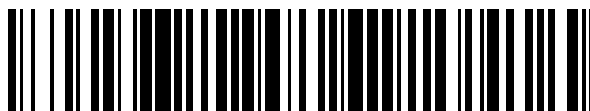


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 328**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09011595 .7**
- 96 Fecha de presentación: **23.07.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2133362**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2009**

54 Título: **Métodos relacionados con LDCAM y CRTAM**

30 Prioridad:
25.07.2003 US 490027 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
**AMGEN, INC
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CALIFORNIA 9132, US**

72 Inventor/es:
**Galibert, Laurent J. y
Yan, Wei**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 328 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

Métodos relacionados con LDCAM y CRTAM.

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES ANTERIORES

5 Esta solicitud reivindica el beneficio según el artículo 119 del título 35 del Código de los Estados Unidos de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/490.027, presentada el 25 de julio de 2003.

ANTECEDENTES

1. Campo de la invención

10 Las realizaciones de la invención se refieren en general a métodos *in vitro* de antagonización de la unión de LDCAM y CRTAM y de agonización de los efectos biológicos de la unión de LDCAM a CRTAM, así como a métodos de cribado de antagonistas y agonistas de LDCAM.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La LDCAM es una molécula de adhesión celular homófila que se ha mostrado que modula la función de linfocitos T interaccionando con una o más moléculas de superficie de linfocitos T, causando así la alteración de la señalización celular. Se ha mostrado que la LDCAM se autoasocia formando un homodímero y se une a B7L-1. Se ha mostrado también que la LDCAM genera aumentos en las poblaciones de linfocitos citolíticos naturales. La solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/778.187, presentada el 6 de febrero de 2001, describe la LDCAM.

20 La LDCAM se designa también en la materia como Igsf4, TSLC1, SynCAM y de tipo nectina 2 y se ha caracterizado como un miembro de la familia de tipo nectina de receptores de superficie celular de tipo inmunoglobulina y por tener tres dominios C2 de tipo Ig. La cola citoplasmática de los receptores de tipo nectina tiene un sitio de unión de proteína banda 4.1 y un sitio de unión de proteína PDZ. La LDCAM se ha identificado como un gen supresor tumoral eliminado en carcinoma pulmonar no microcítico y por tener homología con NCAM (Gomyo *et al.* Genomics 62: 139-146 (1999) y Kuramochi *et al.* Nat. Genet. 27(4): 427-30 (2001); Masuda *et al.* J. Biol. Chem. 277(34): 31014-9 (2002)).

25 Como se describe en la presente memoria, se ha descubierto que la LDCAM se une a CRTAM. La CRTAM se ha descrito como un miembro de la familia de marcadores de superficie celular designado inicialmente como una molécula asociada a linfocitos T limitados a la clase I (CRTAM) como resultado de su patrón de expresión limitado en linfocitos T (patente de EE.UU. nº 5.686.257). Las técnicas de sustracción de colecciones de ADNc mostraron que los transcritos de ARNm se expresaban por linfocitos T $\alpha\beta$ TCR+ CD4- CD8- (dobles negativos) de ratón activados, un subconjunto de linfocitos T citolíticos naturales (NKT). La CRTAM humana se ha identificado también y comparte el mismo patrón de expresión que la molécula de ratón. LPTN y CRTAM exhiben el mismo patrón de expresión en linfocitos T, sugiriendo la existencia de un programa de expresión génica común a los linfocitos T limitados a MHC de clase I (Kennedy, *et al.*, J. Leuk. Bio. 67, 725 (2000)).

30

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención es como se expone en las reivindicaciones

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el fenotipado de un nuevo subconjunto de células dendríticas humanas que son la contrapartida humana de las células dendríticas CD8 α^+ de ratón, que son células presentadoras de antígeno inmunomoduladoras críticas para la presentación cruzada y la tolerancia cruzada.

40 La Figura 2 es una tabla de los genes compartidos entre las células dendríticas CD8 α^+ de ratón y las células dendríticas BDCA3+ humanas.

La Figura 3 es una gráfica que muestra que las células dendríticas BDCA3+ humanas son potentes aloestimulantes.

La Figura 4 es una serie de exploraciones por FACS que muestran que el fago 1F12 que expresa scfv se une específicamente a células dendríticas BDCA3+ humanas.

45 La Figura 5 es una exploración por FACS que ilustra que la proteína de fusión scfv-Fc de 1F12 ("maxicuerpo") retenía especificidad global por LDCAM después de la conversión desde un fago de scfv hasta una proteína de fusión scfv-Fc.

La Figura 6 es la secuencia aminoacídica de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de scfv de 1F12 (scfv anti-LDCAM).

La Figura 7 es una imagen de un gel de inmunoprecipitación que muestra que la scfv-Fc de 1F12 inmunoprecipitaba una glucoproteína de 100 kDa en células dendríticas de ratón derivadas de médula ósea, que se mostró posteriormente que era LDCAM mediante espectrometría de masas.

5 La Figura 8 es una inmunotransferencia puntual que muestra que el anticuerpo scfv-Fc de 1F12 se une específicamente a LDCAM-Fc recombinante pero no a RANK-Fc no relacionada. Estos resultados muestran que la proteína de fusión scfv-Fc de 1F12 se une específicamente a LDCAM.

10 La Figura 9 muestra que los linfocitos T CD4⁺ se anergizaron por LDCAM frente a la activación por mAb anti-CD3 y conA (Figuras 9A y 9C, respectivamente). Las Figuras 9B, 9D, 9F y 9H muestran que los linfocitos T CD8⁺ se anergizaron por LDCAM frente a la activación por mAb anti-CD3, conA, PHA y conA + IL-2, respectivamente. Estos estudios muestran que la LDCAM interacciona con una molécula expresada sobre la superficie de linfocitos T activados de manera dependiente del contacto que evita o reprime la activación de linfocitos T por una variedad de estímulos. Estos estudios muestran que la LDCAM es un agente regulador en rutas inflamatorias.

15 La Figura 10 es una serie de exploraciones por FACS que muestran que LDCAM-Fc se une a linfocitos T CD8⁺ y en menor medida a linfocitos T CD4⁺ (Figuras 10D y 10C, respectivamente), mientras que el anticuerpo scfv-Fc de 1F12 (concretamente, el anticuerpo anti-LDCAM) no lo hace (Las Figuras 10A y 10B son controles isotípicos). Estos estudios muestran que la LDCAM interacciona con una molécula expresada sobre la superficie de linfocitos T activados de manera dependiente del contacto que evita o reprime la activación de linfocitos T por una variedad de estímulos. Estos estudios muestran que la LDCAM es un agente regulador en rutas inflamatorias.

20 La Figura 11 es una serie de exploraciones por FACS que muestran que los linfocitos T CD8⁺ activados por anticuerpos anti-CD3 se unen a LDCAM-Fc a altos niveles (Figura 11A) y solo con unión marginal al anticuerpo scfv-Fc de 1F12 (Figura 11B). En contraposición, la LDCAM-Fc mostró una unión marginal de LDCAM-Fc (Figura C) y una alta unión de la proteína de fusión scfv-Fc de 1F12 (Figura 11D). Las células esplénicas CD8⁺ de ratones tratados con ligando Flt3 mostraron una unión heterogénea tanto de LDCAM-Fc como de scfv-Fc de 1F12 (Figuras 11E y 11F, respectivamente).

25 La Figura 12 es una serie de exploraciones por FACS que muestran que la expresión en superficie celular de la contrapartida estructural de LDCAM (CRTAM) se expresa temporalmente sobre la superficie celular de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados. Los análisis por FACS mostraron que la expresión en superficie celular de la unión de LDCAM-Fc a su asociado en linfocitos T CD4⁺ se reducía después de aproximadamente 24 horas (Figuras 12C, 12F y 12I). De forma interesante, los linfocitos T CD8⁺ mostraban un fuerte aumento de la expresión en superficie celular de CRTAM 24 horas después de la activación (Figura 12D) y una disminución progresiva de la expresión en superficie celular a las 48 y 72 horas después de la activación (Figuras 12G y 12J, respectivamente). La expresión de LDCAM sobre la superficie celular de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados era mínima y no cambiaba con el tiempo (Figuras 12B, 12E, 12H y 12K).

35 Las Figuras 13A y 13B son un gel de una inmunoprecipitación. La Figura 13A es la banda inmunoprecipitada por LDCAM-Fc a partir de CTL activados. La Figura 13B es la banda inmunoprecipitada por scfv-Fc de 1F12 a partir de DC derivadas de médula ósea. Se obtuvieron resultados similares con DC CD8⁺ esplénicas. Se cortó la banda de la Figura 13A y se analizó por espectrometría de masas, que confirma que la CRTAM es el asociado de la LDCAM.

La Figura 14 es una gráfica que muestra los datos de ELISA que prueban que la LDCAM se une específicamente a la CRTAM.

40 La Figura 15 representa un ensayo de FACS que ilustra células EL4 que se transdujeron con un vector lentivírico para expresar LDCAM (Figura 15A) o Necl1 (Figura 15B) sobre su superficie celular. Se expusieron las células transducidas a CRTAM-Fc humana recombinante soluble. La Figura 15A muestra que la CRTAM-Fc se une a las células transducidas que expresan LDCAM (línea gruesa), pero no a las células transducidas para expresar Necl1 (Figura 15B).

45 La Figura 16 demuestra que la reticulación de CRTAM con LDCAM-Fc regula negativamente la secreción de citocina (IFN γ) mediante linfocitos T CD8⁺ de ratón activados *in vitro*.

La Figura 17 son datos de expresión diferencial que muestran que la CRTAM se expresa en mayor medida en macrófagos, DC BDCA3⁺, mastocitos, lesiones de materia blanca por esclerosis múltiple activas, linfocitos NK activados, leucocitos mixtos y linfocitos T.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Definiciones

LDCAM se define y describe en la sección siguiente.

CRTAM se define y describe en la patente de EE.UU. nº 5.686.257.

Un “copartícipe de unión de LDCAM” o “asociado de LDCAM” es un asociado de LDCAM que incluye, pero sin limitación, LDCAM (mediante agregación o asociación homotípica- cis y/o trans), CRTAM, B7L-1 (Nect-1) y B7L-4 (nectina 3).

5 El término “biológicamente activo”, en lo referente a LDCAM, significa que la LDCAM es capaz de una o más de las siguientes actividades: unión de LDCAM a LDCAM (tal como mediante asociación homotípica -cis y/o trans); unión a CRTAM; unión a B7L-1; unión a B7L-4 (nectina 3); modulación de la actividad de linfocitos T, tal como evitando la activación y proliferación; reducción de la liberación de citocinas proinflamatorias, tal como, pero sin limitación, interferón gamma e IL-2; modulación de las respuestas de linfocitos T frente a estímulos de activación; modulación de las respuestas de linfocitos T frente a la estimulación/activación por CD3; modulación de las respuestas de linfocitos T frente a la estimulación/activación de mitógenos; modulación de la actividad de linfocitos NK-T; modulación de la actividad de linfocitos NK; modulación de la actividad de linfocitos B; modulación de la expresión de citocina por células inmunitarias tales como, pero sin limitación, IL-2, INF-gamma y otras citocinas proinflamatorias; modulación de la actividad entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T; modulación de la actividad entre células dendríticas y linfocitos T; modulación de la actividad entre células dendríticas BDCA3+ y linfocitos T; modulación de la actividad entre células presentadoras de antígeno y linfocitos NK-T; modulación de la actividad entre células dendríticas y linfocitos NK-T; modulación de la actividad entre células dendríticas BDCA3+ y linfocitos NK-T; modulación de la actividad entre células presentadoras de antígeno y linfocitos NK; modulación de la actividad entre células dendríticas y linfocitos NK; modulación de la actividad entre células dendríticas BDCA3+ y linfocitos NK; modulación de la actividad entre neuronas y linfocitos T; modulación de la actividad entre neuronas y linfocitos NK-T y modulación de la actividad entre neuronas y linfocitos NK.

La activación de un receptor se define en la presente memoria como la activación de una o más rutas de señalización intracelular y la transducción de la señalización intracelular (concretamente, la transducción de señal) en respuesta a una unión de molécula a un receptor unido a membrana tal como, pero sin limitación, una interacción receptor:ligando.

25 “Transducción de señal”, como se usa en la presente memoria, es la transmisión de una señal mediante la conversión de una forma física o química en otra. En biología celular, el proceso mediante el cual una célula convierte una señal extracelular en una respuesta.

30 Un “peptidocuerpo”, en general, designa moléculas que comprenden al menos parte de un dominio Fc de inmunoglobulina y al menos un péptido. Dichos peptidocuerpos pueden ser multímeros o dímeros o fragmentos de los mismos, y pueden estar derivatizados. Los peptidocuerpos son conocidos en la materia y se describen con mayor detalle en los documentos WO 99/25044 y WO 00/24782. El péptido puede ser de la secuencia aminoacídica de LDCAM, B7L-1 o CRTAM.

35 Un “péptido”, como se usa en la presente memoria, designa moléculas de 1 a 100 aminoácidos. Las realizaciones alternativas comprenden moléculas de 5 a 20 aminoácidos. Los péptidos ejemplares pueden comprender porciones del dominio extracelular de moléculas de origen natural o comprenden secuencias aleatorias de LDCAM, B7L-1 o CRTAM.

40 El término “aleatorio”, como se usa para designar las secuencias peptídicas, designa secuencias totalmente aleatorias (por ejemplo, seleccionadas mediante métodos de exposición en fago o cribado de ARN-péptido) y secuencias en que se reemplazan uno o más residuos de una molécula de origen natural por un residuo aminoacídico que no aparece en esa posición en la molécula de origen natural. Los métodos ejemplares para identificar secuencias peptídicas incluyen exposición en fago, exposición en *E. coli*, exposición en ribosoma, cribado de ARN-péptido, cribado químico y similares.

45 El término “dominio Fc” comprende Fc nativo y moléculas variantes de Fc y secuencias como se definen a continuación. Como con las variantes de Fc y Fc nativas, el término “dominio Fc” incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, tanto digeridas a partir del anticuerpo entero como producidas por otros medios.

50 El término “Fc nativo” designa una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento sin unión a antígeno resultante de la digestión del anticuerpo entero, tanto en forma monomérica como multimérica. La fuente de inmunoglobulina original de Fc nativo es preferiblemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Los Fc nativos están compuestos por polipéptidos monoméricos que pueden ligarse en formas dimericas o multiméricas mediante asociación covalente (concretamente, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de las moléculas de Fc nativo está en el intervalo de 1 a 4, dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Es un ejemplo de un Fc nativo un dímero unido por disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG (véase Ellison *et al.* (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). El término “Fc nativo” como se usa en la presente memoria es genérico de las formas monomérica, dimerica y multimérica.

El término “variante de Fc” designa una molécula o secuencia que está modificada a partir de un Fc nativo, pero que sigue comprendiendo un sitio de unión para el receptor silvestre, FcRn. Las solicitudes internacionales WO 97/34631

(publicada el 25 de septiembre de 1997) y WO 96/32478 describen variantes de Fc ejemplares, así como la interacción con el receptor silvestre.

Por tanto, el término “variante de Fc” comprende una molécula o secuencia que está humanizada a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende sitios que pueden eliminarse porque proporcionan rasgos estructurales o una actividad biológica que no son necesarios para las moléculas de fusión de la presente invención. Por tanto, el término “variante de Fc” comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc nativo que afectan a o están implicados en (1) la formación de enlace disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula hospedadora seleccionada, (3) la heterogeneidad N-terminal tras expresión en una célula hospedadora seleccionada, (4) la glucosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor de Fc distinto del receptor silvestre o (7) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). Las variantes de Fc se describen con más detalle más adelante en la presente memoria.

Un “peptidomimético” es un análogo peptídico que ostenta propiedades farmacológicas más favorables que sus péptidos nativos prototípicos tales como a) estabilidad metabólica, b) buena biodisponibilidad, c) alta afinidad de receptor y selectividad de receptor y d) mínimos efectos secundarios. Son conocidos en la materia el diseño de peptidomiméticos y los métodos de producción de los mismos (véanse, por ejemplo, los documentos U.S.P.N. 6.407.059 y 6.420.118). Los peptidomiméticos pueden derivarse del sitio de unión del dominio extracelular de LDCAM, B7L-1 o CRTAM. Un peptidomimético puede comprender compuestos no peptídicos que tienen la misma estructura tridimensional que los péptidos derivados de LDCAM, B7L-1 o CRTAM, o compuestos en que parte de un péptido de las moléculas enumeradas anteriormente se reemplaza por un resto no peptídico que tiene la misma estructura tridimensional.

