en el pulmón (Akbari et al. (2010) *Mucosal Immunol.* 3:81-91 y Singh et al. (2010) *Allergy* 66:155-162) y RGMb está altamente expresado en el pulmón (Figura 7A). En particular, la neumonitis es el acontecimiento adverso más grave notificado en los ensayos clínicos con PD-1 mAb en humanos (Topalian et al. (2012) *N. Engl. J. Med.* 366:2443-2454.). Por lo tanto, se investigó el papel de PD-L2 y RGMb en un modelo de ratón de tolerancia respiratoria inducida por OVA.

[0359] La tolerancia respiratoria es un estado de no respuesta inmunológica antígeno-específica inducida por la exposición a antígenos inocuos inhalados en el tracto respiratorio. Se comparó el desarrollo de tolerancia respiratoria en ratones de tipo salvaje (WT) y deficientes en PD-L2. Para inducir la tolerancia, se expuso a los ratones por vía intranasal (i.n.) al OVA o al control PBS los días 0, 1 y 2. Los ratones fueron desafiados por inmunización con OVA en alumbre i.p. el día 12, y las respuestas de células T esplénicas fueron examinadas una semana después por reestimulación in vitro de células T con antígeno (Figura 8A). Las células T de ratones WT expuestas a OVA intranasal fueron toleradas, como lo demuestra la proliferación significativamente reducida de células 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 deficientes en PD-L2 eran resistentes al desarrollo de tolerancia respiratoria. Las células T de ratones deficientes en PD-L2 que recibieron OVA i.n. mostraron niveles similares de proliferación y producción de IL-4 que las células T de ratones deficientes en PD-L2 de control que recibieron PBS i.n. De forma similar, el tratamiento de ratones WT con un mAb de PD-L2 (3.2) que bloquea tanto la interacción PD-L2:RGMb como PD-L2:PD-1 impidió el desarrollo de tolerancia respiratoria, dando lugar a un aumento de la proliferación y de las respuestas de citoquinas en comparación con los ratones tolerados tratados con el mAb de control (Figura 8C). Estos resultados indican que PD-L2 es fundamental para el desarrollo de la tolerancia respiratoria.

[0360] Dado que PD-L2 puede interactuar tanto con PD-1 como con RGMb, se utilizaron mAbs específicos para evaluar la contribución de RGMb en el desarrollo de la tolerancia respiratoria. Los ratones fueron tratados con RGMb mAb 9D1 (bloquea RGMb:PD-L2 y RGMb:BMP), con PD-L2 mAb 2C9 (bloquea RGMb:PD-L2 pero no PD-1:PD-L2), o con mAb de control del isotipo. La administración de mAb 2C9 o 9D1 a ratones que recibieron OVA i.n. inhibió el desarrollo de tolerancia respiratoria y condujo a mayores niveles de proliferación de células T y producción de IL-4 en comparación con las células T de ratones que recibieron mAb de control (Figura 8D). Estos resultados indican un papel de la interacción RGMb:PD-L2 en la promoción del desarrollo de la tolerancia respiratoria.

Ejemplo 10: Bloqueo de la interacción RGMb:PD-L2 impide la expansión de las células T al antígeno durante el desarrollo de la tolerancia respiratoria

[0361] Estudios previos de tolerancia respiratoria mostraron que la administración intranasal de antígeno, como el ácaro del polvo doméstico (Hoyne et al. (1996) *Int. Immunol.* 8:335-342) u OVA (Albacker et al. (2012) *Mucosal Immunol.* 6:580-590 y Tsitoura et al. (1999) *J. Immunol.* 163:2592-2600), indujeron una fuerte respuesta transitoria de células T CD4+ seguida de la eliminación de la mayoría de las células T antígeno-específicas. Durante el desarrollo de la tolerancia respiratoria, el antígeno inhalado es muestreado por DC inmaduras en el pulmón, que migran a los LN mediastínicos de drenaje donde se encuentran con células T antígeno-específicas. En ausencia de estímulos inflamatorios, las DC inducen la activación transitoria de células T específicas de antígeno, seguida de la eliminación de células T y la falta de respuesta (Hawiger et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:769-779). La tolerancia respiratoria implica múltiples mecanismos, incluyendo la deleción de células T antígeno-específicas y el desarrollo de anergia y células T reguladoras (Tregs), y estos procesos pueden ocurrir simultáneamente (Albacker et al. (2012) *Mucosal Immunol.*

6:580-590; Bedoret et al. (2009) J. Clin. Invest. 119:3723-3738; Geurts van Kessel et al. (2008) Mucosal Immunol. 1:442-450; Holt et al. (2004) Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 4:39-44).

[0362] Para explorar el mecanismo por el cual la interacción RGMb y PD-L2 mejora la tolerancia respiratoria, se examinó el efecto del bloqueo de la interacción RGMb:PD-L2 en la activación y expansión de células T CD4⁺ DO11.10 específicas de OVA transferidas. Los ratones receptores fueron tratados con RGMb mAb 9D1 o mAb de control, posteriormente se les administró OVA o PBS por vía intranasal los días 0, 1 y 2, y se monitoreó el destino de las células T DO11.10 utilizando el mAb clonotípico KJ1-26 (Figura 9A). Como era de esperar, la exposición de los ratones a OVA i.n. produjo una marcada expansión de las células DO11.10 en el LN mediastínico el día 7 en comparación con los ratones que recibieron PBS i.n.. En particular, esta expansión de células T KJ1-26⁺ disminuyó considerablemente en los ratones tolerados tratados con anti-RGMb en comparación con los ratones tratados con mAb de control (Figura 9B, izquierda). El número de células Treg específicas de OVA (KJ1-26⁺ Foxp3⁺) se redujo de forma similar en los ratones tratados con RGMb mAb, lo que indica que la expansión reducida de células T KJ1-26⁺ no se debió a un aumento del número de células Treg específicas de OVA (Figura 9B, derecha).

[0363] También se examinó el efecto del mAb RGMb en la expansión de células T KJ1-26⁺ en puntos temporales anteriores. Se detectó un número similar de células KJ1-26⁺ en los LN de ratones tratados con mAb RGMb y de ratones tratados con control el día 3. Sin embargo, en el día 5, el número de células KJ1-26⁺ aumentó en los ratones de control, pero mostró poca expansión en el grupo tratado con mAb RGMb (Figura 9C). Estos hallazgos indican que el bloqueo de RGMb inhibe la inducción de tolerancia al impedir la expansión de las células T que se produce normalmente tras la administración respiratoria de OVA.

[0364] Para determinar si el tratamiento con PD-L2 mAb inhibiría de manera similar la respuesta de las células T CD4⁺ específicas de OVA tras la exposición a OVA i.n., se trató a los ratones con PD-L2 mAb, RGMb mAb o mAb de control y se examinó el número de células KJ1-26⁺ en el quinto día. Se detectó una reducción del número de células 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 que se inhibió la expansión de las células KJ1-26⁺ (Figura 9D). Para determinar si el mAb anti-PD-L2 alteraba el curso temporal de la respuesta de las células T, se examinó la respuesta in vivo de las células T DO11.10 al OVA i.n. durante un periodo de 7 días en ratones tratados con mAb PD-L2 o mAb de control (Figura 9E). En los ratones control, el número de células KJ1-26⁺ en los LN mediastínicos aumentó sustancialmente a partir del día 3, alcanzando un máximo el día 5 y disminuyendo posteriormente, tal y como se describió previamente en Tsitoura et al. (1999) J. Immunol. 163:2592-2600. En los ratones tratados con el mAb PD-L2, se observó un aumento limitado del número de células KJ1-26⁺ entre los días 3 y 5, con un posterior descenso, lo que indica que el bloqueo de PD-L2 inhibió la expansión de las células T específicas de OVA a lo largo de la respuesta. También se comparó la expansión de células T WT KJ1-26⁺ tras la transferencia a ratones PD-L2 deficientes o WT y la exposición a OVA i.n. Entre los días 3 y 5, las células KJ1-26⁺ se multiplicaron por 72 en los receptores WT, pero sólo por 9,7 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 no-T es necesaria para esta expansión.