Un “mimotopo” se define en la presente memoria como secuencias peptídicas que imitan sitios de unión en proteínas (véase Partidos, CD, *et al.*, “Combinatorial Chem & High Throughput Screening”, 2002 5: 15-27). Un mimotopo puede tener la capacidad de imitar un sitio de unión dependiente de la conformación de una proteína. Las secuencias de estos mimotopos no identifican una secuencia nativa lineal continua ni aparecen necesariamente en una proteína de origen natural. Los mimotopos y sus métodos de producción se enseñan en los documentos U.S.P.N. 5.877.155 y U.S.P.N. 5.998.577.

El término “residuo ácido” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que comprenden grupos ácidos. Los residuos ácidos ejemplares incluyen D y E.

El término “residuo amídico” designa aminoácidos en forma D o L que tienen cadenas laterales que comprenden derivados amídicos de grupos ácidos. Los residuos ejemplares incluyen N y Q.

El término “residuo aromático” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que comprenden grupos aromáticos. Los residuos aromáticos ejemplares incluyen F, Y y W.

El término “residuo básico” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que comprenden grupos básicos. Los residuos básicos ejemplares incluyen H, K y R.

El término “residuo hidrófilo” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que comprenden grupos polares. Los residuos hidrófilos ejemplares incluyen C, S, T, N y Q.

El término “residuo no funcional” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que carecen de grupos ácidos, básicos o aromáticos. Los residuos aminoacídicos no funcionales ejemplares incluyen M, G, A, V, I, L y norleucina (Nle).

El término “residuo hidrófobo neutro” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que carecen de grupos básicos, ácidos o polares. Los residuos aminoacídicos hidrófobos neutros ejemplares incluyen A, V, L, I, P, W, M y F.

El término “residuo hidrófobo polar” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que comprenden grupos polares. Los residuos aminoacídicos hidrófobos polares ejemplares incluyen T, G, S, Y, C, Q y N.

El término “residuo hidrófobo” designa residuos aminoacídicos en forma D o L que tienen cadenas laterales que carecen de grupos básicos o ácidos. Los residuos aminoacídicos hidrófobos ejemplares incluyen A, V, L, I, P, W, M, F, T, G, S, Y, C, Q y N.

El término “sujeto”, como se usa en la presente memoria, designa mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos contemplados por la presente invención incluyen seres humanos; primates; mascotas de todo tipo tales como perros, gatos, etc.; animales domesticados tales como ovejas, vacas, cabras, cerdos, caballos y similares; animales de laboratorio comunes tales como ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, etc.; así como animales en cautividad tales como en un zoológico o animales salvajes libres. A lo largo de la memoria descriptiva, el término hospedador se usa intercambiamente con sujeto.

“Aislado” significa que la LDCAM, antagonista de LDCAM o agonista de LDCAM está exento de asociación con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo, como un producto de purificación de un cultivo de células hospedadoras recombinantes o como un extracto purificado.

5 Como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto establezca claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una inmunización” incluye una pluralidad de dichas inmunizaciones y la referencia a “la célula” incluye la referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidas por el especialista en la materia, y así. Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un especialista en la materia a la que pertenece esta invención a menos que se indique claramente otra cosa.

10 Por claridad, se proporcionan otras definiciones a lo largo de la memoria descriptiva para mantener el término en el contexto apropiado de la descripción.

Se entiende que las diversas realizaciones de esta invención no están limitadas a la metodología, protocolos, estirpes celulares, especies o géneros animales, constructos y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar. Se entiende también que la terminología usada en la presente memoria es solo con el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

2. Antagonistas y agonistas de LDCAM

Un “antagonista”, como se define en la presente memoria, es una molécula que bloquea parcial o completamente la unión de dos asociados, inhibiendo así los efectos biológicos posteriores de la interacción de los asociados. Por ejemplo, un antagonista puede bloquear la unión de un ligando a su receptor, que a su vez reduce y/o evita la señalización intracelular mediante la activación de ese receptor, que a su vez reduce o evita los efectos biológicos posteriores de la activación de ese receptor tales como, pero sin limitación, activación, proliferación o diferenciación celulares, liberación de citocinas, regulación positiva de genes, expresión de proteínas en superficie celular y similares. Por supuesto, un antagonista puede bloquear la interacción de otras formas de asociados, tales como moléculas de adhesión.

Por lo tanto, un “antagonista de LDCAM” es una molécula que antagoniza una o más de las actividades biológicas de LDCAM. Un antagonista de LDCAM incluye, pero sin limitación: anticuerpos específicos de LDCAM, pepticuerpos específicos de LDCAM o polipéptidos solubles que se unen a LDCAM (tales como polipéptidos de LDCAM, CRTAM, B7L-4 y B7L-1) que bloquean parcial o completamente la unión de LDCAM a uno o más copartícipes de unión de LDCAM (tales como, pero sin limitación, LDCAM, CRTAM, B7L-4 y/o B7L-1). Un antagonista de LDCAM que bloquea la unión entre LDCAM y CRTAM no activa la CRTAM, tal como mediante unión a CRTAM y reticulación del receptor de CRTAM. Los ejemplos adicionales incluyen: anticuerpos específicos de CRTAM, pepticuerpos específicos de CRTAM o polipéptidos solubles de CRTAM que se unen a LDCAM y bloquean parcial o completamente la unión entre LDCAM y CRTAM; anticuerpos específicos de B7L-1, pepticuerpos específicos de B7L-1 o polipéptidos solubles de B7L-1 que se unen a LDCAM y bloquean parcial o completamente la unión entre LDCAM y B7L-1 u otros copartícipes de unión de LDCAM tales como CRTAM; anticuerpos específicos de B7L-4, pepticuerpos específicos de B7L-4 o polipéptidos solubles de B7L-4 que se unen a LDCAM y bloquean parcial o completamente la unión entre LDCAM y B7L-4 u otros copartícipes de unión de LDCAM tales como CRTAM. Los antagonistas presentados en la presente memoria comprenden polipéptidos solubles, anticuerpos, proteínas de fusión y pepticuerpos aislados dirigidos contra una o más de las siguientes: LDCAM, B7L-1, B7L-4 o CRTAM. Los antagonistas presentados en la presente memoria comprenden adicionalmente moléculas pequeñas, tales como peptidomiméticos y mimotopos y similares, que antagonizan la interacción entre LDCAM, B7L-1, B7L-4 o CRTAM. Los antagonistas adicionales comprenden oligonucleótidos anticodificantes que se orientan específicamente a e hibridan con el ARNm de LDCAM, B7L-1, B7L-4 o CRTAM, evitando así la traducción génica de sus proteínas respectivas. Realizaciones adicionales comprenden silenciamiento génico por moléculas de ARN interferente adaptadas para silenciar la expresión de LDCAM, B7L-1, B7L-4 o CRTAM. Se proporcionan en las secciones siguientes definiciones y ejemplos más específicos de antagonistas particulares.

Un “agonista”, como se define en la presente memoria, es una molécula que activa los efectos biológicos posteriores a la interacción de los asociados. Por ejemplo, un agonista puede imitar la unión de un ligando a su receptor, lo que causa la señalización intracelular mediante la activación de ese receptor, lo que a su vez afecta a los efectos biológicos posteriores de la activación de ese receptor tales como, pero sin limitación, activación, proliferación o diferenciación celulares, liberación de citocinas, regulación positiva de genes, expresión de proteínas en superficie celular y similares. Como alternativa, el agonista puede unirse a un sitio que esté adyacente a cualquiera de los sitios de unión respectivos del asociado e inducir un cambio conformacional en esa proteína celular, potenciando así su actividad biológica. Por ejemplo, un agonista puede unirse a la LDCAM, pero no bloquear la unión entre LDCAM/LDCAM o LDCAM/CRTAM o LDCAM/B7L-1, y causar un cambio conformacional en la LDCAM tal que se potencie la unión entre LDCAM/LDCAM o LDCAM/CRTAM o LDCAM/B7L-1, tal como mediante una afinidad o avidez aumentada entre los pares de unión.

Por lo tanto, un "agonista de LDCAM" es una molécula que antagoniza una o más de las actividades biológicas de LDCAM. Un agonista de LDCAM incluye, pero sin limitación: anticuerpos específicos de LDCAM, pepticuerpos específicos de LDCAM o polipéptidos solubles que se unen a LDCAM que afectan a los efectos biológicos posteriores de la unión de LDCAM a sus uno o más copartícipes de unión de LDCAM (tales como, pero sin limitación, LDCAM, CRTAM, B7L-4 y/o B7L-1). Los ejemplos adicionales incluyen: anticuerpos específicos de CRTAM, anticuerpos específicos de CRTAM que son capaces de reticular CRTAM sobre la superficie de células y de activar el receptor; pepticuerpos específicos de CRTAM o polipéptidos solubles que se unen a CRTAM (tales como LDCAM) que afectan a los efectos biológicos posteriores de la unión de CRTAM a uno o más de los copartícipes de unión de CRTAM, tales como LDCAM. Realizaciones adicionales de agonistas de LDCAM incluyen proteínas de fusión de LDCAM solubles tales como, pero sin limitación, el dominio extracelular de LDCAM ligado con un dominio Fc (como se describe a continuación). Realizaciones adicionales incluyen aquellos agonistas de LDCAM que tienen la capacidad de unirse a CRTAM y reticular el receptor de CRTAM sobre la superficie de células y de activar el receptor. Dichos agonistas de LDCAM incluyen anticuerpos y pepticuerpos específicos de CRTAM y proteínas de fusión de LDCAM-Fc capaces de reticular y activar el receptor de CRTAM. Realizaciones adicionales incluyen polipéptidos multiméricos de LDCAM que se unen a CRTAM y tienen la capacidad de reticular y activar los receptores de CRTAM sobre la superficie de células. Los agonistas presentados en la presente memoria comprenden polipéptidos solubles, anticuerpos, proteínas de fusión y pepticuerpos aislados dirigidos contra una o más de las siguientes: LDCAM, B7L-1 o CRTAM. Los agonistas presentados en la presente memoria comprenden adicionalmente moléculas pequeñas, tales como peptidomiméticos y mimotopos y similares, que agonizan la interacción entre LDCAM, B7L-1 o CRTAM. Agonistas adicionales comprenden oligonucleótidos anticodificantes que se orientan a e hibridan específicamente con el ARNm de LDCAM, B7L-1 o CRTAM, evitando así la traducción génica de sus proteínas respectivas. Realizaciones adicionales comprenden silenciamiento génico mediante moléculas de ARN interferente adaptadas para silenciar la expresión de LDCAM, B7L-1 o CRTAM. Se proporcionan en las secciones siguientes definiciones y ejemplos específicos de agonistas particulares.

Como tal, puede usarse un antagonista o agonista de LDCAM para antagonizar o agonizar uno o más de los siguientes: unión de LDCAM a LDCAM (tal como mediante agregación homotípica); unión de LDCAM a CRTAM; unión de LDCAM a B7L-1; actividad de linfocitos T tal como activación y proliferación; respuestas de linfocitos T frente a estímulos de activación; respuestas de linfocitos T frente a la estimulación/activación de CD3; respuestas de linfocitos T frente a la estimulación/activación de mitógeno; actividad de linfocitos NK-T; actividad de linfocitos NK; actividad de linfocitos B; expresión de citocinas por células inmunitarias tales como, pero sin limitación, IL-2, INF-gamma y otras citocinas proinflamatorias; actividad entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T; actividad entre células dendríticas y linfocitos T; actividad entre células dendríticas BDCA3+ y linfocitos T; actividad entre células presentadoras de antígeno y linfocitos NK-T; actividad entre células dendríticas y linfocitos NK-T; actividad entre células dendríticas BDCA3+ y linfocitos NK-T; actividad entre células dendríticas y linfocitos NK; actividad entre células dendríticas BDCA3+ y linfocitos NK; actividad entre neuronas y linfocitos T; actividad entre neuronas y linfocitos NK-T y actividad entre neuronas y linfocitos NK.

2.1 Anticuerpos de LDCAM, CRTAM o B7L-1

Pueden usarse anticuerpos que son inmunorreactivos con LDCAM, CRTAM o B7L-1 como antagonistas o agonistas de LDCAM. Una realización particular comprende un anticuerpo de scfv específico de LDCAM, designado como 1F12. La secuencia de scfv de 1F12 se presenta en la Figura 6. Es una realización alternativa la proteína de fusión scfv-Fc de 1F12 (a veces designada como el maxicuerpo 1F12). El anticuerpo scfv de 1F12 se usó para aislar un nuevo subconjunto de células dendríticas en seres humanos que son la contrapartida humana de las células dendríticas CD8 α ⁺ de ratón. Este subconjunto de células dendríticas se designa como células dendríticas BDCA3+.

Las células dendríticas (DC) constituyen una población heterogénea de células presentadoras de antígeno profesionales que controlan la sensibilización y tolerancia de linfocitos T. En ratones, las DC pueden subdividirse en al menos tres subconjuntos funcionales distintos según la expresión en superficie de antígenos CD4 y CD8 α . Al contrario que otros subconjuntos de DC de ratón, las DC CD8 α ⁺ exhiben la capacidad única de englobar cuerpos apoptóticos y se cree por tanto que desempeñan un papel crítico en la presentación cruzada de antígeno. Se describe en la presente memoria un enfoque de selección celular/exposición en fago para orientarse a e identificar antígenos de superficie novedosos expresados específicamente en subconjuntos de DC de sangre humana. Se muestra que un anticuerpo (1F12) se orienta a un antígeno de superficie presente tanto en DC de sangre humana BDCA3⁺ como en células HLA-DR⁺ CD13⁺ en la zona de linfocitos T del bazo y los nódulos linfáticos. Estas células pueden ser representaciones espacialmente distintas de la misma subpoblación de DC humanas. En ratón, 1F12 marca específicamente un raro subconjunto de leucocitos sanguíneos, así como DC CD8 α ⁺ esplénicas. El 1F12 inmunoprecipita una proteína de superficie de 100 kDa, que se reconoció por espectrometría de masas como LDCAM. Las DC LDCAM⁺ tanto de ratón como humanas expresan CD11c pero no CD11b. Expresan también únicamente un panel común de diez genes específicos, reforzando por tanto la noción de que representan poblaciones equivalentes de células. Finalmente, al contrario que cualquier otro subconjunto de DC humanas, las DC LDCAM⁺ humanas pueden internalizar eficazmente cuerpos apoptóticos. Se concluye que la expresión de LDCAM define una población única de DC en ratón y ser humano que comparte características fenotípicas, histológicas y funcionales.

El subconjunto de DC aisladas y fenotipadas (véase la Figura 1) tiene papeles inmunológicos significativos, incluyendo ser la fuente principal de producción de IL-12 en respuesta a patógenos *in vivo*; ser responsable de la presentación cruzada *in vivo* de antígenos frente a linfocitos T CD8+; ser capaz de fagocitar cuerpos apoptóticos *in vivo* y ser responsable de la inducción de tolerancia en condiciones de estado estacionario (tales como en ausencia de inflamación).

Los anticuerpos de DC BDCA3+ pueden usarse en una variedad de entornos de investigación, clínicos y terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, modular la función de DC BDCA3+ para influir en el resultado de las respuestas inmunitarias, tales como orientar las DC BDCA3+ con el anticuerpo 1F12 ligado a un antígeno y suministrar específicamente por tanto el antígeno a la población de DC BDCA3+. Este proceso puede conferir inmunotolerancia al sujeto frente a ese antígeno. Como alternativa, en presencia de señales inflamatorias, el antígeno diana elevaría las respuestas inmunitarias específicas de antígeno frente a ese antígeno. El anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse con fines de pronóstico, tales como la cuantificación comparativa o relativa de DC BDCA3+ en tejidos normales y patológicos. El anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse para purificar o aislar DC BDCA3+ de diversos fluidos corporales, órganos y tejidos. Las DC BDCA3+ pueden usarse entonces en diversas inmunoterapias basadas en células mediante la manipulación de las células *ex vivo* y la reinfusión de las células manipuladas de vuelta al sujeto. El anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse para agotar las DC BDCA3+ *in vivo* o interferir con su función inmunológica tal como, pero sin limitación, sensibilización de linfocitos T, migración de DC, presentación cruzada de antígenos frente a linfocitos T, especialmente linfocitos T CD8+. Debido a que a la presentación cruzada de antígenos y la tolerancia cruzada de antígenos son mecanismos celulares básicos para muchas enfermedades autoinmunitarias, trasplantes y cáncer, el anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse para tratar estos trastornos mediante la modulación de las respuestas inmunitarias a través de DC BDCA3+.

Además, el anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse en terapia celular *ex vivo*. Las DC BDCA3+ pueden aislarse con el anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM, manipularse *ex vivo* y reintroducirse en el paciente para tratar la enfermedad. Solo con fines ejemplares, podría anularse la inmunotolerancia al cáncer exponiendo las DC BDCA3+ aisladas frente a antígenos del cáncer (tales como, pero sin limitación, aquellos presentados en la Tabla 2 siguiente) e infundiendo las DC BDCA3+/antígeno del cáncer procesado de vuelta al paciente. El antígeno del cáncer puede derivar del paciente y puede estar en forma de células cancerosas. Se ha mostrado que las DC BDCA3+ son capaces de fagocitar células apoptóticas y probablemente presentarán dicho antígeno exógeno frente a linfocitos T CD8+ para generar CTL efectores específicos del cáncer.

Tabla 2

Categoría de antígeno	Algunos ejemplos específicos de antígenos representativos
Virus	rotavirus; glosopeda; gripe, incluyendo gripe A y B; paragripe; especies de herpes (<i>Herpes simplex</i> , virus de Epstein-Barr, viruela aviar, seudorrabia, citomegalovirus); rabia; poliomielitis; hepatitis A; hepatitis B; hepatitis C; hepatitis E; sarampión; moquillo; encefalomiелitis equina venezolana; virus de leucemia felina; reovirus; virus respiratorio sincitial; virus respiratorio sincitial bovino; virus de la fiebre de Lassa; poliomavirus tumoral; parvovirus; parvovirus caninos; papilomavirus; encefalitis transmitida por garrapatas; peste bovina; especies de rinovirus humanas; especies de enterovirus; virus de Mengo; paramixovirus; virus de la bronquitis infecciosa aviar; HTLV 1; VIH-1; VIH-2; LCMV (virus de coriomeningitis linfocítica); adenovirus; togavirus (rubéola, fiebre amarilla, fiebre del dengue); coronavirus
Bacterias	<i>Bordetella pertussis</i> ; <i>Brucella abortis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; especies de <i>Salmonella</i> incluyendo <i>Salmonella typhi</i> ; estreptococos; especies de <i>Vibrio</i> (<i>V. cholera</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>); especies de <i>Shigella</i> ; especies de <i>Pseudomonas</i> ; especies de <i>Brucella</i> ; especies de <i>Mycobacteria</i> (<i>tuberculosis</i> , <i>avium</i> , BCG, lepra); neumococos; estafilococos; especies de <i>Enterobacter</i> ; <i>Rochalimaia henselae</i> ; especies de <i>Pasteurella</i> (<i>P. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i>); especies de <i>Chlamydia</i> (<i>C. trachomatis</i> , <i>C. psittaci</i> , <i>Lymphogranuloma venereum</i>); sífilis (<i>Treponema pallidum</i>); especies de <i>Haemophilus</i> ; especies de <i>Mycoplasma</i> ; enfermedad de Lyme (<i>Borrelia burgdorferi</i>); enfermedad del legionario; botulismo (<i>Clostridium botulinum</i>); <i>Corynebacterium diphtheriae</i> ; <i>Yersinia enterocolitica</i>
Infecciones por Rickettsia	rickettsiosis exantemática americana; tifus; especies de <i>Ehrlichia</i>
Parásitos y protozoos	malaria (<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i>); esquistosomas; tripanosomas; especies de <i>Leishmania</i> ; nematodos filariales; triquomoniasis; sarcoesporidiasis; especies de <i>Taenia</i> (<i>T. saginata</i> , <i>T. solium</i>); <i>Toxoplasma gondii</i> ; triquinelosis (<i>Trichinella spiralis</i>); coccidiosis (especies de <i>Eimeria</i>)

Hongos	<i>Cryptococcus neoformans</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Apergillus fumigatus</i> ; coccidioidomycosis
Proteínas recombinantes	<i>Herpes simplex</i> ; virus de Epstein-Barr; hepatitis B; seudorrabia; flavivirus (dengue, fiebre amarilla); <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ; malaria: proteína del circumesporozoíto, proteína del merozoíto; proteína de antígeno de superficie de tripanosoma; tos ferina; alfavirus; adenovirus
Proteínas	toxóide de difteria; toxóide de tétanos; proteína de membrana externa meningocócica (PME); proteína M espectrocócica; hepatitis B; hemaglutinina de gripe; antígeno del cáncer; antígenos tumorales; toxinas; exotoxinas; neurotoxinas; citocinas y receptores de citocinas; monocinas y receptores de monocinas
Péptidos sintéticos	malaria; gripe; glosopeda; hepatitis B; hepatitis C
Polisacáridos	polisacárido neumocócico; polirribosilribitolfosfato (PRP) de <i>Haemophilus influenzae</i> ; <i>Neisseria meningitidis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Oligosacáridos	neumocócicos
Alergenos	pólenes de planta; caspa animal; ácaros del polvo, antígenos de especies de <i>Blattella</i> (Blag 1, 2 o 5), antígenos de especies de <i>Periplaneta</i> (Per a 1)
Ag del cáncer humanos	antígenos limitados a la clase I reconocidos por linfocitos CD8+: antígenos de diferenciación de melanoma-melanocito (MART-1/melano A; gp100/pmel-17; tirosinasa; proteína relacionada con tirosinasa 1; proteína relacionada con tirosinasa 2; receptor de hormona estimulante de melanocitos); antígenos de cáncer de testículo (MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-12, BAGE; CAGE, NYESO-1); antígenos mutados (β -catenina; MUM-1; CDK-4; caspasa-8; KIA 0205; HLA-A2-R1701) y antígenos compartidos no mutados sobreexpresados en cánceres (α -fetoproteína; proteína catalítica de telomerasa; G-250; MUC-1; antígeno carcinoembrionario; p53; Her-2/neu). Antígenos limitados a la clase II reconocidos por linfocitos CD4+: epítomos de proteínas no mutadas (gp100; MAGE-1; MAGE-3; tirosinasa; NY-ESO-1) y epítomos de proteínas mutadas (triosafosfato isomerasa; CDC-27; LDLR-FUT)
Agentes infecciosos como Ag del cáncer	bacterias: <i>Helicobacter pylori</i> (cáncer gástrico y linfoma) virus: papilomavirus humano (cánceres cervicouterino y anal); virus de la hepatitis B y C (cáncer de hígado); VIH (sarcoma de Kaposi, linfoma no hodgkiniano); herpesvirus humano de tipo B (sarcoma de Kaposi); virus de Epstein-Barr (linfomas); virus linfotrópico de linfocitos T humanos (leucemia de linfocitos T en adultos) parásitos: esquistosomas (cáncer de vejiga); trematodos hepáticos (colangiocarcinoma)

El anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse para suministrar fármacos o toxinas a DC BDCA3+, que a su vez influirían en las respuestas inmunitarias posteriores.

- Realizaciones alternativas incluyen anticuerpos que son agonistas o antagonistas que se unen a polipéptidos de LDCAM, fragmentos de polipéptidos de LDCAM, variantes de polipéptidos de LDCAM, etc. y modulan las actividades biológicas descritas en la definición de actividad biológica. Realizaciones alternativas de antagonistas y agonistas de LDCAM incluyen anticuerpos que se unen a polipéptidos de CRTAM, fragmentos de polipéptidos de CRTAM, variantes de polipéptidos de CRTAM, etc. y modulan las actividades biológicas descritas en la definición de actividad biológica. Dichos anticuerpos se unen específicamente a los polipéptidos mediante los sitios de unión a antígeno del anticuerpo (en contraposición con la unión no específica). Por ejemplo, son anticuerpos específicos de LDCAM aquellos que reconocerán específicamente y se unirán a polipéptidos, homólogos y variantes de LDCAM, pero no a otras moléculas. En una realización preferida, los anticuerpos son específicos de los polipéptidos de la presente invención y no reaccionan de forma cruzada con otros polipéptidos. De esta manera, los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, etc. de LDCAM como se exponen anteriormente pueden emplearse como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunorreactivos con los mismos.
- Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, polipéptidos de fusión, etc. contienen determinantes antigénicos o epítomos que desencadenan la formación de anticuerpos. Estos determinantes antigénicos o epítomos pueden ser lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítomos lineales están compuestos por una sola sección de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítomos conformacionales o discontinuos están compuestos por secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena polipeptídica que se ponen en estrecha proximidad tras el plegamiento de polipéptido (Janeway y Travers, "Immuno Biology" 3: 9 (Garland Publishing Inc., 2ª ed. 1996)). Debido a que los polipéptidos plegados tienen superficies complejas, el número de epítomos disponibles es bastante numeroso; sin embargo, debido a la conformación del polipéptido y a los impedimentos estéricos, el número de anticuerpos que se une realmente a los epítomos es menor que el número de los epítomos disponibles (Janeway y Travers, "Immuno Biology" 2: 14 (Garland Publishing Inc., 2ª ed. 1996)). Los epítomos pueden identificarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia.

Dichos epítomos son útiles para generar anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, como se describe como más detalle a continuación. Adicionalmente, pueden usarse epítomos de los polipéptidos de la invención como reactivos de investigación, en ensayos y para purificar anticuerpos de unión específica de sustancias tales como sueros policlonales o sobrenadantes de hibridomas cultivados. Dichos epítomos o variantes de los mismos pueden producirse usando técnicas bien conocidas en la materia tales como síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido o usando tecnología de ADN recombinante.

En cuanto a los anticuerpos que pueden desencadenarse por los epítomos de los polipéptidos de la invención, tanto si los epítomos se han aislado como si permanecen como parte de los polipéptidos, pueden prepararse tanto anticuerpos policlonales como monoclonales mediante técnicas convencionales. Véanse, por ejemplo, "Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses", Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980) y "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Kohler y Milstein, (patente de EE.UU. n.º 4.376.110); la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001-3005; Cole *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, 1985, "Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96). Las estirpes celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos de los polipéptidos de la invención están también contempladas en la presente memoria. Dichos hibridomas pueden producirse e identificarse mediante técnicas convencionales. El hibridoma productor del mAb de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de altos valores de mAb *in vivo* hace a éste el método actualmente preferido de producción. Un método para producir dicha estirpe celular de hibridoma comprende inmunizar un animal con un polipéptido, recoger las células de bazo del animal inmunizado, fusionar dichas células de bazo con una estirpe celular de mieloma, generando así células de hibridoma, e identificar una estirpe celular de hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se une al polipéptido. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores mediante inyección con uno o más de los siguientes: un polipéptido de LDCAM, un fragmento de un polipéptido de LDCAM, un equivalente funcional de un polipéptido de LDCAM, una forma variante de LDCAM o una forma mutante de un polipéptido de LDCAM; un polipéptido de CRTAM, un fragmento de un polipéptido de CRTAM, un equivalente funcional de un polipéptido de CRTAM o una forma mutante de un polipéptido de CRTAM. Dichos animales hospedadores pueden incluir, pero sin limitación, conejos, conejillos de indias, ratones y ratas. Pueden usarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de hospedador, incluyendo pero sin limitación coadyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa bocallave, dinitrofenol y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Los anticuerpos monoclonales pueden recuperarse mediante técnicas convencionales. Dichos anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" de LDCAM o CRTAM (Takeda *et al.*, 1985, *Nature*, 314: 452-454; Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Boulianne *et al.*, 1984, *Nature* 312: 643-646; Neuberger *et al.*, 1985, *Nature* 314: 268-270) mediante corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de una actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en que diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un mAb porcino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen también versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales de murino. Dichos anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante técnicas conocidas y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a seres humanos. Un anticuerpo monoclonal humanizado puede comprender la región variable de un anticuerpo de murino (o solo el sitio de unión a antígeno del mismo) y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Como alternativa, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de unión a antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y otros genomanipulados incluyen aquellos descritos en Riechmann *et al.* (*Nature* 332: 323, 1988), Liu *et al.* (*PNAS* 84: 3439, 1987), Larrick *et al.* (*Bio/Technology* 7: 934, 1989) y Winter y Harris (*TIPS* 14: 139, Can, 1993). Se discuten también técnicas útiles para humanizar anticuerpos en la patente de EE.UU. n.º 6.054.297. Pueden encontrarse procedimientos para generar transgénicamente anticuerpos en el documento GB 2.272.440, las patentes de EE.UU. n.º 5.569.825 y 5.545.806 y patentes relacionadas. Preferiblemente, para uso en seres humanos, los anticuerpos son humanos o humanizados; son también bien conocidas las técnicas para crear dichos anticuerpos humanos o humanizados y están comercialmente disponibles, por ejemplo, en Medarex Inc. (Princeton, NJ) y Abgenix Inc. (Fremont, CA).

Pueden producirse anticuerpos totalmente humanos para uso en seres humanos mediante cribado de una colección de dominios variables de anticuerpo humano usando métodos de exposición en fago (Vaughan *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16(6): 535-539 y patente de EE.UU. n.º 5.969.108), métodos de exposición en ribosoma (Schaffitzel *et al.*, 1999, *J. Immunol. Methods* 231(1-2): 119-135) o métodos de exposición en ARNm (Wilson *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(7): 3750-3755). Se describe en el ejemplo 18 un ejemplo de un anticuerpo de scfv anti-LDCAM producido mediante métodos de exposición en fago.

Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno que reconocen epítomos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero sin limitación: los fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos (ab')₂. Como alternativa, pueden construirse colecciones de expresión de Fab (Huse *et al.*, 1989, Science, 246:1275-1281) para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada. Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE.UU. n° 4.946.778; Bird, 1988, Science 242: 423-426; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 y Ward *et al.*, 1989, Nature 334: 544-546) pueden adaptarse también para producir anticuerpos monocatenarios contra productos génicos de LDCAM. Los anticuerpos monocatenarios se forman ligando los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente aminoacídico, dando como resultado un polipéptido monocatenario. Dichos anticuerpos monocatenarios pueden ser también útiles intracelularmente (concretamente, como "intracuerpos"), por ejemplo como se describe por Marasco *et al.* (J. Immunol. Methods 231: 223-238, 1999) para terapia génica en infección por VIH. Además, los anticuerpos del polipéptido de LDCAM pueden utilizarse, a su vez, para generar anticuerpos antiidiotípicos que "imiten" al polipéptido de LDCAM y que puedan unirse a los coparticipes de unión del polipéptido de LDCAM usando técnicas bien conocidas por los especialistas en la materia (véanse, por ejemplo, Greenspan & Bona, 1993, FASEB J. 7(5): 437-444 y Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8): 2429-2438).

Los anticuerpos que son inmunorreactivos con los polipéptidos descritos anteriormente incluyen anticuerpos biespecíficos (concretamente, anticuerpos que son inmunorreactivos con los polipéptidos a través de un primer dominio de unión a antígeno y que son también inmunorreactivos con un polipéptido diferente a través de un segundo dominio de unión a antígeno). Se han preparado una variedad de anticuerpos biespecíficos y se han encontrado útiles tanto *in vitro* como *in vivo* (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.807.706 y Cao y Suresh, 1998, Bioconjugate Chem. 9: 635-644). Son conocidos en la materia numerosos métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos, incluyendo el uso de hibridomas híbridos tales como cuadromas, que se forman fusionando dos hibridomas diferentes, y triomas, que se forman hibridando un hibridoma con un linfocito (Milstein y Cuello, 1983, Nature 305: 537-540; patente de EE.UU. n° 4.474.893 y patente de EE.UU. n° 6.106.833). La patente de EE.UU. n° 6.060.285 da a conocer un proceso para la producción de anticuerpos biespecíficos en que se transfectan al menos los genes de la cadena ligera y la porción variable de la cadena pesada de un anticuerpo que tiene una primera especificidad en una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo que tiene una segunda especificidad. Se ha usado también el acoplamiento químico de fragmentos de anticuerpo para preparar moléculas de unión a antígeno que tienen especificidad por dos antígenos diferentes (Brennan *et al.*, 1985, Science 229: 81-83; Glennie *et al.*, J. Immunol., 1987, 139: 2367-2375 y la patente de EE.UU. n° 6.010.902). Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse también por medios recombinantes, por ejemplo, usando los restos de cremallera de leucina de las proteínas *Fos* y *Jun* (que forman preferiblemente heterodímeros) como se describe por Kostelny *et al.* (J. Immunol. 148: 1547-4553; 1992). La patente de EE.UU. n° 5.582.996 da a conocer el uso de dominios interactivos complementarios (tales como restos de cremallera de leucina u otras estructuras de dominio interactivo de cerradura y llave) para facilitar la formación de heterodímeros en la producción de anticuerpos biespecíficos. Pueden prepararse moléculas biespecíficas tetravalentes mediante la fusión de ADN que codifica la cadena pesada de un fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo con ADN que codifica la cadena pesada de una segunda molécula de F(ab')₂ (en que el dominio CH1 está reemplazado por un dominio CH3), o con ADN que codifica un fragmento Fv monocatenario de un anticuerpo, como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.959.083. La expresión de los genes de fusión resultantes en células de mamífero, junto con los genes de las correspondientes cadenas ligeras, proporciona moléculas biespecíficas tetravalentes que tienen especificidad por antígenos seleccionados. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse también como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.807.706. Generalmente, el método implica introducir una protuberancia (construida reemplazando cadenas laterales aminoacídicas pequeñas por cadenas laterales mayores) en la interfase de un primer polipéptido y la correspondiente cavidad (preparada reemplazando las cadenas laterales aminoacídicas grandes por pequeñas) en la interfase de un segundo polipéptido. Además, se han preparado fragmentos variables monocatenarios (scfv) uniendo covalentemente dos dominios variables; los fragmentos de anticuerpo resultantes pueden formar dímeros o trímeros, dependiendo de la longitud del ligador flexible entre los dos dominios variables (Kortt *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 423-433).