[0365] Para diseccionar más a fondo esta interacción y determinar la implicación de PD-1:PD-L2 frente a RGMb:PD-L2 en este proceso, los ratones fueron tratados con PD-L2 mAb 2C9 que bloquea sólo la interacción RGMb:PD-L2 o con mAb de control. La expansión de células KJ1-26⁺ en el día 5 se redujo significativamente en los ratones tratados con mAb 2C9 en comparación con los ratones tratados con el control (Figura 9G), lo que indica que PD-1 no es necesario para este efecto ya que 2C9 no bloquea la interacción de PD-L2 con PD-1. En conjunto, estos datos indican que el bloqueo de la interacción RGMb:PD-L2 previene la inducción de tolerancia respiratoria, y lo hace reduciendo la expansión inicial de las células T CD4⁺ en respuesta a OVA por una vía que no implica a PD-1.

[0366] A continuación se examinaron los efectos del bloqueo de PD-L1 o PD-1 en comparación con PD-L2 sobre la activación inicial y la expansión de células T CD4⁺ específicas de OVA DO11.10 transferidas. El día 5, los ratones tratados con el mAb bloqueante de PD-L1 9G2 o con el mAb PD-1 1A2 presentaban un número sustancialmente mayor de células KJ1-26⁺ en los LN mediastínicos que los ratones tratados con mAb de control (Figuras 9H-9I), lo que indicaba que el bloqueo de la participación de PD-1 o PD-L1 aumentaba significativamente la expansión de células T específicas de OVA en respuesta a OVA i.n.. Por el contrario, en los ratones tratados con PD-L2 mAb, el número de células KJ1-26⁺ fue significativamente menor que en los ratones tratados con el control (Figura 9I). Estos datos indican además que la interacción RGMb:PD-L2 reduce la expansión inicial de células T CD4⁺ en respuesta a OVA por una vía que no implica a PD-1.

[0367] En conjunto, estos datos demuestran que PD-L2 desempeña un papel crítico en el desarrollo de la tolerancia respiratoria y que la interacción PD-L2:RGMb promueve la inducción de la tolerancia respiratoria apoyando la expansión inicial de las células T CD4⁺ en respuesta al OVA tolerogénico. Esta expansión es necesaria para la inducción de la tolerancia y va seguida de la eliminación de las células T específicas de Ag. Las células T de tipo salvaje transferidas a ratones deficientes en PD-L2 no experimentan la expansión inicial de células T implicada en la tolerancia, lo que indica que la expresión de PD-L2 en células no 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 300 células

[0368] Para explorar los subconjuntos de células pulmonares implicados en la interacción RGMb:PD-L2 para promover la tolerancia respiratoria, se analizó la expresión de RGMa, RGMb, RGMc, BMP-2/4/6, receptores 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 RT-PCR en tiempo real (Figuras 10A-10G). Las poblaciones de células pulmonares analizadas fueron macrófagos intersticiales (MI, F4/80+CD11c-), macrófagos alveolares (MA, F4/80+CD11c+), células dendríticas (CD, 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 los IM fue notablemente mayor que en los AM, mientras que la expresión de PD-L2 fue mayor en los DC y muy baja en los IM y los AM. En un estudio anterior se observó que los MI, pero no los AM, producían altos niveles de IL-10 e inhibían la maduración y migración de DC inducidas por LPS, previniendo así la alergia de las vías respiratorias en ratones (Bedoret et al. (2009) J. Clin. Invest. 119:3723-3738). También se observó que las 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 los MI pueden interactuar con PD-L2 en las DC para formar un complejo que induzca la producción de IL-10 en los MI e inhiba la maduración y migración de las DC, lo que promueve la tolerancia respiratoria.

[0369] 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 celulares epiteliales de las vías respiratorias humanas A549 y BET-2A mediante RT-PCR en tiempo real. Las células A549 tenían niveles muy bajos de expresión de todas estas moléculas y las BET-2A tenían 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 celular responsable de la elevada expresión de RGMb, BMPs y receptores BMP en las células pulmonares.

[0370] Para ver si existe un complejo de RGMb:PD-L2:BMP-2/4:receptores de BMP en las células 300 transfectadas que podría utilizarse para el estudio del complejo, la expresión de las moléculas anteriores en las células 300 y en las células 300 transfectadas con RGMb utilizando RT-PCR en tiempo real. Las células 300 tenían una expresión muy baja o nula de estas moléculas y no había expresión inducida en las células 300 transfectadas con RGMb (Figura 10J). Estos datos indican que la unión de las células 300-RGMb a las células 300-PD-L2 es independiente de las BMP y de los receptores BMP.

Ejemplo 12: El bloqueo de la participación de RGMb y PD-L2 retrasa la aparición de la enfermedad y reduce su incidencia y gravedad en un modelo de ratón de enfermedad autoinmune

[0371] El efecto del bloqueo de la participación RGMb/PD-L2 se probó en el modelo de ratón de encefalitis autoinmune experimental (EAE) de esclerosis múltiple. Los ratones EAE se produjeron mediante inmunización con glicoproteína de mielina oligodendrocito (MOG) y tratamiento con toxina pertussis (PT) según se describe en Chang et al. (1999) J. Exp. Med. 190(5):733-40.

[0372] Los ratones fueron tratados con el anticuerpo anti-RGMb 9D1 o un anticuerpo de control de isotipo irrelevante. Se inyectaron anticuerpos el día anterior a la inmunización MOG/PT (400 mg) y los días 2, 5, 8 y 11 siguientes a la inmunización MOG/PT (200 mg/inyección).

[0373] Los ratones fueron observados diariamente en busca de signos clínicos de EAE, y puntuados en una escala de 0-5: 0 (ausencia de enfermedad); 1 (cojera de la cola); 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 media se calculó promediando las puntuaciones de todos los ratones de cada grupo. El tratamiento con 9D1 dio lugar a una protección sustancial frente a la EAE, retrasando la aparición de los síntomas de EAE (día 14 para 9D1 en comparación con el día 9 para el control) y reduciendo tanto la gravedad (puntuación media máxima de 0,45 para 9D1 en comparación con 2,45 para el control) como 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 representa la puntuación clínica de EAE a lo largo del tiempo tanto para los ratones tratados con 9D1 como para los de control.

Ejemplo 13: RGMb en tolerancia oral

[0374] En contraste con el sistema nervioso entérico, la expresión de RGMb en el epitelio intestinal comienza durante el desarrollo postnatal del intestino. Tanto el RGMa como el RGMb se expresan predominantemente en el compartimento proliferativo de la cripta del epitelio intestinal y en las células paneth del intestino delgado. La expresión dependiente del desarrollo en los ganglios entéricos y las células epiteliales intestinales sugiere que la RGM puede estar implicada en la migración celular, la diferenciación y la apoptosis (Metzger et al. (2005) Dev. Dyn. 234:169-175). Además, se ha informado de que los ratones PD-L2^{-/-} son resistentes al desarrollo de tolerancia oral. (Zhang et al.

(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 tolerancia oral.

[0375] 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 tolerancia oral. En concreto, el tratamiento de ratones con mAb anti-RGMb 9D1 impidió el desarrollo de tolerancia oral, lo que dio lugar a un aumento de la proliferación y de las respuestas de citoquinas en comparación con los ratones tolerados tratados con mAb de control (Figura 13). Estos datos indican que la RGMb desempeña un papel importante en el desarrollo de la tolerancia oral.