Son bien conocidos los procedimientos de cribado mediante los que pueden identificarse dichos anticuerpos, y pueden implicar cromatografía por inmutofinidad, por ejemplo. Pueden cribarse en los anticuerpos las propiedades agonistas (concretamente, imitadoras de ligando). Dichos anticuerpos, tras la unión a porciones de la superficie celular de polipéptidos de LDCAM, inducen efectos biológicos (por ejemplo, la transducción de señales biológicas) similares a los efectos biológicos inducidos cuando el coparticipes de unión de LDCAM se une a polipéptidos de LDCAM. Los anticuerpos agonistas pueden usarse para inducir las rutas estimuladoras celulares mediadas por LDCAM o la comunicación intercelular. Los anticuerpos biespecíficos pueden identificarse cribando con dos ensayos separados, o con un ensayo en el que el anticuerpo biespecífico sirve como puente entre el primer antígeno y el segundo antígeno (el segundo está acoplado con un resto detectable). Los anticuerpos biespecíficos que se unen a polipéptidos de LDCAM de la invención a través de un primer dominio de unión a antígeno serán útiles en aplicaciones de diagnóstico y en el tratamiento de autoinmunidad, inflamación y cáncer, como se describe con más detalle a continuación.

Aquellos anticuerpos que pueden bloquear la unión de polipéptidos de LDCAM a copartícipes de unión de LDCAM tales como, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1 y CRTAM, pueden usarse para inhibir la unión celular mediada por LDCAM, B7L-1 y/o CRTAM, la comunicación intercelular o la estimulación celular resultante de dicha unión. Dichos anticuerpos de bloqueo pueden identificarse usando cualquier procedimiento de ensayo adecuado, tal como ensayando en anticuerpos su capacidad de inhibir la unión de LDCAM a ciertos copartícipes de unión tales como, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1 y CRTAM. Puede ensayarse en los anticuerpos la capacidad de inhibir las rutas estimulatorias celulares mediadas por el copartícipe de unión de LDCAM, tales como las descritas en los ejemplos. Dicho anticuerpo puede emplearse en un procedimiento *in vitro* o administrarse *in vivo* para inhibir la actividad biológica mediada por la entidad que generó el anticuerpo. Pueden tratarse por tanto los trastornos causados o exacerbados (directa o indirectamente) por la interacción de LDCAM con un copartícipe de unión de superficie celular tal como, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1 y CRTAM. Un procedimiento terapéutico implica la administración *in vivo* de un anticuerpo bloqueante a un mamífero en una cantidad eficaz para inhibir la actividad biológica mediada por el copartícipe de unión de LDCAM. Se prefieren generalmente anticuerpos monoclonales para uso en dichos metodos terapéuticos. Puede emplearse un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno tal como el anticuerpo de scfv-Fc descrito en los ejemplos. Se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden un anticuerpo que está dirigido contra LDCAM y un diluyente, excipiente o portador fisiológicamente aceptable. Los componentes adecuados de dichas composiciones son como se describe a continuación para composiciones que contienen polipéptidos de LDCAM.

Se proporcionan también en la presente memoria conjugados que comprenden un agente detectable (por ejemplo, de diagnóstico) o terapéutico enlazado con el anticuerpo específico de LDCAM. Se presentan anteriormente ejemplos de dichos agentes. Los conjugados encuentran uso en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos descritos anteriormente pueden usarse también en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos como se describen en la presente memoria, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los anticuerpos pueden emplearse también para purificar polipéptidos o fragmentos de la invención mediante cromatografía por inmunoafinidad.

2.2 Peptidocuerpos de LDCAM, CRTAM, B7L-4 o B7L-1

Un antagonista o agonista de LDCAM puede estar en forma de un peptidocuerpo dirigido contra LDCAM, CRTAM, B7L-4 o B7L-1. Realizaciones de agonista de LDCAM adicionales incluyen peptidocuerpos dirigidos a CRTAM que tienen la capacidad de unirse a y activar CRTAM sobre la superficie de células tal como, pero sin limitación, reticulando CRTAM sobre la superficie de células. Los peptidocuerpos son conocidos en la materia. Se definen y describen con mayor detalle peptidocuerpos con fines ejemplares en los documentos WO 99/25044 y WO 00/24782. El péptido usado para crear el peptidocuerpo puede ser de la secuencia aminoacídica de LDCAM, B7L-1 o CRTAM. Las secuencias de scfv de LDCAM anti-humano proporcionadas en las SEQ ID NO:12 y 13 pueden incorporarse a un peptidocuerpo.

2.3 Diseño racional de compuestos que interaccionan con polipéptidos de LDCAM y CRTAM

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos de interés biológicamente activos o de moléculas pequeñas con las que interaccionan, por ejemplo, inhibidores, agonistas, antagonistas, etc. Cualquiera de estos ejemplos puede usarse para crear fármacos que sean formas más activas o estables del polipéptido o que potencien o interfieran la función de un polipéptido *in vivo* (Hodgson J. (1991) *Biotechnology* 9: 19-21). En un enfoque, se determina la estructura tridimensional de un polipéptido de interés, o de un complejo polipéptido-inhibidor, mediante cristalografía de rayos X, mediante resonancia magnética nuclear o mediante modelización homóloga informática o, lo más típicamente, mediante una combinación de estos enfoques. Deben valorarse tanto la forma como las cargas del polipéptido para elucidar la estructura y determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Menos a menudo, puede obtenerse información útil respecto a la estructura de un polipéptido modelizando basándose en la estructura de polipéptidos homólogos. En ambos casos, se usa información estructural relevante para diseñar moléculas análogas de polipéptidos de LDCAM y CRTAM, para identificar inhibidores eficaces o para identificar moléculas pequeñas que se unen a polipéptidos de LDCAM o CRTAM. Los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos incluyen moléculas que tienen una actividad o estabilidad mejoradas como se muestra por Braxton S. y Wells JA (1992 *Biochemistry* 31: 7796-7801) o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos como se muestra por Athuda SB *et al.* (1993, *J. Biochem.* 113: 742-746). El uso de información estructural de polipéptidos de LDCAM y CRTAM en sistemas de software de modelización molecular para ayudar al diseño de inhibidores y para estudiar la interacción inhibidor-polipéptido de LDCAM o CRTAM está también comprendido por la invención. Se describe también en la presente memoria un método para analizar en la estructura tridimensional de polipéptidos de LDCAM y CRTAM los sitios de unión probables de sustratos, sintetizar una nueva molécula que incorpore un sitio de unión predictivo y ensayar la nueva molécula como se describe más adelante en la presente memoria.

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado mediante ensayo funcional como se describe más adelante en la presente memoria, y resolver entonces su estructura cristalina. Este enfoque proporciona en principio un núcleo farmacológico sobre el que puede basarse el diseño de fármaco posterior. Es posible evitar totalmente la cristalografía del polipéptido generando anticuerpos antiidiotípicos (anti-id) de un

anticuerpo farmacológicamente activo funcional. Como imagen especular de una imagen especular, se esperaría que el sitio de unión de los anti-id fuera un análogo del antígeno original. El anti-id podría usarse entonces para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como núcleo farmacológico.

5 2.4 Antagonistas y agonistas de LDCAM basados en ácidos nucleicos

Puede diseñarse una inmunoterapia basada en ácidos nucleicos para reducir el nivel de expresión génica de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 endógenas, por ejemplo, usando enfoques anticodificantes o de ribozima para inhibir o evitar la traducción de transcritos de ARNm de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1; enfoques de triple hélice para inhibir la transcripción de genes de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 o recombinación homóloga orientada para inactivar o "desactivar génicamente" los genes LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 o su promotor endógeno.

Las moléculas de ARN y ADN anticodificantes actúan bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante hibridación con el ARNm orientado y evitando la traducción del polipéptido. Los enfoques anticodificantes implican el diseño de oligonucleótidos (de ADN o ARN) que sean complementarios de un ARNm que tenga una secuencia polinucleotídica de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1. La complementariedad absoluta, aunque preferida, no es necesaria. Una secuencia "complementaria" de una porción de ARN, como se designa en la presente memoria, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para poder hibridar con el ARN, formando por tanto un dúplex estable. Los oligonucleótidos que son complementarios del extremo 5' de mensaje, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de inicio AUG, deberían funcionar más eficazmente inhibiendo la traducción. Sin embargo, podrían usarse oligonucleótidos complementarios de regiones 5' o 3' no codificantes no traducidas del transcrito génico de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 en un enfoque anticodificante para inhibir la traducción de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 endógenas. Los oligonucleótidos complementarios de la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los ácidos nucleicos anticodificantes deberían ser de al menos 6 nucleótidos de longitud, y son preferiblemente oligonucleótidos en el intervalo de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarias o bicatenarias. El oligonucleótido puede modificarse en el resto de base, el resto de azúcar o la cadena principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación y similares. El oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos (por ejemplo, para orientar a los receptores de células hospedadoras *in vivo*), o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véanse, por ejemplo, Letsinger *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556; Lemaître *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652; publicación PCT n° WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988), o agentes de escisión desencadenada por la hibridación o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539-549).

Pueden administrarse por vía sistémica moléculas anticodificantes que se suministran a células que expresan un transcrito que tiene una secuencia polinucleotídica de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 *in vivo*, por ejemplo, mediante inyección directa en el tejido o sitio de derivación celular, o mediante el uso de moléculas anticodificantes modificadas, diseñadas para orientarse a las células deseadas (por ejemplo, anticodificantes ligadas con péptidos o anticuerpos que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados sobre la superficie de la célula diana). Otro enfoque utiliza un constructo de ADN recombinante en que el oligonucleótido anticodificante está puesto bajo el control de un promotor pol III o pol II fuerte. El uso de dicho constructo para transfectar células diana en el sujeto dará como resultado la transcripción de cantidades suficientes de ARN monocatenarios, que formarán pares de bases complementarias con los transcritos de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 endógenas y evitarán por tanto la traducción de ARNm de IL-17. Por ejemplo, puede introducirse un vector *in vivo* de tal modo que se capte por una célula y dirija la transcripción de un ARN anticodificante. Dicho vector puede permanecer episómico o integrarse en un cromosoma, a condición de que pueda transcribirse produciendo el ARN anticodificante deseado. Los vectores pueden ser plasmídicos, víricos u otros conocidos en la materia usados para replicación y expresión en células de mamífero.

Las moléculas de ribozima diseñadas para la escisión catalítica de transcritos de ARNm que tienen una secuencia polinucleotídica de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 evitan la traducción de ARN de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT WO90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; patente de EE.UU. n° 5.824.519). Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otros ARN monocatenarios de manera análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. Una ventaja importante de este enfoque es que, debido a que son específicas de secuencia, se inactivan solo los ARNm con secuencias particulares. Hay dos tipos básicos de ribozimas, a saber, de tipo *Tetrahymena* (Hasselhoff, *Nature*, 334: 585-591, 1988) y de tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas de tipo *Tetrahymena* reconocen secuencias que son de cuatro bases de longitud, mientras que las ribozimas de tipo cabeza de martillo reconocen secuencias de 11-18 bases de longitud. Cuanto más larga es la secuencia de reconocimiento, mayor es la probabilidad de que la secuencia aparezca exclusivamente en la especie de ARNm diana. Por consiguiente, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo *Tetrahymena*.

Como en el enfoque anticodificante, las ribozimas pueden estar compuestas por oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para una estabilidad, orientación y similares mejoradas). Un método típico de suministro implica usar un constructo de ADN que "codifique" la ribozima bajo el control de un promotor pol III o pol II constitutivo fuerte, de

modo que las células transfectadas produzcan suficientes cantidades de ribozima para destruir el mensaje de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 endógenas e inhibir la traducción. Debido a que las ribozimas, al contrario que las moléculas anticodificantes, son catalíticas, se requiere una menor concentración intracelular para su eficacia.

5 Como alternativa, la expresión de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 endógenas puede reducirse orientando secuencias desoxirribonucleotídicas complementarias a la región reguladora del gen diana (concretamente, el promotor y/o potenciadores de gen diana) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción de los genes de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 diana (véanse, en general, Helene, 1991, Anticancer Drug Des., 6(6), 569-584; Helene, *et al.*, 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660, 27-36 y Maher, 1992, Bioassays 14(12), 807-815).

10 Las moléculas de ARN y ADN anticodificantes, de ribozima y de triple hélice de la invención pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la materia para la síntesis de moléculas de ADN y ARN, e incluyen técnicas para la síntesis química de oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos tales como, por ejemplo, la síntesis química con fosforamidita en fase sólida, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como los comercialmente disponibles en Biosearch, Applied Biosystems y similares). Como ejemplos, pueden sintetizarse oligonucleótidos de fosforotioato mediante el método de Stein *et al.*, 1988, Nucl. Acids Res. 16: 3209.

15 Los oligonucleótidos de fosfonato de metilo pueden prepararse mediante el uso de soportes poliméricos de vidrio de poro controlado (Sarin *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7448-7451). Como alternativa, pueden generarse moléculas de ARN mediante la transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN anticodificante. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse a una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Como alternativa, pueden introducirse establemente en estirpes celulares constructos de ADNc anticodificantes que sintetizan ARN anticodificante constitutiva o indeciblemente, dependiendo del promotor usado.

20

Puede bloquearse la expresión de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 mediante silenciamiento génico postraduccional, tal como mediante silenciamiento génico inducido por ARN bicatenario, también conocido como interferencia de ARN (iARN). Las secuencias de ARN de LDCAM, CRTAM y/o B7L-1 pueden modificarse proporcionando secuencias bicatenarias o ARN de horquilla cortos para uso terapéutico.

25

3. LDCAM

Los antagonistas y agonistas de LDCAM comprenden todas las formas adecuadas de LDCAM descritas en la presente memoria que exhiben actividad biológica. La LDCAM es una proteína de superficie celular que tiene una homología limitada con las moléculas de adhesión que se expresan en una variedad de células incluyendo, pero sin limitación, células dendríticas y en particular células dendríticas derivadas de linfoides. La secuencia nucleotídica que codifica la LDCAM humana, aislada como se describe en el ejemplo 3, se presenta en la SEQ ID NO:1, y la secuencia aminoacídica así codificada se presenta en la SEQ ID NO:2. La secuencia aminoacídica de LDCAM humana codificada descrita en la SEQ ID NO:2 tiene un dominio extracelular predicho de 374 aminoácidos, incluyendo una secuencia líder de 38 aminoácidos 1-38 (por tanto, el dominio extracelular que carece de una secuencia líder se extiende por los aminoácidos 39-374); un dominio transmembrana de 21 aminoácidos (375-395) y un dominio citoplasmático de 47 aminoácidos (396-442). Se forma naturalmente una forma soluble de LDCAM mediante corte y empalme alternativos. Se proporcionan ejemplos adicionales de LDCAM en la siguiente sección que incluye, pero sin limitación, variantes, fragmentos biológicamente activos, fragmentos, fragmentos biológicamente activos y fragmentos de variantes, proteínas de fusión, peptidocuerpos, mimotopos, derivados y similares.

30

35

40

La B7L-1, que tiene similitud de secuencia con B7-1, es un copartícipe de unión de LDCAM, como se describe en una solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/778.187, presentada el 6 de febrero de 2001. Debido a que la B7L-1 es una proteína de unión a LDCAM y debido a que B7L-1 y LDCAM exhiben homología en su dominio intracelular que incluye sitios de unión potenciales para miembros de la familia Band 4.1 y PDZ, y a que se encuentran en muchos de los mismos tipos celulares, sus formas unidas a célula pueden suministrar señales similares cuando se ocupan. Por tanto, se denominan correceptores o contrapartidas estructurales. La secuencia nucleotídica que codifica formas extracelulares largas y cortas de B7L-1 humana se presenta en las SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:9, respectivamente. Las secuencias aminoacídicas codificadas por las secuencias nucleotídicas de SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:9 se dan a conocer en las SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO: 10, respectivamente.