10

15

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-RGMb aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe la interacción entre RGMb y PD-L2, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

5 a) un polipéptido que comprende tres CDR: CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en los que CDR-L1 está formado por los residuos de aminoácidos 44-54 de NO ID SEC: 12, CDR-L2 consiste en los residuos de aminoácidos 70-76 de NO ID SEC: 12, y CDR-L3 consiste en los residuos de aminoácidos 109-116 de NO ID SEC: 12; y

b) un polipéptido que comprende tres CDR: CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3,

10 en la que CDR-H1 consiste en los residuos de aminoácidos 50-54 de NO ID SEC: 14, CDR-H2 consiste en los residuos de aminoácidos 69-85 de NO ID SEC: 14, y CDR-H3 consiste en los residuos de aminoácidos 118-125 de NO ID SEC: 14.

2. El anticuerpo monoclonal anti-RGMb de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb comprende una secuencia variable de cadena pesada que tiene la secuencia de NO ID SEC: 14 y/o una secuencia variable de cadena ligera que tiene la secuencia de NO ID SEC: 12.

15 3. El anticuerpo monoclonal anti-RGMb de la reclamación 2, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia variable de cadena pesada que tiene la secuencia de NO ID SEC: 14 y una secuencia variable de cadena ligera que tiene la secuencia de NO ID SEC: 12.

20 4. El anticuerpo monoclonal anti-RGMb de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la presencia del anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce o inhibe al menos una actividad en relación con la ausencia del anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en modular la expresión de FoxP3, modulación de la fosforilación de ERK1 o ERK2, modulación de la fosforilación de PKC- θ , modulación de la fosforilación de SHP-2, modulación de la producción de citoquinas y modulación de la proliferación celular.

25 5. El anticuerpo monoclonal anti-RGMb de cualquiera de las reclamaciones 1-4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado detectablemente.

6. El anticuerpo monoclonal anti-RGMb de cualquiera de las reclamaciones 1-4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio efector.

7. El anticuerpo monoclonal anti-RGMb de cualquiera de las reclamaciones 1-4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio Fc.

30 8. El anticuerpo monoclonal anti-RGMb de cualquiera de las reclamaciones 1-4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en Fv, Fav, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, y fragmentos de diabodies.

9. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal anti-RGMb o un fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reclamaciones 1-8.

35 10. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reclamación 9.

11. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado de la reclamación 9.

12. Una célula huésped que comprende el vector de la reclamación 10.

13. Una célula huésped que expresa el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

40 14. Un dispositivo o kit que comprende al menos un anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reclamaciones 1-8.

15. El dispositivo o kit de la reclamación 14 que comprende una etiqueta para detectar el al menos un anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un complejo que comprende el anticuerpo monoclonal anti-RGMb o fragmento de unión a antígeno del mismo.

45

Figura 1

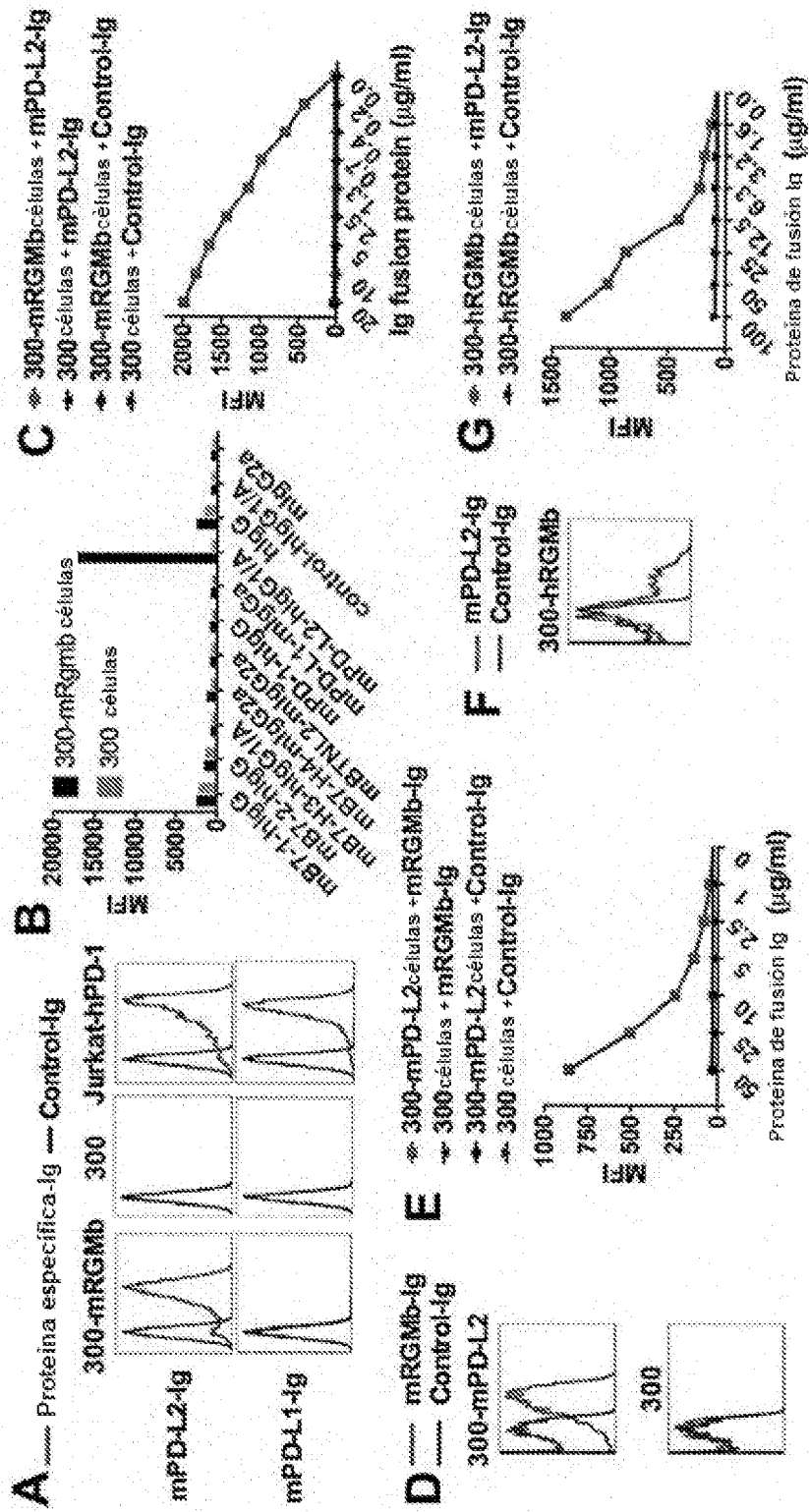


Figura 1 (cont.)