45

Para identificar las estirpes celulares a las que se une B7L-1 y aislar posteriormente una proteína a la que se une B7L-1, se preparó una proteína de fusión B7L-1/Fc como se describe en el ejemplo 1 y se llevaron a cabo estudios de unión como se describe en el ejemplo 2. El ejemplo 3 describe el cribado de una colección de ADNc preparada a partir de WI-26, una estirpe celular a la que se une B7L-1, y la identificación de un clon humano de LDCAM completa. La secuencia nucleotídica que codifica LDCAM humana, aislada como se describe en el ejemplo 3, se presenta en la SEQ ID NO:1, y la secuencia aminoacídica así codificada se presenta en la SEQ ID NO:2. La secuencia aminoacídica de LDCAM humana codificada descrita en la SEQ ID NO:2 tiene un dominio extracelular predicho de 374 aminoácidos, incluyendo una secuencia líder de 38 aminoácidos, 1-38, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos (375-395) y un dominio citoplasmático de 47 aminoácidos (396-442).

50

55

Los ejemplos 5 y 6 describen la preparación y uso de una LDCAM/Fc humana en estudios de unión para identificar las estirpes celulares a las que se une la LDCAM humana. Entre las estirpes celulares identificadas positivamente estaban las células S49.1 y las células dendríticas linfoides de bazo y nódulos linfáticos de ratones tratados con Flt3-L. El ejemplo 7 describe el cribado de conjuntos de una colección de expresión para identificar clones de LDCAM de múrido. La secuencia de ADN de LDCAM de múrido aislada se da a conocer en la SEQ ID NO:3. La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:3 se da a conocer en la SEQ ID NO:4. La secuencia aminoacídica de LDCAM de múrido codificada (SEQ ID NO:4) tiene un dominio extracelular predicho de 356 aminoácidos (residuos 1-356), un dominio transmembrana de 21 aminoácidos (357-377) y un dominio citoplasmático que incluye los residuos aminoacídicos 378-423. La SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4 describen las secuencias de LDCAM de múrido maduras completas. En comparación con la secuencia de LDCAM humana, la secuencia señal no se describe completamente.

Las moléculas de LDCAM de mamífero descritas en la presente memoria son proteínas transmembrana de tipo I que tienen una homología global limitada con B7-1 y otras moléculas de adhesión celular. La LDCAM tiene una alta homología con la región citoplasmática de B7L-1. Como se describe a continuación en el ejemplo 6, las proteínas LDCAM demuestran una expresión extendida. En particular, se encuentra ARNm de LDCAM humana en mama, retina, hígado-bazo fetal, corazón fetal, pulmón, músculo, placenta, tiroides y carcinoma pulmonar. Las estirpes celulares que tienen mensaje de LDCAM incluyen Wi-26. El ARNm de LDCAM de ratón se encuentra en embrión entero, testículos, células negativas triples de múrido esplénicas y de nódulos linfáticos CD8⁺, S49.1 y células dendríticas.

El descubrimiento de las secuencias de ADN dadas a conocer en las SEQ ID NO:1 y 3 posibilita la construcción de vectores de expresión que comprenden ADN que codifica proteínas LDCAM humanas y de ratón; células hospedadoras transfectadas o transformadas con los vectores de expresión; LDCAM biológicamente activas como proteínas homogéneas y anticuerpos inmunorreactivos con LDCAM.

Como la B7L-1, la LDCAM tiene una homología limitada con el receptor de poliovirus, la proteína de unión opioide delta y moléculas de adhesión. Además, como se describe en el ejemplo 13, la LDCAM bloquea la proliferación de linfocitos T causada por ConA y PHA, sugiriendo que la LDCAM es útil para modular la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T. La LDCAM no inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por mAb de TCR, sugiriendo que los efectos inhibidores de LDCAM sobre la proliferación de linfocitos T inducida por mitógeno son debidos a la inhibición de la secreción de citocina, por ejemplo IL-2, o debidos a la regulación de las respuestas posteriores de los linfocitos T después de la activación y a los aumentos de expresión del copartícipe de unión a LDCAM. Aún sin limitarse a ellos, se describen a continuación usos particulares de las moléculas de LDCAM.

Como se usa en la presente memoria, el término LDCAM comprende polipéptidos que tienen la secuencia aminoacídica 1-442 de SEQ ID NO:2 y la secuencia aminoacídica 1-423 de SEQ ID NO:4. Además, la LDCAM comprende polipéptidos que tienen un alto grado de similitud o un alto grado de identidad con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:2 y la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:4 y dichos polipéptidos son biológicamente activos.

El término "LDCAM" designa un género de polipéptidos descritos en la presente memoria que, al menos en parte, se unen y complejan consigo mismos, se unen a B7L-1 y CRTAM y alteran las señales de activación de linfocitos T en respuesta a antígenos y mitógenos.

El término "LDCAM de múrido" designa productos génicos biológicamente activos del ADN de SEQ ID NO:3 y el término "LDCAM humana" designa productos génicos biológicamente activos del ADN de SEQ ID NO:1. Están adicionalmente comprendidas por el término "LDCAM" las proteínas solubles o truncadas que comprenden principalmente la porción de unión conjunta a B7L-1 de la proteína, retienen actividad biológica y pueden secretarse. Los ejemplos específicos de dichas proteínas solubles son aquellas que comprenden la secuencia de aminoácidos 1-374 de SEQ ID NO:2 y aquellas que comprenden la secuencia de aminoácidos 1-356 de SEQ ID NO:4. Como alternativa, dichas proteínas solubles pueden excluir una secuencia líder y comprenden por tanto los aminoácidos 39-374 de SEQ ID NO:2.

El ejemplo 9 describe la construcción de una novedosa proteína de fusión de LDCAM/Fc que puede utilizarse en estudios de unión de LDCAM, ensayos de cribado de antagonistas y/o agonistas de LDCAM y estudios dirigidos a examinar las características funcionales de la molécula. Otras regiones Fc del anticuerpo pueden sustituirse por la región Fc de IgG1 humana descrita en el ejemplo. Son otras regiones Fc adecuadas aquellas que pueden unirse con alta afinidad a proteína A o proteína G, o aquellas que incluyen fragmentos de la región Fc de IgG1 humana o de múrido, por ejemplo, fragmentos que comprenden al menos la región de bisagra, de modo que se formen enlaces disulfuro intercatenarios. La proteína de fusión de LDCAM ofrece la ventaja de purificarse fácilmente. Además, se forman enlaces disulfuro entre las regiones Fc de dos cadenas de proteína de fusión separadas, creando dímeros.

Como se describe anteriormente, es un aspecto de la invención polipéptidos de LDCAM solubles. Los polipéptidos de LDCAM solubles comprenden todo o parte del dominio extracelular de una LDCAM nativa, pero carecen de la señal que causaría la retención del polipéptido en una membrana celular. Los polipéptidos de LDCAM solubles comprenden ventajosamente el péptido señal nativo (o uno heterólogo) cuando se sintetizan inicialmente para

promover la secreción, pero el péptido señal se escinde tras la secreción de LDCAM desde la célula. Los polipéptidos de LDCAM solubles descritos en la presente memoria retienen la capacidad de unirse a B7L-1, o la capacidad de unirse a sí mismos. Como alternativa, los polipéptidos de LDCAM solubles de la presente invención retienen la capacidad de alterar las respuestas de linfocitos T. La LDCAM soluble puede incluir parte de la señal o parte del dominio citoplasmático u otras secuencias, a condición de que la proteína LDCAM soluble pueda secretarse.

La LDCAM soluble puede identificarse (y distinguirse de sus contrapartidas unidas a membrana no solubles) separando las células intactas que expresan la proteína deseada del medio de cultivo, por ejemplo mediante centrifugación, y ensayando en el medio o sobrenadante la presencia de la proteína deseada. La presencia de LDCAM en el medio indica que la proteína se secretó desde las células y es por tanto una forma soluble de la proteína deseada.

Las formas solubles de LDCAM poseen muchas ventajas frente a la proteína LDCAM unida nativa. La purificación de proteínas a partir de células hospedadoras recombinantes es factible, puesto que las proteínas solubles se secretan desde las células. Adicionalmente, las proteínas solubles son generalmente más adecuadas para administración intravenosa.

Los ejemplos de polipéptidos de LDCAM solubles incluyen aquellos que comprenden una porción sustancial del dominio extracelular de una proteína LDCAM nativa. Por ejemplo, una proteína LDCAM humana soluble comprende los aminoácidos 38-374 o 1-374 de SEQ ID NO:2 y una LDCAM de murido soluble incluye los aminoácidos 1-356 de SEQ ID NO:4. Además, pueden usarse en la invención las proteínas LDCAM solubles truncadas que comprenden menos que el dominio extracelular entero. Cuando se expresa inicialmente en una célula hospedadora, la LDCAM soluble puede incluir uno de los péptidos señal heterólogos descritos a continuación que sea funcional en las células hospedadoras empleadas. Como alternativa, la proteína puede comprender el péptido señal nativo.

La LDCAM soluble puede expresarse como una proteína de fusión que comprende (de extremo N a C) el péptido señal de factor α de levadura, un péptido FLAG[®] descrito a continuación y en la patente de EE.UU. n° 5.011.912 y la LDCAM soluble constituida por los aminoácidos 39-374 de SEQ ID NO:2 o 21-356 de SEQ ID NO:4. Esta proteína de fusión recombinante se expresa en y se secreta desde células de levadura. El péptido FLAG[®] facilita la purificación de la proteína, y posteriormente puede escindirse de la LDCAM soluble usando enterocinasa mucosa bovina. Pueden usarse en la invención las secuencias de ADN aisladas que codifican proteínas LDCAM solubles.

La LDCAM truncada, incluyendo sus polipéptidos solubles, puede prepararse mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Puede sintetizarse químicamente una secuencia de ADN deseada usando técnicas conocidas *per se*. Pueden producirse también fragmentos de ADN mediante digestión con endonucleasa de restricción de una secuencia de ADN clonada completa, y aislarse mediante electroforesis en geles de agarosa. Pueden emplearse ligadores que contienen un sitio o sitios de escisión por endonucleasa de restricción para insertar el fragmento de ADN deseado en un vector de expresión, o el fragmento puede digerirse en los sitios de escisión naturalmente presentes en el mismo. El bien conocido procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa puede emplearse también para amplificar una secuencia de ADN que codifica un fragmento de proteína deseado. Como alternativa adicional, pueden emplearse técnicas de mutagénesis conocidas para insertar un codón de terminación en un punto deseado, por ejemplo, inmediatamente en dirección 3' del codón del último aminoácido del dominio de unión a receptor.

Como se afirma anteriormente, pueden usarse en la invención polipéptidos de LDCAM aislados u homogéneos, tanto recombinantes como no recombinantes. Están adicionalmente dentro del alcance de la presente invención las variantes y derivados de proteínas LDCAM nativas que retienen la actividad biológica deseada. Dicha actividad incluye la capacidad de la LDCAM de unirse a sí misma, o la capacidad de unirse a B7L-1, o la capacidad de alterar la señalización de linfocitos T. Las variantes y derivados de LDCAM pueden obtenerse mediante mutaciones de secuencias nucleotídicas que codifican polipéptidos de LDCAM nativos. Pueden lograrse alteraciones de la secuencia aminoacídica nativa mediante cualquiera de una serie de métodos convencionales. Pueden introducirse mutaciones en loci particulares sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueados por sitios de restricción que posibilitan el ligamiento con fragmentos de la secuencia nativa. Después del ligamiento, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o delección aminoacídica deseada.

Como alternativa, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida a oligonucleótido para proporcionar un gen alterado en el que codones predeterminados pueden alterarse por sustitución, delección o inserción. Se dan a conocer métodos ejemplares de preparación de las alteraciones expuestas anteriormente por Walder *et al.* (*Gene* 42: 133, 1986); Bauer *et al.* (*Gene* 37: 73, 1985); Craik (*BioTechniques*, enero de 1985, 12-19); Smith *et al.* ("Genetic Engineering: Principles and Methods", Plenum Press, 1981); Kunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488, 1985); Kunkel *et al.* (*Methods in Enzymol.* 154: 367, 1987) y las patentes de EE.UU. n° 4.518.584 y 4.737.462.

Las variantes de LDCAM pueden usarse como antagonistas o agonistas o usarse para desarrollar antagonistas o agonistas de LDCAM tales como anticuerpos, peptidocuerpos y mimotopos. Una "variante de LDCAM" como se

designa en la presente memoria significa un polipéptido sustancialmente homólogo de LDCAM nativa, pero que tiene una secuencia aminoacídica diferente de la de LDCAM nativa (humana, de múrdo o de otra especie de mamífero) debido a una o más deleciones, inserciones o sustituciones. Sustancialmente homólogo significa una variante de secuencia aminoacídica que es al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a las secuencias aminoacídicas nativas, como se dan a conocer anteriormente. La identidad porcentual de dos secuencias aminoacídicas o de ácido nucleico puede determinarse mediante inspección visual y cálculo matemático, o más preferiblemente, la comparación se realiza comparando la información de secuencia usando un programa informático. ES un programa informático preferido ejemplar el programa del paquete Genetics Computer Group (GCG; Madison, WI) Wisconsin, versión 10.0, "GAP" (Devereux *et al.*, 1984, Nucl. Acids Res. 12: 387). Los parámetros por defecto preferidos para el programa "GAP" incluyen: (1) la aplicación por GCG de una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y de 0 para no identidades) de nucleótidos y la matriz de comparación aminoacídica ponderada de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., "Atlas of Polypeptide Sequence and Structure", National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358, 1979; u otras matrices de comparación comparables; (2) una penalización de 30 por cada hueco y una penalización adicional de 1 por cada símbolo en cada hueco de secuencias aminoacídicas, o una penalización de 50 por cada hueco y una penalización adicional de 3 por cada símbolo en cada hueco para secuencias nucleotídicas; (3) sin penalización por huecos terminales y (4) sin penalización máxima por huecos largos. Pueden usarse también otros programas usados por los especialistas en la materia de comparación de secuencias tales como, por ejemplo, el programa BLASTN versión 2.0.9, disponible para uso en la página web de la National Library of Medicine www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi, o el algoritmo UW-BLAST 2.0. Se describen los ajustes de parámetros por defecto estándares de UW-BLAST 2.0 en la siguiente página de Internet: sapiens.wustl.edu/blast/blast/#Features. Además, el algoritmo BLAST usa la matriz de puntuación aminoacídica BLOSUM62 y los parámetros opcionales que pueden usarse son los siguientes: (A) inclusión de un filtro para enmascarar segmentos de la secuencia de búsqueda que tengan una baja complejidad composicional (determinada por el programa SEG de Wootton y Federhen (Computers and Chemistry, 1993); véase también Wootton y Federhen, 1996, "Analysis of compositionally biased regions in sequence databases", Methods Enzymol. 266: 554-71) o segmentos constituidos por repeticiones internas de baja periodicidad (determinados por el programa XNU de Claverie y States (Computers and Chemistry, 1993)), y (B) un umbral de significación estadística para notificar coincidencias frente a secuencias de base de datos o puntuación de E (la probabilidad esperada de encontrar coincidencias simplemente por casualidad, según el modelo estocástico de Karlin y Altschul (1990); si la significación estadística atribuida a una coincidencia es mayor que este umbral de puntuación de E, no se notificará la coincidencia); los valores de umbral de puntuación de E preferidos son 0,5, o en orden de preferencia creciente: 0,25, 0,1, 0,05, 0,01, 0,001, 0,0001, 10^{-5} , 10^{-10} , 10^{-15} , 10^{-20} , 10^{-25} , 10^{-30} , 10^{-40} , 10^{-50} , 10^{-75} o 10^{-100} .

Dichas variantes incluyen polipéptidos que son sustancialmente homólogos de secuencias de LDCAM nativas, pero que tienen una secuencia aminoacídica diferente de la de un receptor de IL-17 nativo debido a una o más deleciones, inserciones o sustituciones. Los polipéptidos de LDCAM pueden comprender al menos una sustitución aminoacídica conservativa. Los polipéptidos de LDCAM pueden comprender de una a diez deleciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoacídicos, en comparación con una secuencia nativa. Los polinucleótidos que codifican LDCAM para uso en la presente invención incluyen variantes que difieren de una secuencia polinucleotídica de LDCAM debido a una o más deleciones, inserciones o sustituciones, pero que codifican un polipéptido biológicamente activo. Se incluyen como variantes de polipéptidos de LDCAM aquellas variantes de origen natural, tales como formas alélicas y formas de corte y empalme alternativos, así como variantes que se han construido modificando la secuencia aminoacídica de un polipéptido de LDCAM o la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de LDCAM.