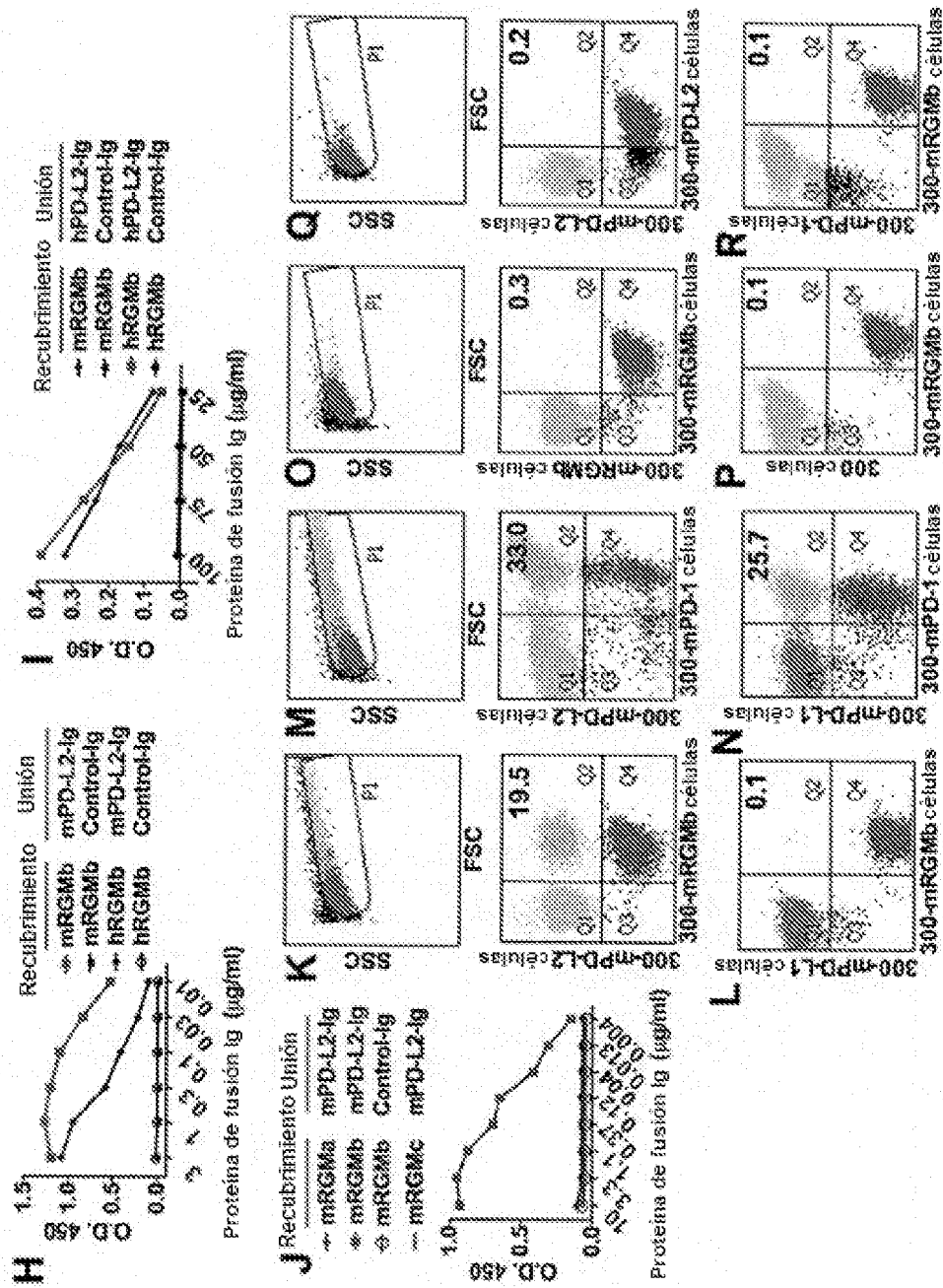


Figura 2

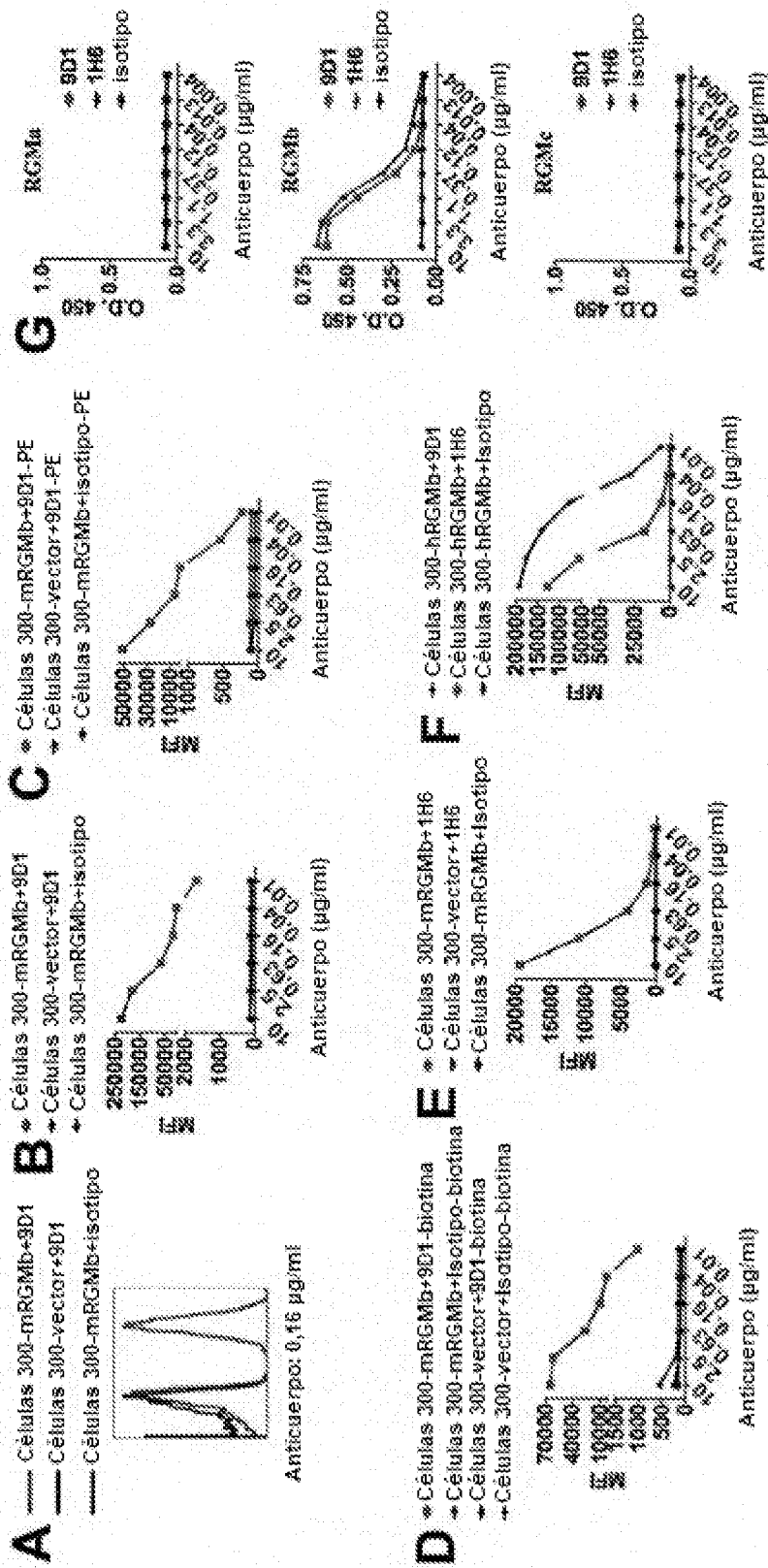


Figure 3

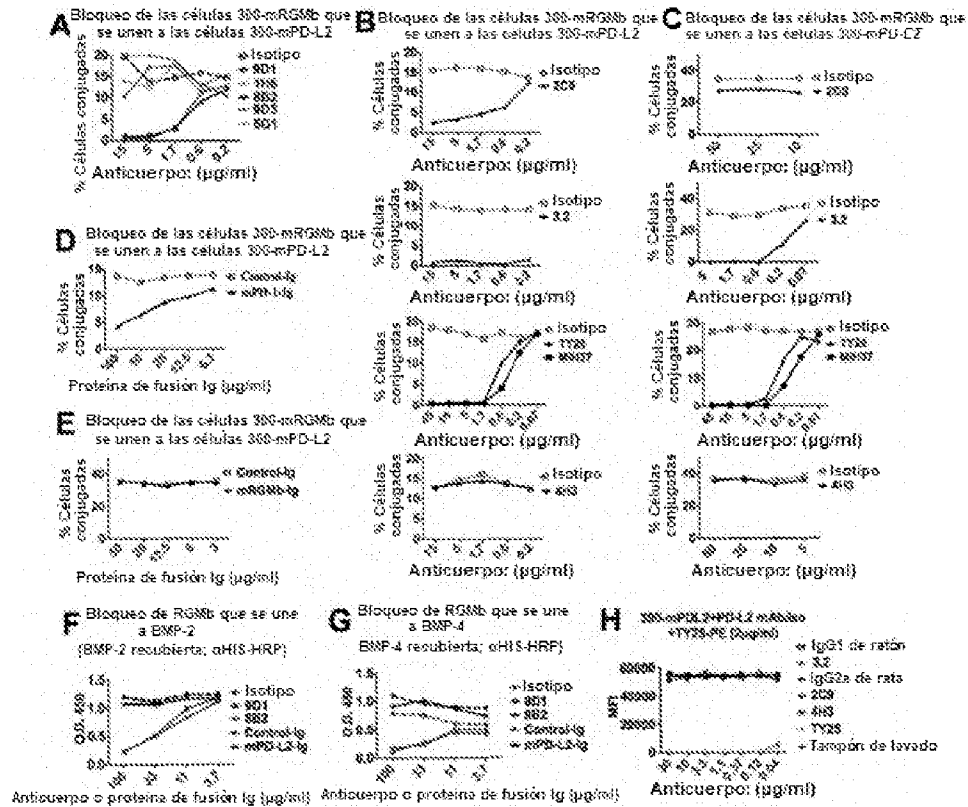


Figura 4

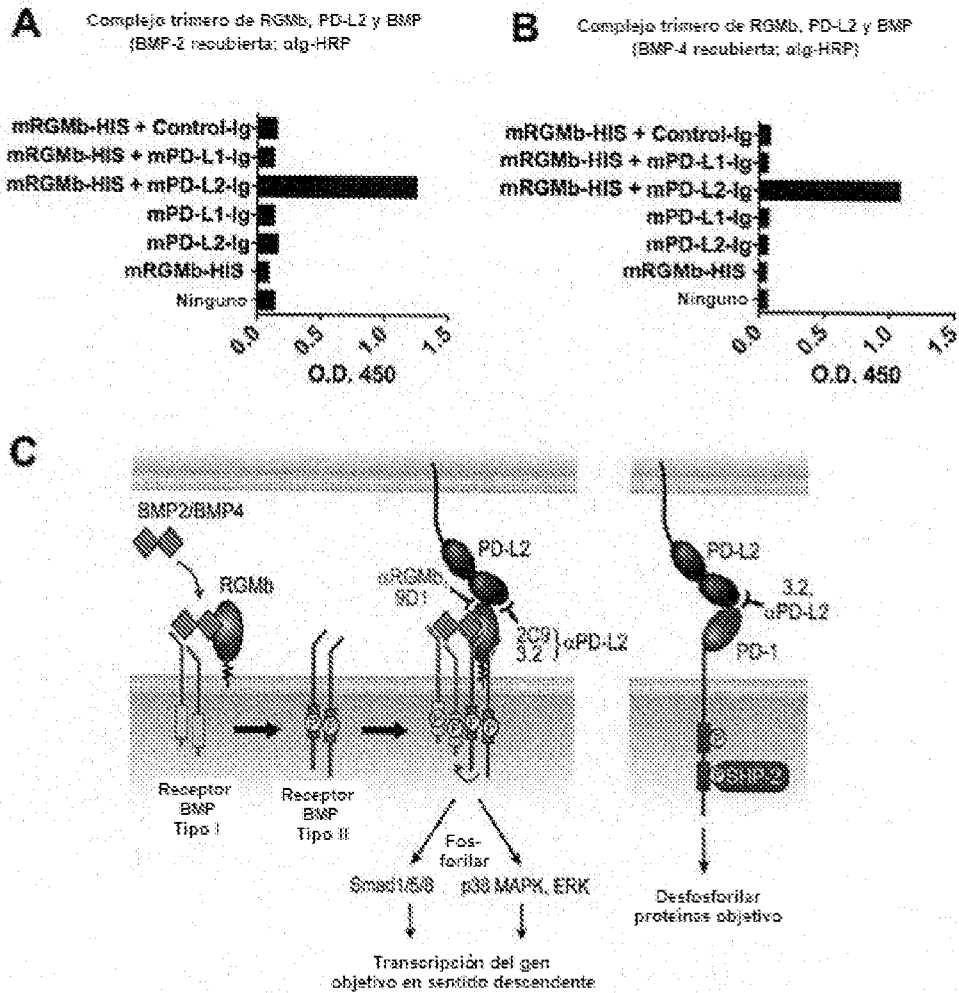


Figura 5

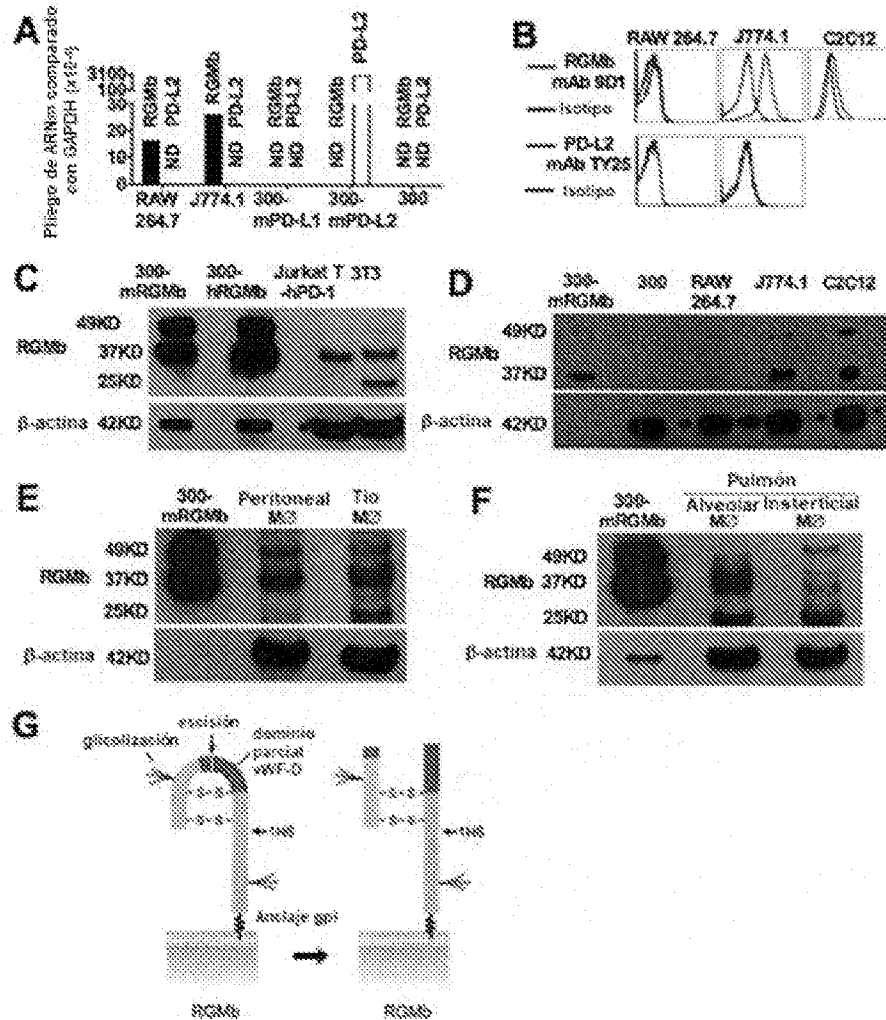