Como se menciona anteriormente, las variantes de LDCAM pueden comprender una secuencia que tiene al menos un aminoácido sustituido conservativamente, lo que significa que un residuo aminoacídico dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Realizaciones alternativas comprenden variantes de LDCAM que comprenden entre 1-10, 1-20 o 1-30 secuencias sustituidas conservativamente. En general, las sustituciones por uno o más aminoácidos presentes en el polipéptido nativo deberían ser conservativas. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de aminoácidos fuera del dominio o dominios activos y la sustitución de aminoácidos que no alteren la estructura secundaria y/o terciaria de la LDCAM. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tales como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o sustituciones de un residuo polar por otro, tales como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Son bien conocidas otras sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobia similares. Las variantes de origen natural pueden usarse en la invención. Son ejemplos de dichas variantes proteínas que resultan de eventos de corte y empalme de ARNm alternativos o de la escisión proteolítica de la proteína nativa, en los que se retiene la propiedad biológica nativa.

Por ejemplo, una "sustitución aminoacídica conservativa" puede implicar la sustitución de un residuo aminoacídico nativo por un residuo no nativo de modo que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo aminoacídico en esa posición. Además, puede sustituirse también cualquier residuo nativo en el polipéptido por alanina, como se ha descrito anteriormente para "mutagénesis por barrido de alanina" (véanse, por ejemplo,

MacLennan *et al.*, 1998, *Acta Physio. Scand. Suppl.* 643: 55-67; Sasaki *et al.*, 1998, *Adv. Biophys.* 35:1-24, que discute la mutagénesis por barrido de alanina).

- 5 Las sustituciones aminoacídicas deseadas (tanto conservativas como no conservativas) pueden determinarse por los especialistas en la materia en el momento en que se deseen dichas sustituciones. Por ejemplo, pueden usarse sustituciones aminoacídicas para identificar residuos importantes de la secuencia peptídica, o para aumentar o reducir la afinidad de moléculas de péptido o vehículo-péptido (véanse las fórmulas precedentes) descritas en la presente memoria. Se exponen las sustituciones aminoacídicas ejemplares en la Tabla 1.

Tabla 1-Sustituciones aminoacídicas

Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucina	Leu

- 10 Las sustituciones aminoacídicas conservativas pueden comprender también residuos aminoacídicos de origen no natural que se incorporan típicamente mediante síntesis peptídica química en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos.

- 15 Como se observa anteriormente, los residuos de origen natural pueden dividirse en clases basadas en las propiedades de la cadena lateral común que pueden ser útiles para modificaciones de secuencia. Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del péptido que son homólogas de ortólogos no humanos, o en regiones no homólogas de la molécula. Además, pueden hacerse también modificaciones usando P o G con el fin de influir en la orientación de la cadena.

- 20 Al realizar dichas modificaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático basándose en su hidrofobia y características de carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

- 25 Se entiende en la materia la importancia del índice aminoacídico hidropático para conferir una función biológica interactiva a una proteína (Kyte, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-131 (1982)). Es conocido que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y siguen reteniendo una actividad biológica similar. Al realizar cambios basándose en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de

aminoácidos cuyos índices están a ± 2 , se prefieren particularmente aquellos que están a ± 1 y se prefieren aún más particularmente aquellos a $\pm 0,5$.

Se entiende también en la materia que puede realizarse eficazmente la sustitución de aminoácidos similares basándose en la hidrofilia. La mayor hidrofilia media local de una proteína, regida por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, concretamente, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliadad a los residuos aminoacídicos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al realizar cambios basados en valores de hidrofilia similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia estén a ± 2 , se prefiere particularmente aquellos que estén a ± 1 y se prefieren aún más particularmente aquellos que estén a $\pm 0,5$. Pueden identificarse también epítomos de secuencias aminoacídicas primarias basándose en la hidrofilia. Estas regiones se designan también com “regiones centrales epitópicas”.

Un especialista en la materia podría determinar las variantes adecuadas de los polipéptidos como se exponen en las secuencias anteriores usando técnicas bien conocidas. Para identificar las zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad, un especialista en la materia puede orientarse a zonas que no se cree que sean importantes para la actividad. Por ejemplo, cuando son conocidos polipéptidos similares con actividades similares de la misma especie o de otra especie, un especialista en la materia puede comparar la secuencia aminoacídica de un péptido con péptidos similares. Con dicha comparación, pueden identificarse residuos y porciones de las moléculas que estén conservados entre polipéptidos similares. Se apreciará que los cambios en las zonas de un péptido que no están conservadas respecto a dichos péptidos similares afectarán adversamente con menos probabilidad la actividad biológica y/o estructura del péptido. Un especialista en la materia sabría también que, incluso en regiones relativamente conservadas, pueden sustituirse aminoácidos químicamente similares por residuos de origen natural mientras se retenga la actividad (sustituciones conservativas de residuos aminoacídicos). Por lo tanto, incluso las zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones aminoacídicas conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura peptídica.

Adicionalmente, un especialista en la materia puede revisar los estudios de estructura-función identificando los residuos en péptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. A la vista de dicha comparación, puede predecirse la importancia de los residuos aminoacídicos en un péptido que corresponden a los residuos aminoacídicos que son importantes para la actividad o estructura en péptidos similares. Un especialista en la materia puede optar por sustituciones aminoacídicas químicamente similares para dichos residuos aminoacídicos predichos como importantes de los péptidos.

Un especialista en la materia puede analizar también la estructura tridimensional y la secuencia aminoacídica con relación a la estructura en polipéptidos similares. A la vista de esa información, un especialista en la materia puede predecir el alineamiento de los residuos aminoacídicos de un péptido con respecto a su estructura tridimensional. Un especialista en la materia puede elegir no realizar cambios radicales a los residuos aminoacídicos que se predice que están en la superficie de la proteína, puesto que dichos residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un especialista en la materia puede generar variantes de ensayo que contengan una sola sustitución aminoacídica en cada residuo aminoacídico deseado. Las variantes pueden cribarse entonces usando ensayos de actividad conocidos por los especialistas en la materia. Dichos datos podrían usarse para recopilar información sobre las variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubriera que un cambio en un residuo aminoacídico particular daba como resultado una actividad anulada, indeseablemente reducida o inadecuada, se evitarían las variantes con dicho cambio. En otras palabras, basándose en la información recopilada a partir de dichos experimentos rutinarios, un especialista en la materia puede determinar fácilmente los aminoácidos en que deberían evitarse sustituciones adicionales solas o en combinación con otras mutaciones.

Una serie de publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4): 422-427 (1996), Chou *et al.*, *Biochemistry*, 13(2): 222-245 (1974); Chou *et al.*, *Biochemistry*, 113(2): 211-222 (1974); Chou *et al.*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 y Chou *et al.*, *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Además, están actualmente disponibles programas informáticos para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un método de predicción de la estructura secundaria está basado en la modelización por homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia mayor de un 30%, o una similitud mayor de un 40%, a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos de estructuras de proteínas (PDB) ha proporcionado una predicibilidad aumentada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos en la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm, *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1): 244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner *et al.*, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3): 369-376 (1997)) que hay un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dado, y que una vez se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural ganará drásticamente exactitud.

Los métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen "reconocimiento del plegamiento" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3): 377-87 (1997); Sippl, *et al.*, *Structure*, 4(1): 15-9 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie, *et al.*, *Science*, 253: 164-170 (1991); Gribskov, *et al.*, *Meth. Enzym.*, 183: 146-159 (1990); Gribskov, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13): 4355-8 (1987)) y "conexión evolutiva" (véanse Holm, anteriormente, y Brenner, anteriormente).

Pueden realizarse modificaciones adicionales en las secuencias polipeptídica de LDCAM o polinucleotídica de LDCAM por los especialistas en la materia usando técnicas conocidas. Las modificaciones de interés de las secuencias polipeptídicas pueden incluir la alteración, sustitución, reemplazo, inserción o delección de un aminoácido seleccionado. Por ejemplo, pueden eliminarse o reemplazarse por otro aminoácido uno o más residuos de cisteína para alterar la conformación de la molécula, una alteración que puede implicar evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos tras el plegamiento o renaturalización. Las técnicas para dicha alteración, sustitución, reemplazo, inserción o delección son bien conocidas por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.518.584). Como otro ejemplo, los sitios de N-glucosilación en el dominio extracelular de LDCAM pueden modificarse para impedir la glucosilación, permitiendo la expresión de un análogo de carbohidrato reducido en sistemas de expresión de mamíferos y levadura. Los sitios de N-glucosilación en polipéptidos eucarióticos se caracterizan por un triplete aminoacídico Asn-X-Y, en el que X es cualquier aminoácido excepto Pro e Y es Ser o Thr. El polipéptido de LDCAM humano de SEQ ID NO:2 incluye seis de dichos tripletes, en los aminoácidos 67-69, 101-103, 113-115, 165-167, 304-306 y 308-310. De forma similar, el polipéptido de LDCAM de murido de SEQ ID NO:4 incluye seis de dichos tripletes a 49-51, 83-85, 95-97, 147-149, 286-288 y 290-292. Las sustituciones, adiciones o delecciones apropiadas en la secuencia nucleotídica que codifica estos tripletes darán como resultado evitar el enlace de residuos de carbohidrato en la cadena lateral de Asn. La alteración de un solo nucleótido, elegido de modo que la Asn se reemplace por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glucosilación. Los procedimientos conocidos para inactivar sitios de N-glucosilación en proteínas incluyen aquellos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.071.972 y el documento EP 276.846.

Variantes adicionales incluyen polipéptidos de LDCAM que pueden modificarse para crear derivados de los mismos formando conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos, tales como grupos glucosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. Los derivados covalentes pueden prepararse ligando los restos químicos con grupos funcionales en cadenas laterales aminoacídicas o en el extremo N o el extremo C de un polipéptido. Preferiblemente, dicha alteración, sustitución, reemplazo, inserción o delección no reduce la actividad biológica de LDCAM. Es un ejemplo una variante que se une esencialmente con la misma afinidad de unión que la forma nativa. La afinidad de unión puede medirse mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.512.457 y se expone en la presente memoria. Además, las moléculas de LDCAM pueden modificarse mediante la adición de uno o más polímeros solubles en agua tales como, pero sin limitación, polietilenglicol, para aumentar la biodisponibilidad y/o la semivida farmacocinética.

Están actualmente disponibles diversos medios para enlazar restos químicos útiles para aumentar la biodisponibilidad y/o la semivida farmacocinética; véase, por ejemplo, la publicación internacional del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes ("PCT") nº WO 96/11953, titulada "N-Terminally Chemically Modified Protein Compositions and Methods".

Esta publicación PCT da a conocer, entre otras cosas, el enlace selectivo de polímeros solubles en agua con el extremo N de proteínas.

Es un vehículo polimérico alternativo el polietilenglicol (PEG). El grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular medio del PEG oscilará preferiblemente de aproximadamente 2 kilodalton ("kDa") a aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG se enlazarán generalmente con los compuestos de la invención mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo en el resto PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) con un grupo reactivo en el compuesto de la invención (por ejemplo, un grupo aldehído, amino o éster).

Una estrategia útil para la pegilación de péptidos sintéticos consiste en la combinación, mediante la formación de un ligamiento conjugado en disolución, de un péptido y un resto de PEG, portando cada uno una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva con la otra. Los péptidos pueden prepararse fácilmente con síntesis en fase sólida convencional. Los péptidos se "preactivan" con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Se purifican los precursores y se caracterizan completamente antes de hacer reaccionar con el resto de PEG. El ligamiento del péptido con PEG tiene lugar habitualmente en fase acuosa y puede monitorizarse fácilmente mediante HPLC analítica en fase inversa. Los péptidos pegilados pueden purificarse fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizarse por HPLC analítica, análisis aminoacídico y espectrometría de masas por desorción láser.

Los polímeros polisacáridos son otro tipo de polímero soluble en agua que puede usarse para la modificación de proteínas. Los dextranos son polímeros polisacáridos que comprenden subunidades individuales de glucosa ligadas predominantemente por ligamientos α 1-6. El dextrano mismo está disponible en muchos intervalos de peso molecular, y está fácilmente disponible en pesos moleculares de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 70 kDa. El dextrano es un polímero soluble en agua adecuado para uso en la presente invención como vehículo por sí

mismo o en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 96/11953 y WO 96/05309. Se ha notificado el uso de dextrano conjugado con inmunoglobulinas terapéuticas o de diagnóstico; véase, por ejemplo, la publicación de patente europea nº 0.315.456. Se prefiere el dextrano de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 20 kDa cuando se usa dextrano como vehículo según la presente invención.

5 Los derivados de LDCAM adicionales incluyen conjugados covalentes o agregados de los polipéptidos con otros polipéptidos o polipéptidos, tales como mediante síntesis en cultivo recombinante, en forma de fusiones N-terminales o C-terminales. Los ejemplos de polipéptidos de fusión se discuten a continuación con relación a los oligómeros. Adicionalmente, los polipéptidos de fusión pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación e identificación. Dichos péptidos incluyen, por ejemplo, poli-His o los péptidos de identificación antigénica descritos en la patente de EE.UU. nº 5.011.912 y en Hopp *et al.*, Bio/Technology 6: 1204, 1988. Uno de dichos péptidos es el octapéptido FLAG[®] (SEQ ID NO:31), que es altamente antigénico y proporciona un epitopo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico, lo que posibilita un ensayo rápido y una purificación sencilla del polipéptido recombinante expresado. Un hibridoma de múrido designado 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que se une al péptido FLAG[®] en presencia de ciertos cationes metálicos divalentes, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.011.912. La estirpe celular de hibridoma 4E11 se ha depositado en la American Type Culture Collection con el número de acceso HB 9259. Los anticuerpos monoclonales que se unen al péptido FLAG[®] están disponibles en Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

20 Las LDCAM que pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria incluyen oligómeros o polipéptidos de fusión que contienen polipéptidos de LDCAM, uno o más fragmentos de LDCAM o cualquiera de las formas derivadas o variantes de LDCAM como se dan a conocer en la presente memoria, así como en las patentes de EE.UU. enumeradas anteriormente. Los oligómeros pueden comprender polipéptidos de LDCAM solubles. Los oligómeros pueden estar en forma de multímeros ligados covalentemente o ligados no covalentemente, incluyendo dímeros, trímeros u oligómeros superiores. Los oligómeros de LDCAM pueden comprender múltiples polipéptidos de LDCAM unidos mediante interacciones covalentes o no covalentes entre restos peptídicos fusionados con los polipéptidos, teniendo dichos péptidos la propiedad de promover la oligomerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos están entre los péptidos que pueden promover la oligomerización de los polipéptidos enlazados con los mismos, como se describe con detalle a continuación.

30 La LDCAM puede modificarse para crear derivados de LDCAM formando conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos, tales como grupos glucosilo, lípidos, grupos fosfato, acetilo y similares. Pueden prepararse derivados covalentes de LDCAM ligando los restos químicos con grupos funcionales en las cadenas laterales aminoácidas de LDCAM o en el extremo N o el extremo C de un polipéptido de LDCAM o el dominio extracelular del mismo. Otros derivados de LDCAM incluyen conjugados covalentes o agregados de LDCAM o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante síntesis en cultivo recombinante en forma de fusiones N-terminales o C-terminales. Por ejemplo, el conjugado puede comprender una secuencia polipeptídica señal o líder (por ejemplo, la líder de factor α de *Saccharomyces*) en el extremo N de un polipéptido de LDCAM. El péptido señal o líder dirige cotraduccionalmente o postraduccionalmente la transferencia del conjugado desde su sitio de síntesis hasta un sitio dentro o fuera de la membrana celular o la pared celular.

40 Las fusiones de polipéptidos de LDCAM pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación e identificación de LDCAM. Dichos péptidos incluyen, por ejemplo, poli-His o los péptidos de identificación antigénica descritos en la patente de EE.UU. nº 5.011.912 y en Hopp *et al.*, Bio/Technology 6: 1204, 1988.