Figura 6

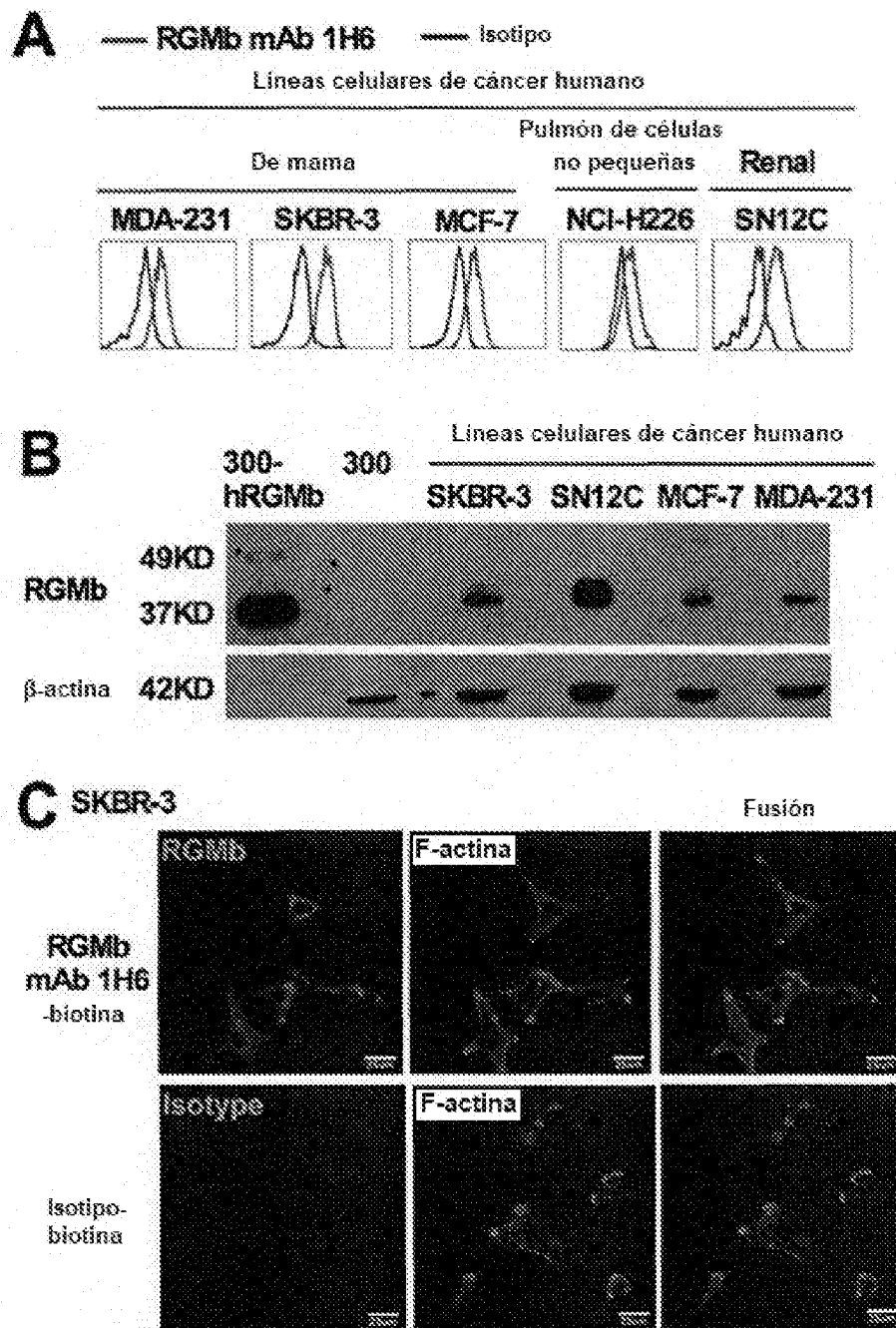


Figura 7

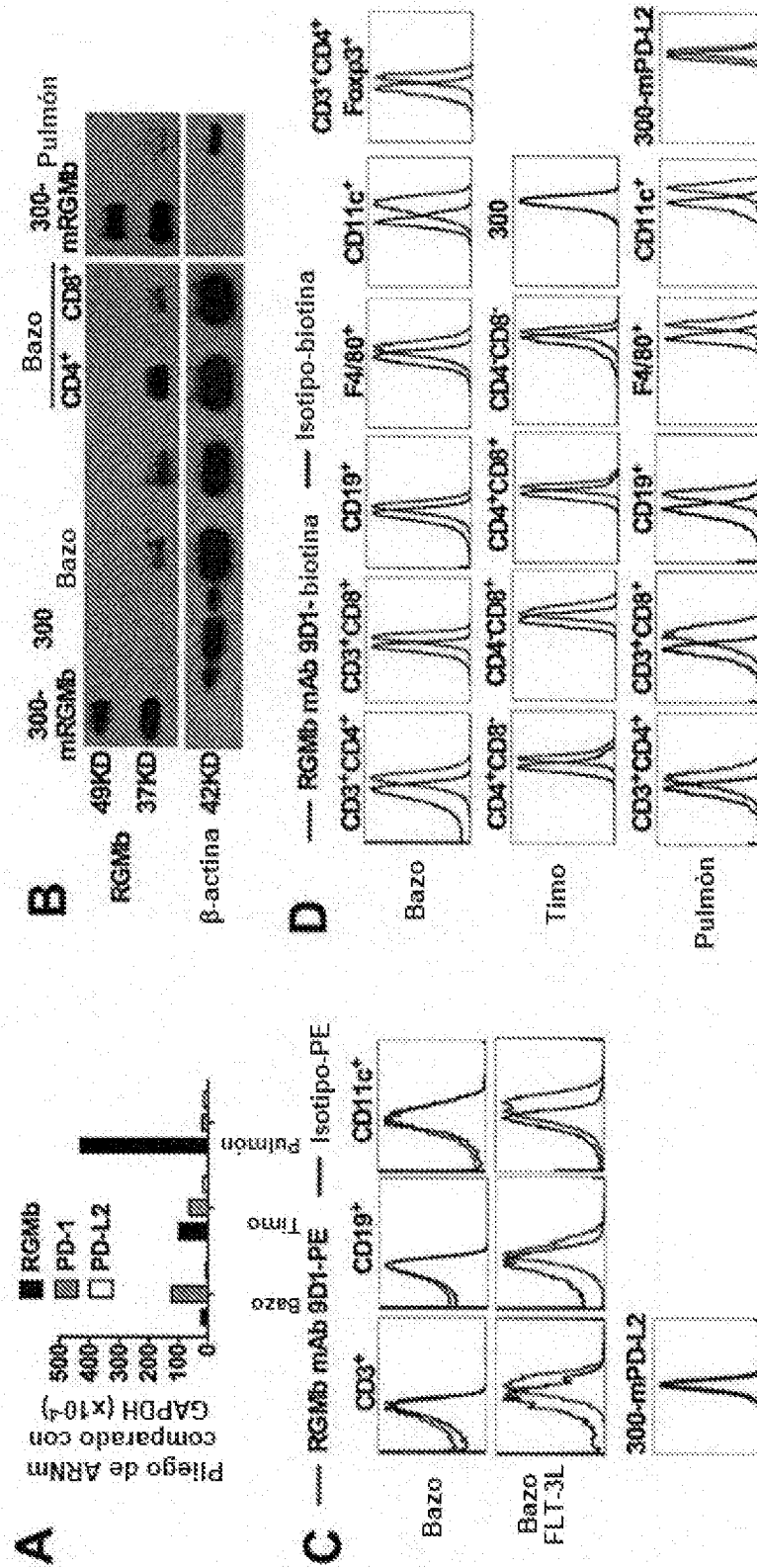


Figura 8