45 Se describen para uso en la invención los constructos de ADN equivalentes que codifican diversas adiciones o sustituciones de residuos o secuencias aminoácidas, o deleciones de residuos o secuencias terminales o internos no necesarios para la actividad biológica o la unión. Por ejemplo, los sitios de N-glucosilación del dominio extracelular de LDCAM pueden modificarse para impedir la glucosilación y permitir la expresión de un análogo de carbohidrato reducido en sistemas de expresión de mamífero y levadura. Los sitios de N-glucosilación en polipéptidos eucarióticos se caracterizan por un triplete aminoácido Asn-X-Y, en el que X es cualquier aminoácido excepto Pro e Y es Ser o Thr. El polipéptido de LDCAM humano de SEQ ID NO:2 incluye seis de dichos tripletes en los aminoácidos 67-69, 101-103, 113-115, 165-167, 304-306 y 308-310. De forma similar, el polipéptido de LDCAM de múrido de SEQ ID NO:4 incluye seis de dichos tripletes en 49-51, 83-85, 95-97, 147-149, 286-288 y 290-292. Las sustituciones, adiciones o deleciones apropiadas de la secuencia nucleotídica que codifica estos tripletes darán como resultado evitar el enlace de residuos de carbohidrato con la cadena lateral de Asn. La alteración de un solo nucleótido, elegida de modo que la Asn se reemplace por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glucosilación. Los procedimientos conocidos para inactivar sitios de N-glucosilación en proteínas incluyen aquellos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.071.972 y en el documento EP 276.846.

55 En otro ejemplo, las secuencias que codifican residuos de Cys que no son esenciales para la actividad biológica pueden alterarse causando que los residuos de Cys se eliminen o reemplacen por otros aminoácidos, evitando la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos tras la renaturalización. Se preparan otros equivalentes mediante la modificación de residuos aminoácidos dibásicos adyacentes para potenciar la expresión en sistemas de levadura en que está presente la actividad proteasa KEX2. El documento EP 212.914 da a conocer el uso de mutagénesis específica de sitio para inactivar sitios de procesamiento de proteasa KEX2 en una proteína. Los sitios de procesamiento de proteasa KEX2 se inactivan eliminando, añadiendo o sustituyendo residuos para alterar los

60

pares Arg-Arg, Arg-Lys y Lys-Arg, eliminando la aparición de estos residuos básicos adyacentes. Los apareamientos Lys-Lys son considerablemente menos susceptibles de escisión por KEX2, y la conversión de Arg-Lys o Lys-Arg en Lys-Lys representa un enfoque conservador y preferido para inactivar los sitios de KEX2.

5 Las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias de ADN y ARN aisladas que hibridan con las secuencias nucleotídicas de LDCAM dadas a conocer en la presente memoria en condiciones de rigor moderado o alto, y que codifican LDCAM biológicamente activa. Las condiciones de rigor moderado, como se definen en Sambrook *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2 ed. vol. 1, pág. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), incluyen el uso de una disolución de prelavado de 5 X SSC, 0,5% de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación de aproximadamente 55°C, 5 X SSC, durante una noche. Las condiciones de rigor alto incluyen mayores
10 temperaturas de hibridación y lavado. El especialista en la materia reconocerá que la temperatura y la concentración salina de la disolución de lavado pueden ajustarse según sea necesario según factores tales como la longitud de la molécula de ácido nucleico.

Debido a la degeneración conocida del código genético, en la que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de la mostrada en las SEQ ID NO:1 y 3 y seguir codificando una proteína LDCAM que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, respectivamente. Dichas secuencias de ADN variantes pueden ser el resultado de mutaciones silenciosas (por ejemplo, que aparecen durante amplificación por PCR), o pueden ser el producto de la mutagénesis deliberada de una secuencia nativa.
15

Pueden usarse en los métodos de la invención secuencias de ADN aisladas equivalentes que codifican LDCAM biológicamente activa seleccionadas de: (a) ADNc que comprende la secuencia nucleotídica presentada en las SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3; (b) ADN capaz de hibridación con un ADN de (a) en condiciones moderadamente rigurosas y que codifica LDCAM biológicamente activa y (c) ADN que está degenerado como resultado del código genético hasta un ADN definido en (a) o (b) y que codifica LDCAM biológicamente activa. Pueden usarse también proteínas LDCAM codificadas por dichas secuencias equivalentes de ADN.
20

Los ADN que son equivalentes a la secuencia de ADN de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3 hibridarán en condiciones moderada y altamente rigurosas con secuencias de ADN que codifican polipéptidos que comprenden las SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4. Los ejemplos de proteínas LDCAM codificadas por dichos ADN incluyen, pero sin limitación, fragmentos de LDCAM (incluyendo fragmentos solubles) y proteínas LDCAM que comprenden un sitio o sitios de N-glucosilación inactivados, un sitio o sitios de procesamiento de proteasa KEX2 inactivados o una sustitución o sustituciones aminoacídicas conservativas como se describen anteriormente. Pueden usarse también en la presente invención proteínas LDCAM codificadas por ADN derivado de otras especies de mamíferos, en las que el ADN hibridará con el ADNc de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
25
30

Las variantes que poseen la capacidad de unirse a B7L-1 pueden identificarse mediante cualquier ensayo adecuado. La actividad biológica de la LDCAM puede determinarse, por ejemplo, mediante competición por la unión al dominio de unión de B7L-1 (concretamente, ensayos de unión competitiva).

35 Un tipo de ensayo de unión competitiva para un polipéptido de LDCAM usa una LDCAM soluble radiomercada y células intactas que expresan B7L-1. En lugar de células intactas, podría sustituirse la región Fc de la proteína de fusión por proteínas de fusión de B7L-1/Fc, tales como B7L-1/Fc unida a una fase sólida mediante interacción de proteína A, proteína G o un anticuerpo de las porciones B7L-1 o Fc de la molécula. Otro tipo de ensayo de unión competitiva utiliza un receptor de LDCAM soluble radiomarcado y células intactas que expresan LDCAM.

40 Los ensayos de unión competitiva pueden efectuarse siguiendo una metodología convencional. Por ejemplo, la LDCAM radiomarcada puede usarse para competir con un presunto homólogo de LDCAM en el ensayo de actividad de unión frente a B7L-1 o un receptor de LDCAM unido a superficie. Pueden obtenerse resultados cualitativos mediante ensayos de unión en placa autorradiográfica competitiva o pueden utilizarse gráficas de Scatchard para generar resultados cuantitativos.

45 Como alternativa, pueden unirse proteínas de unión a LDCAM, tales como B7L-1 y anticuerpos anti-LDCAM, a una fase sólida tal como una matriz de cromatografía en columna o sustrato similar adecuado para identificar, separar o purificar células que expresan LDCAM en su superficie. La unión de una proteína de unión a LDCAM a una superficie en contacto con la fase sólida puede lograrse mediante cualquier medio, por ejemplo, construyendo una proteína de fusión de B7L-1/Fc y uniendo ésta a la fase sólida mediante la interacción de proteína A o proteína G.
50 Son bien conocidos en la materia diversos otros medios de fijación de proteínas a una fase sólida y son adecuados para uso en la presente invención. Por ejemplo, pueden recubrirse microesferas magnéticas con B7L-1 y mantenerse en el recipiente de incubación bajo un campo magnético. Se ponen en contacto suspensiones de mezclas celulares que contienen células que expresan LDCAM con la fase sólida que tiene polipéptidos de B7L-1 sobre la misma. Las células que tienen LDCAM sobre su superficie se unen a la B7L-1 fijada y se eliminan entonces por lavado las células no unidas. Este método de unión por afinidad es útil para purificar, cribar o separar dichas células que expresan LDCAM de la disolución. Son conocidos en la materia métodos de liberación de la fase sólida de células seleccionadas positivamente y comprenden, por ejemplo, el uso de enzimas. Dichas enzimas son preferiblemente no tóxicas y no dañinas para las células y están preferiblemente dirigidas a escindir el copartícipe de unión de la superficie celular. En el caso de interacciones B7L-1:LDCAM, la enzima libera preferiblemente la
55

suspensión celular resultante del material de LDCAM. La población celular purificada, especialmente si se obtiene a partir de un tejido fetal, puede usarse entonces para repoblar tejidos maduros (adultos).

Como alternativa, pueden incubarse en primer lugar mezclas de células sospechosas de contener células LDCAM⁺ con B7L-1 biotinilada. Los periodos de incubación son típicamente de al menos una hora de duración para asegurar una unión suficiente a LDCAM. Se pasa entonces la mezcla resultante a través de una columna empaquetada con perlas recubiertas de avidina, con lo que la alta afinidad de la biotina por la avidina proporciona la unión de la célula a las perlas. El uso de perlas recubiertas con avidina es conocido en la materia. Véase Berenson, *et al. J. Cell. Biochem.*, 10D:239 (1986). Se efectúa el lavado de material no unido y la liberación de las células unidas usando métodos convencionales.

Como se describe anteriormente, puede usarse B7L-1 para separar células que expresan LDCAM. En un método alternativo, puede conjugarse LDCAM o un dominio extracelular o fragmento de la misma con un resto detectable tal como ¹²⁵I para detectar las células que expresan B7L-1. El radiomarcaje con ¹²⁵I puede efectuarse mediante cualquiera de varias metodologías estándares que proporcionan una molécula de ¹²⁵I-LDCAM funcional marcada con actividad de alta especificidad. O bien podría usarse un anticuerpo yodado o biotinilado frente a la región B7L-1 o la región Fc de la molécula. Puede usarse otro resto detectable tal como una enzima que catalice una reacción colorimétrica o fluorométrica, biotina o avidina. Las células en que ensayar la expresión de B7L-1 pueden ponerse en contacto con LDCAM marcada. Después de la incubación, se elimina la LDCAM no unida y se mide la unión usando el resto detectable.

Las características de unión de la LDCAM (incluyendo variantes) puede determinarse también usando la LDCAM/Fc conjugada soluble (por ejemplo, ¹²⁵I-LDCAM/Fc) en ensayos competitivos similares a los descritos anteriormente. En este caso, sin embargo, se usan células intactas que expresan LDCAM/Fc unida a un sustrato sólido para medir la medida en que una muestra que contiene una presunta variante de LDCAM compite por la unión con un copartícipe de unión soluble conjugado de LDCAM.

Otros medios de ensayo de LDCAM incluyen el uso de anticuerpos anti-LDCAM, estirpes celulares que proliferan en respuesta a LDCAM o estirpes celulares recombinantes que proliferan en presencia de LDCAM

Las proteínas LDCAM dadas a conocer en la presente memoria pueden emplearse también para medir la actividad biológica de B7L-1 u otras proteínas de unión a LDCAM en términos de su afinidad de unión por LDCAM. Como ejemplo, puede usarse LDCAM para determinar si se retiene la actividad biológica después de la modificación de B7L-1 (por ejemplo, modificación química, truncamiento, mutación, etc.). La actividad biológica de una proteína B7L-1 puede valorarse por tanto antes de usarse en un estudio de investigación, o posiblemente en clínica, por ejemplo,

Las proteínas LDCAM encuentran uso como reactivos que pueden emplearse por los que realizan estudios de "control de calidad", por ejemplo, para monitorizar la vida de almacenamiento y la estabilidad de B7L-1 u otra proteína de unión a LDCAM en diferentes condiciones. Para ilustrar, la LDCAM puede emplearse en un estudio de afinidad de unión para medir la actividad biológica de una proteína B7L-1 que se ha almacenado a diferentes temperaturas, o producido en diferentes tipos celulares. La afinidad de unión de la proteína B7L-1 modificada por LDCAM se compara con la de una proteína B7L-1 no modificada para detectar cualquier impacto adverso de las modificaciones sobre la actividad biológica de B7L-1. Igualmente, puede valorarse la actividad biológica de una proteína LDCAM usando B7L-1.

Los polipéptidos de LDCAM encuentran también uso como portadores para suministrar agentes enlazados a los mismos a linfocitos T u otras células portadoras de B7L-1, LDCAM y/o CRTAM. Las proteínas LDCAM pueden usarse para suministrar agentes de diagnóstico o terapéuticos a estas células en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Como se describe en el ejemplo 5, la LDCAM se encuentra en la estirpe celular PAE81BM, que es una estirpe celular transformada de EBV. Por tanto, un ejemplo de dicho uso de portador es exponer esta estirpe celular a un agente terapéutico/conjugado de LDCAM para valorar si el agente exhibe citotoxicidad hacia cualquier cáncer de EBV. Adicionalmente, puesto que la LDCAM se expresa en células dendríticas y linfocitos B activados por CD40L que son importantes en la presentación antigénica, la LDCAM es un portador útil para orientar a, identificar y purificar estas células. También pueden emplearse conjugados de LDCAM/agente de diagnóstico para detectar la presencia de células dendríticas y linfocitos B *in vitro* o *in vivo*. El ejemplo 6 demuestra que se encuentran transcritos de ARNm de LDCAM humana en mama, retina, hígado fetal, bazo, corazón fetal, pulmón, placenta, tiroides y carcinoma pulmonar humanos. Estudios similares de la expresión de ARNm de LDCAM de ratón mostraron que se encuentra ARNm de LDCAM de ratón en embrión entero, testículos, células dendríticas derivadas de linfoides y células negativas triples. Puesto que la LDCAM se une a sí misma, puede usarse LDCAM para estudiar su papel funcional en estos tejidos.

Como alternativa, la LDCAM puede orientarse a otros copartícipes de unión a LDCAM tales como, pero sin limitación, B7L-1, CRTAM y LDCAM, sobre células diana adicionales. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, linfocitos T CD4⁺ activados, linfocitos T CD8⁺, linfocitos NK-T y/o linfocitos NK mediante CRTAM; células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, que incluyen células dendríticas humanas BDCA3⁺ y CD8α⁺ mediante LDCAM.

Pueden usarse en conjugados una serie de diferentes agentes terapéuticos u otros marcadores funcionales enlazados con LDCAM, así como anticuerpos anti-LDCAM o CRTAM, pepticuerpos y similares, en un ensayo para detectar y comparar los efectos citotóxicos de los agentes sobre las células o estudiar el papel de la LDCAM en tejidos y células. Los agentes de diagnóstico y terapéuticos que pueden enlazarse con un polipéptido de LDCAM incluyen, pero sin limitación, fármacos, toxinas, radionucleidos, cromóforos, enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica y similares, eligiéndose el agente particular según la aplicación pretendida. Los ejemplos de fármacos incluyen aquellos usados en el tratamiento de diversas formas de cáncer, por ejemplo, mostazas nitrogenadas tales como mostaza nitrogenada de L-fenilalanina o ciclofosfamida, agentes intercalantes tales como cis-diaminodicloroplatino, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, alcaloides del cornezuelo tales como vincristina y antibióticos tales como bleomicina, doxorubicina, daunorubicina y derivados de los mismos. Están entre las toxinas ricina, abrina, toxina de la difteria, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* A, proteínas de inactivación ribosómica, micotoxinas tales como tricotecenos y derivados y fragmentos (por ejemplo monocatenarios) de las mismas. Los radionucleidos adecuados para uso de diagnóstico incluyen, pero sin limitación, ¹²³I, ¹³¹I, ^{99m}Tc, ¹¹¹In y ⁷⁶Br. Los radionucleidos adecuados para uso terapéutico incluyen, pero sin limitación, ²¹¹At, ⁷⁷Br, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ¹⁰⁹Pd, ⁶⁴Cu y ⁶⁷Cu.

Dichos agentes pueden enlazarse con la LDCAM, así como con anticuerpos anti-LDCAM o CRTAM, pepticuerpos y similares, mediante cualquier procedimiento convencional adecuado. La LDCAM, al ser una proteína, comprende grupos funcionales en las cadenas laterales aminoácidas que pueden hacerse reaccionar con grupos funcionales en un agente deseado, formando enlaces covalentes, por ejemplo. Como alternativa, la proteína o agente puede derivatizarse para generar o enlazarse con un grupo funcional reactivo deseado. La derivatización puede implicar el enlace de uno de los reactivos de acoplamiento bifuncionales disponibles para enlazar diversas moléculas con proteínas (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Son conocidas una serie de técnicas para radiomarcarse proteínas. Los metales radionucleidos pueden enlazarse con LDCAM usando un agente quelante bifuncional adecuado, por ejemplo.

Se preparan por tanto conjugados que comprenden LDCAM, así como anticuerpos anti-LDCAM o CRTAM, pepticuerpos y similares y un agente de diagnóstico o terapéutico adecuado (preferiblemente ligado covalentemente). Se administran los conjugados o se emplean de otro modo en una cantidad apropiada para la aplicación particular.