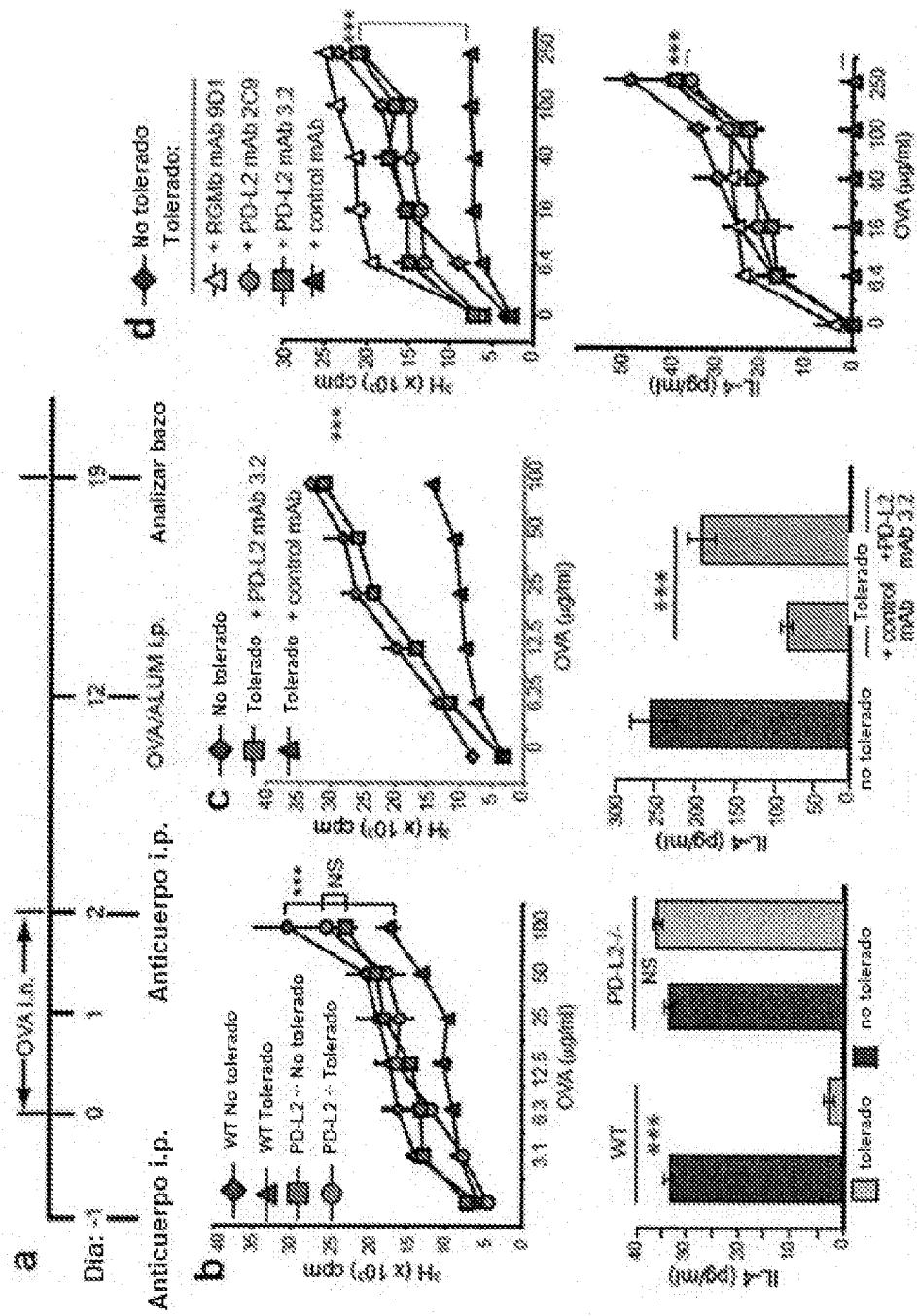


Figura 9

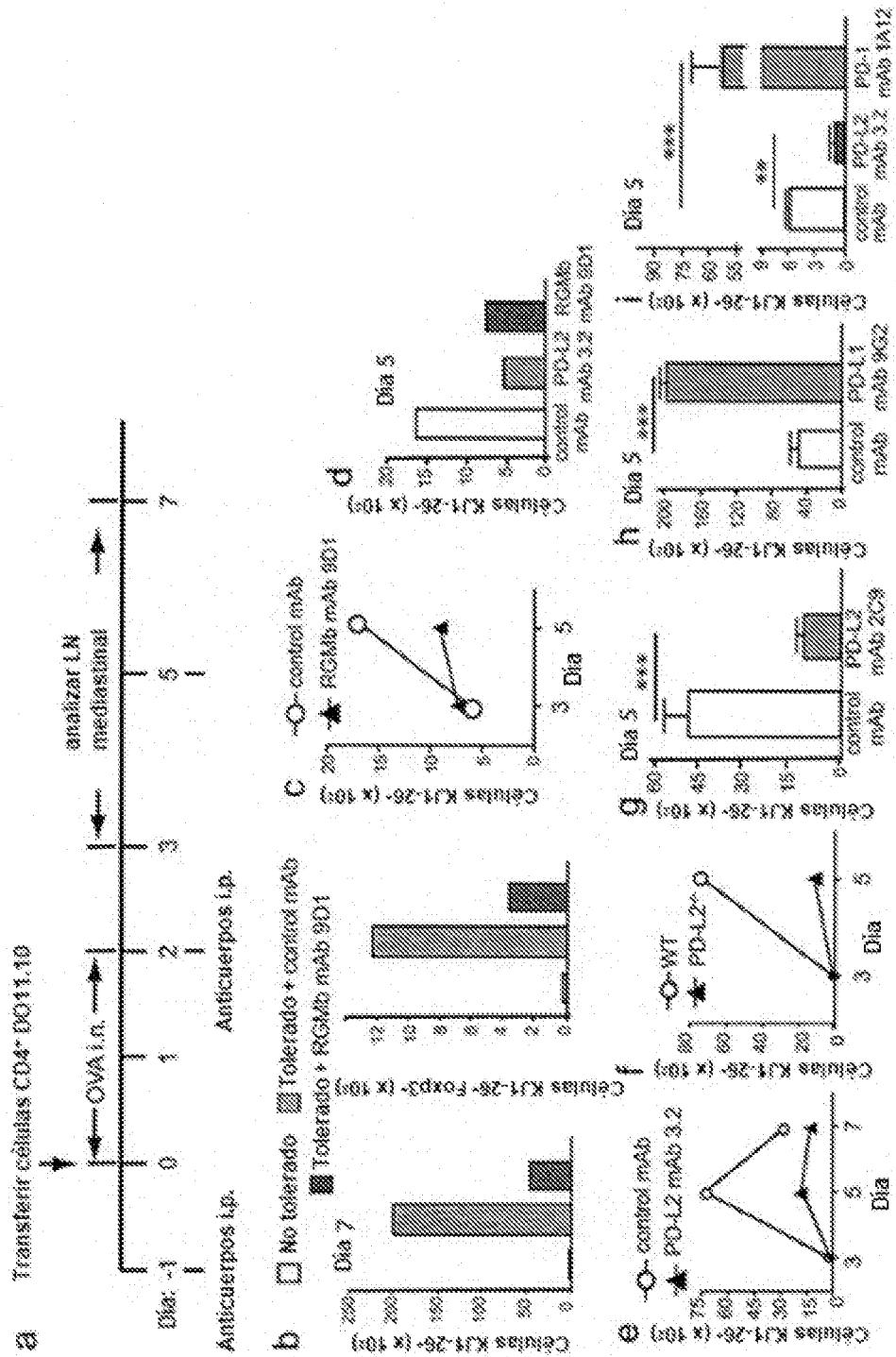


Figura 10

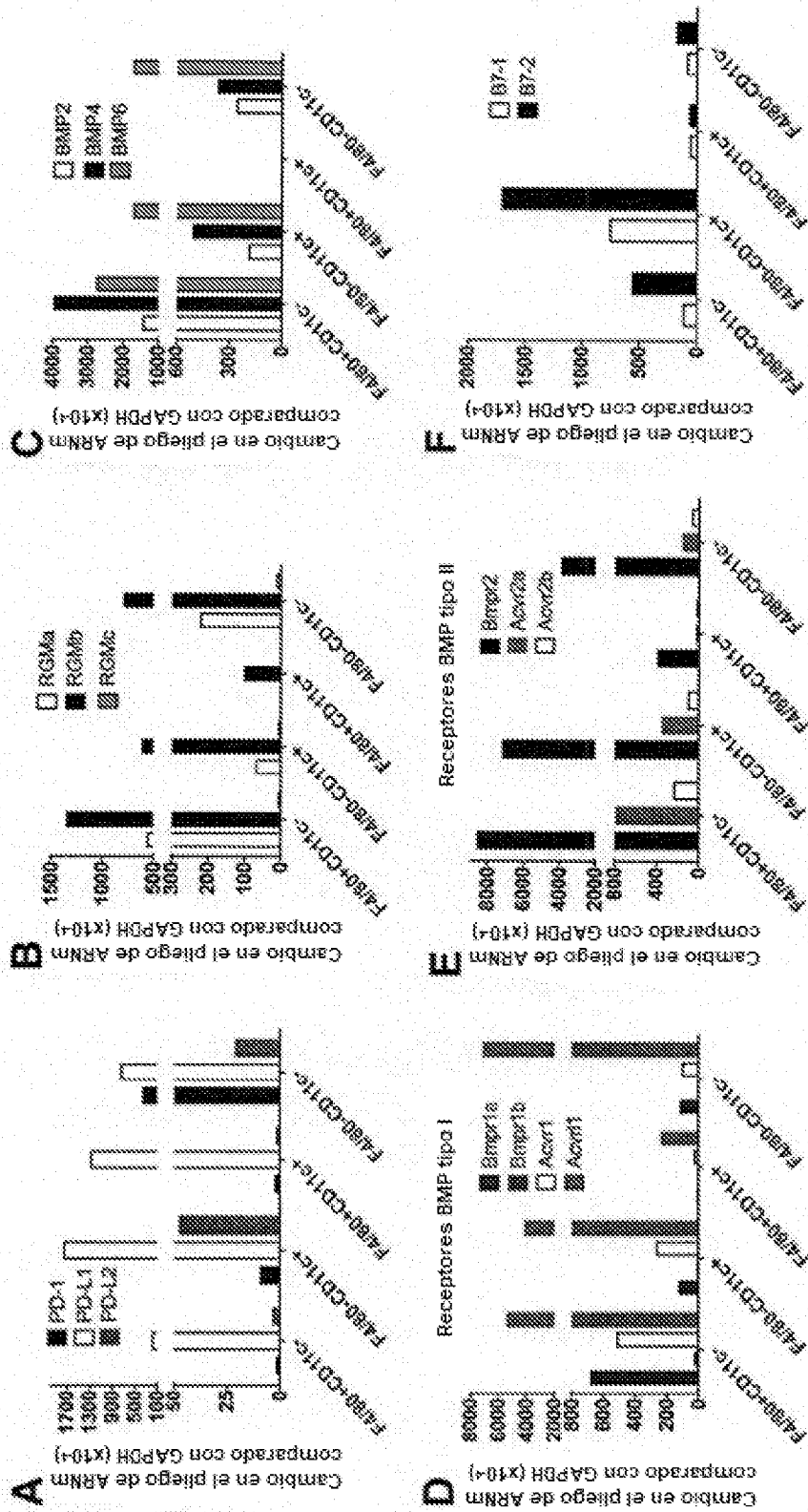


Figura 11

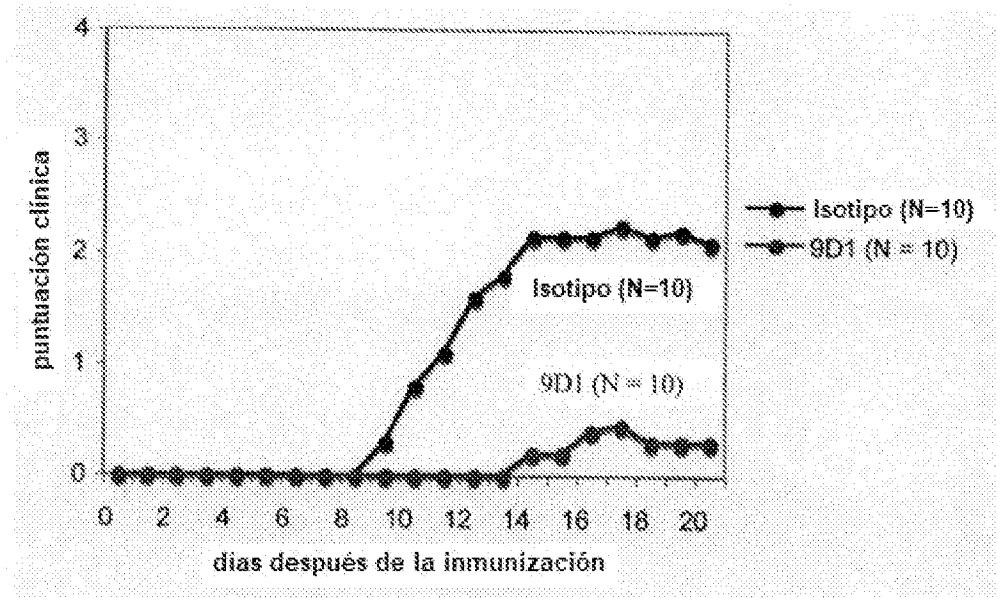


Figura 12

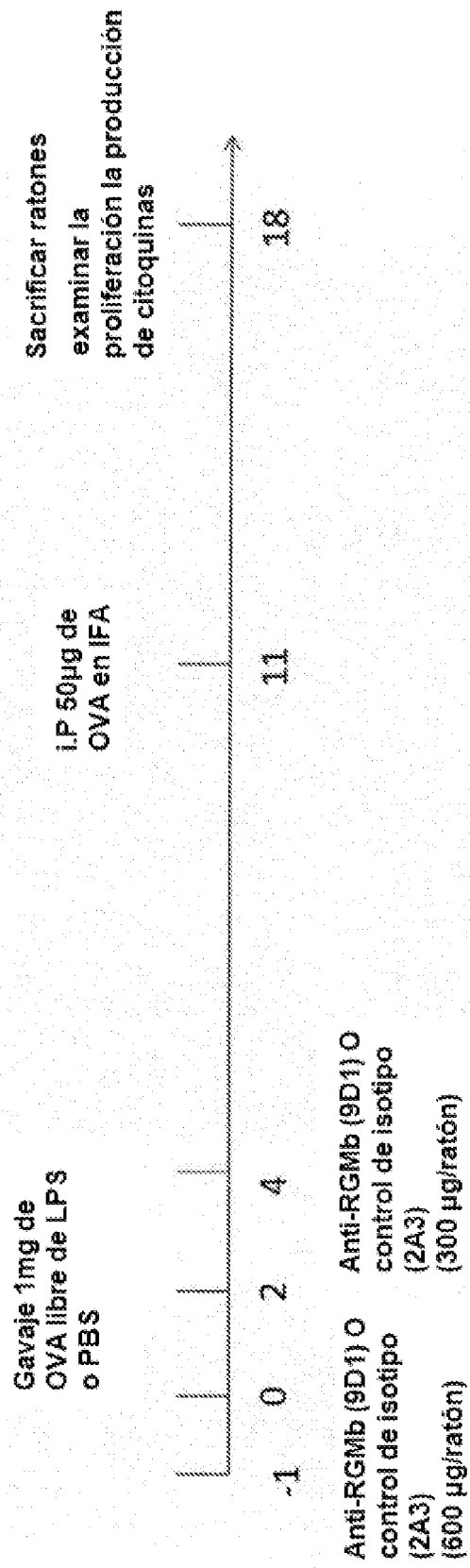


Figura 13