Como se menciona anteriormente, la LDCAM bloquea la proliferación de linfocitos T causada por ConA y PHA y no inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por mAb de TCR, pudiendo ser debidos los efectos inhibidores de LDCAM sobre la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos a la inhibición de la secreción de citocina, por ejemplo IL-2. En consecuencia, es otro uso de la LDCAM de la presente invención como herramienta de investigación para estudiar el papel que desempeña la LDCAM en la producción de IL-2 en linfocitos T. Los polipéptidos de LDCAM descritos anteriormente pueden emplearse también en ensayos *in vitro* para la detección de B7L-1 o de las interacciones de la misma.

Se describen métodos de tratamiento de trastornos asociados con un sistema inmunitario disfuncional. Más particularmente, puesto que es conocido que la LDCAM bloquea los linfocitos T estimulados por ConA y los linfocitos T estimulados por PHA, la LDCAM puede ser útil para tratar inflamación y trastornos autoinmunitarios mediados por respuestas de linfocitos T. Puede administrarse una composición que incluyen una proteína LDCAM, preferiblemente un polipéptido soluble y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, a un mamífero para tratar dicha inflamación o trastorno autoinmunitario. Los ratones SCID inyectados con LDCAM soluble en forma de LDCAM/Fc experimentan un aumento de la celularidad esplénica. Parte de este aumento es debido a un aumento de los linfocitos DX-5⁺, también conocidos como linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK). Cuando se inyectan con LDCAM/Fc e IL-15, un factor de crecimiento de linfocitos NK, los ratones SCID demuestran un aumento de los linfocitos NK que es aditivo. Esto prueba adicionalmente la capacidad de LDCAM, fragmentos de LDCAM, LDCAM soluble así como agonistas de LDCAM de generar linfocitos NK. A la vista de este descubrimiento, se dan a conocer métodos para aumentar el número de linfocitos NK en un individuo mediante la administración a ese individuo de composiciones farmacéuticas descritas anteriormente que contienen LDCAM, LDCAM soluble, fragmentos de LDCAM así como agonistas de LDCAM. Los linfocitos NK pueden aumentarse *ex vivo* poniendo en contacto los linfocitos NK con LDCAM o formas solubles de LDCAM así como agonistas de LDCAM, y dejando multiplicarse los linfocitos NK. De forma similar, los linfocitos NK pueden generarse *in vivo* o *ex vivo*, como se acaba de describir, mediante la administración de LDCAM o formas solubles de LDCAM, así como agonistas de LDCAM, con respecto a citocinas o factores de crecimiento adicionales. Por tanto, los métodos para generar linfocitos NK *in vivo* o *ex vivo* pueden incluir adicionalmente el uso de una cantidad eficaz de una citocina en combinación secuencial o concurrente con LDCAM. Dichas citocinas incluyen, pero sin limitación, interleucinas ("IL") IL-15, IL-3 e IL-4, un factor estimulante de colonias ("CSF") seleccionado del grupo consistente en factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF") o fusiones GM-CSF/IL-3, u otras citocinas tales como TNF- α , proteínas de unión a CD40 (por ejemplo, CD40-L), antagonistas de 4-1BB (por ejemplo, anticuerpos inmunorreactivos con 4-1BB y 4-1BB-L) o ligando c-kit.

Los linfocitos NK son linfocitos granulares grandes que son distintos de los linfocitos T o B en morfología y función. Los linfocitos NK median la destrucción de ciertas células tumorales y células infectadas víricamente de maneras no limitadas a MHC. Adicionalmente, los linfocitos NK están implicados en el rechazo de células donantes por

receptores de trasplante de médula ósea. Puesto que la LDCAM aumenta el número de linfocitos NK, la LDCAM, LDCAM soluble, fragmentos de LDCAM así como agonistas de LDCAM son útiles para combatir células infectadas víricamente y enfermedades infecciosas. De forma similar, la LDCAM, LDCAM soluble y fragmentos de LDCAM son útiles para destruir células tumorales. Se describen métodos para tratar enfermedades infecciosas y métodos para tratar individuos aquejados de tumores. Dichos métodos terapéuticos implican la administración de LDCAM, formas solubles de LDCAM o fragmentos de LDCAM a un individuo necesitado de aumentar su número de linfocitos NK para destruir células tumorales o potenciar su capacidad de combatir enfermedades infecciosas. De forma similar, los métodos terapéuticos pueden llevarse a cabo administrando LDCAM, LDCAM soluble, por ejemplo, proteína de fusión de LDCAM, o fragmentos de LDCAM secuencial o concurrentemente en combinación con citocinas. Dichas citocinas incluyen, pero sin limitación, interleucinas ("IL") IL-15, IL-3 e IL-4, un factor estimulante de colonias ("CSF") seleccionado del grupo consistente en factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF") o fusiones GM-CSF/IL-3, u otras citocinas tales como TNF- α , proteínas de unión a CD40 (por ejemplo, CD40-L), antagonistas de 4-1BB (por ejemplo, anticuerpos inmunorreactivos con 4-1BB y 4-1BB-L) o ligando c-kit. Se describen métodos para prevenir o reducir el efecto del rechazo de trasplante de órganos y médula ósea por receptores del trasplante. Dichos métodos implican tratar los receptores con una composición que incluye un antagonista de LDCAM, inhibiendo por tanto los aumentos en las poblaciones de linfocitos NK y reduciendo la capacidad de los linfocitos NK de rechazar trasplantes. El tratamiento de células endoteliales humanas (aórticas y de cordón umbilical) con una forma soluble de LDCAM humana da como resultado flujos de calcio en las células. Los flujos de calcio en células endoteliales son importantes en la modulación de la permeabilidad vascular, migración de células endoteliales y angiogénesis, y en la adhesión y transmigración de leucocitos. Los polipéptidos de LDCAM e inhibidores de LDCAM pueden usarse por lo tanto para mejorar el suministro de fármaco a través de la barrera hematoencefálica, para aumentar la respuesta inmunitaria frente a un tumor o patógeno, para reducir un síndrome autoinmunitario o inflamatorio, para reducir la adhesión de leucocitos y la formación de placas ateroscleróticas, para bloquear la angiogénesis y en el tratamiento de fuga vascular patogénica. Los polipéptidos de LDCAM, así como los antagonistas y agonistas de LDCAM, pueden existir en forma de oligómeros, tales como dímeros o trímeros ligados covalentemente o ligados no covalentemente. Los oligómeros pueden estar ligados por puentes disulfuro formados entre residuos de cisteína en diferentes polipéptidos de LDCAM. Puede crearse un dímero de LDCAM fusionando LDCAM con la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, IgG1) de manera que no interfiera con la unión de LDCAM a los linfocitos T, B7L-1 o a sí misma. El polipéptido Fc se fusiona preferiblemente con el extremo C de una LDCAM soluble (que comprende solo la unión a receptor). Se ha descrito la preparación general de proteínas de fusión que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados con diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpo (incluyendo el dominio Fc), por ejemplo, por Ashkenazi *et al.* (PNAS USA 88: 10535, 1991) y Byrn *et al.* (Nature 344: 677, 1990). Se inserta un gen de fusión que codifica la proteína de fusión LDCAM:Fc en un vector de expresión apropiado. Las proteínas de fusión LDCAM:Fc se dejan ensamblar parecidamente a moléculas de anticuerpo, tras de lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los polipéptidos de Fc, proporcionando LDCAM divalente. Si las proteínas de fusión se preparan con cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo, es posible formar un oligómero de LDCAM con tantas como cuatro regiones extracelulares de LDCAM. Como alternativa, pueden ligarse dos dominios de LDCAM soluble con un ligador peptídico.

Antagonistas y agonistas como oligómeros basados en inmunoglobulina. Las formas adecuadas de antagonistas y agonistas de LDCAM incluyen proteínas químéricas que incluyen un segundo polipéptido que puede promover la formación espontánea por la proteína química de un dímero, trímero o multímero de orden superior que es capaz de unirse a sus respectivos asociados e inhibir o reducir así los efectos de la inflamación y los síntomas de enfermedades cardiovasculares. Las proteínas químéricas usadas como antagonistas o agonistas pueden ser proteínas que contienen porciones de una molécula de anticuerpo y un polipéptido soluble de LDCAM, B7L-1 o CRTAM. Las proteínas de fusión adecuadas incluyen un polipéptido de LDCAM, B7L-1 o CRTAM, por ejemplo, el dominio extracelular, o un fragmento del dominio extracelular, ligado a una región Fc de inmunoglobulina. Pueden usarse también fragmentos de una región Fc, así como muteínas de Fc que exhiban una afinidad reducida por receptores de Fc. Pueden fusionarse LDCAM soluble, B7L-1 o CRTAM, así como fragmentos de los mismos, directamente o mediante secuencias ligadoras con la porción Fc de una inmunoglobulina.

U antagonista y agonista de LDCAM puede dirigirse a un dímero que comprende dos polipéptidos de fusión creados fusionando un polipéptido de LDCAM, B7L-1 o CRTAM con un polipéptido de Fc derivado de un anticuerpo. Se inserta una fusión génica que codifica dicho polipéptido de fusión en un vector de expresión apropiado. Se expresan los polipéptidos de fusión de LDCAM, B7L-1 o CRTAM-Fc en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y se dejan ensamblar parecidamente a moléculas de anticuerpo, tras de lo cual se forman puentes disulfuro intercatenarios entre los restos de Fc, proporcionando moléculas divalentes. Es un polipéptido de Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, un polipéptido monocatenario que se extiende desde la región de bisagra N-terminal hasta el extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Para una forma divalente de LDCAM, B7L-1 o CRTAM, dicha fusión podría ser con la porción Fc de una molécula de IgG. Pueden usarse otros isotipos de inmunoglobulina para generar dichas fusiones. Por ejemplo, una fusión de polipéptido-IgM generaría una forma decavalente del polipéptido.

Es conocida en la materia la preparación de polipéptidos de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados con diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpo (incluyendo el dominio Fc) y se ha descrito, por ejemplo, por Ashkenazi *et al.* (PNAS USA 88: 10535, 1991); Byrn *et al.* (Nature 344: 677, 1990) y

Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Polypeptides", en "Current Protocols in Immunology", Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992). Es otro polipéptido de Fc útil la muteína Fc descrita en la patente de EE.UU. 5.457.035 y en Baum *et al.*, (EMBO J. 13: 3992-4001, 1994). La secuencia aminoacídica de esta muteína es idéntica a la de la secuencia de Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto porque el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe una afinidad reducida por receptores de Fc. Los polipéptidos de fusión anteriormente descritos que comprenden restos de Fc (y oligómeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de una fácil purificación por cromatografía de afinidad por columnas de polipéptido A o polipéptido G. Los polipéptidos pueden sustituirse por la porción variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Si los polipéptidos de fusión se preparan con cadenas tanto pesadas como ligeras de un anticuerpo, es posible formar un oligómero con tantas como cuatro regiones extracelulares de IL-17R.

Oligómeros basados en un ligador peptídico antagonistas y agonistas de LDCAM. Como alternativa, el oligómero es un polipéptido de fusión que comprende múltiples polipéptidos de LDCAM, B7L-1 y/o CRTAM, con o sin ligadores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los ligadores peptídicos adecuados están aquellos descritos en las patentes de EE.UU. n.º 4.751.180 y 4.935.233. Puede insertarse una secuencia de ADN que codifica un ligador peptídico deseado entre medias de, y en el mismo marco de lectura que, las secuencias de ADN descritas anteriormente usando cualquier técnica convencional adecuada. Por ejemplo, puede ligarse entre las secuencias un oligonucleótido sintetizado químicamente que codifica el ligador. Un polipéptido de fusión comprende de dos a cuatro polipéptidos solubles de LDCAM, B7L-1 o CRTAM, separados por ligadores peptídicos. Los ligadores peptídicos adecuados, su combinación con otros polipéptidos y su uso son bien conocidos por los especialistas en la materia.

Las formas oligoméricas de antagonistas y agonistas de LDCAM pueden incluir un polipéptido de LDCAM, B7L-1 o CRTAM, el dominio extracelular de un polipéptido de LDCAM, B7L-1 y/o CRTAM o un fragmento de LDCAM, B7L-1 y/o CRTAM del dominio extracelular asociado con un dominio de cremallera, tal como las proteínas de cremallera descritas en la patente de EE.UU. n.º 5.716.805. Son otros ejemplos de dominios de cremallera aquellos encontrados en el factor de transcripción de levadura GCN4 y una proteína de unión a ADN termoestable encontrada en hígado de rata (C/EBP; Landschulz *et al.*, Science 243: 1681, 1989), las proteínas transformantes nucleares *fos* y *jun*, que forman preferiblemente un heterodímero (O'Shea *et al.*, Science 245: 646, 1989; Turner y Tjian, Science 243: 1689, 1989) y el producto génico del protooncogén de múrido *c-myc* (Landschulz *et al.*, Science 240: 1759, 1988). Las proteínas fusogénicas de varios virus diferentes, incluyendo paramixovirus, coronavirus, virus del sarampión y muchos retrovirus, poseen también dominios de cremallera de leucina (Buckland y Wild, Nature 338: 547, 1989; Britton, Nature 353: 394, 1991; Delwart y Mosialos, AIDS Research and Human Retroviruses 6: 703, 1990). Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de los polipéptidos en que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varios polipéptidos de unión a ADN y se han encontrado desde entonces en una variedad de diferentes polipéptidos. Entre las cremalleras de leucina conocidas están los péptidos de origen natural y derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. El dominio de cremallera (también designado en la presente memoria como dominio oligomerizante o formador de oligómero) comprende una repetición heptádica repetitiva, a menudo con 4 o 5 residuos de leucina intercalados con otros aminoácidos. Es bien conocido en la materia el uso de cremalleras de leucina y la preparación de oligómeros que usan cremalleras de leucina.

Los polipéptidos de fusión con o sin grupos ligadores aminoacídicos espaciadores, por ejemplo dos dominios de LDCAM, B7L-1 o CRTAM solubles, pueden ligarse con una secuencia ligadora tal como (Gly)₄Ser(Gly)₅Ser (SEQ ID NO:32), que se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.073.627. Otras secuencias ligadoras incluyen, por ejemplo, GlyAlaGlyGlyAlaGlySer(Gly)₅Ser (SEQ ID NO:33), (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO:34), (GlyThrPro)₃ (SEQ ID NO:35) y (Gly₄Ser)₃Gly₄SerGly₅Ser (SEQ ID NO:36).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de antagonistas y agonistas de LDCAM, tales como polipéptidos de LDCAM, B7L-1 o CRTAM, incluyen células procarióticas, de levadura o eucarióticas superiores. Se describen vectores de clonación y expresión apropiados para uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamíferos, por ejemplo, en Pouwels *et al.* "Cloning Vectors: A Laboratory Manual", Elsevier, Nueva York, (1985). Podrían emplearse también sistemas de traducción exentos de células para producir polipéptidos de LDCAM, usando ARN derivados de constructos de ADN dados a conocer en la presente memoria.

Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilli*. Las células hospedadoras procarióticas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas otras especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. En una célula hospedadora procariótica, tal como *E. coli*, un polipéptido de LDCAM puede incluir un residuo de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula hospedadora procariótica. La Met N-terminal puede escindirse del polipéptido de LDCAM recombinante.

Los antagonistas y agonistas de LDCAM tales como polipéptidos de LDCAM, B7L-1 o CRTAM pueden expresarse en células hospedadoras de levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*). Pueden emplearse también otros géneros de levadura, tales como *Pichia*, *K. lactis* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán a menudo una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levadura 2μ, una

5 secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores de metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255: 2073, 1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149, 1968 y Holland *et al.*, Biochem. 17: 4900, 1978) tales como enolasa, gliceraldehído-2-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Se describen adicionalmente otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura en Hitzeman, documento EPA-73.657 o en Fleer *et al.*, Gene, 107: 285-195 (1991) y van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8: 135-139 (1990). Es otra alternativa el promotor ADH2 reprimible por glucosa descrito por Russell *et al.* (J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982) y Beier *et al.* (Nature 300: 724, 1982). Pueden construirse vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* insertando secuencias de ADN de pBR322 para selección y replicación en *E. coli* (gen y origen de replicación Amp^r) en los vectores de levadura anteriormente descritos.

15 La secuencia líder del factor α de levadura puede emplearse para dirigir la secreción del polipéptido de LDCAM. La secuencia líder del factor α se inserta a menudo entre la secuencia promotora y la secuencia génica estructural. Véanse, por ejemplo, Kurjan *et al.*, Cell 30: 933, 1982; Bitter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330, 1984; patente de EE.UU. n° 4.546.082 y EP 324.274. Son conocidas por los especialistas en la materia otras secuencias líder adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes desde hospedadores de levadura. Una secuencia líder puede modificarse cerca de su extremo 3' para contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia líder con el gen estructural.

20 Son conocidos por los especialistas en la materia los protocolos de transformación de levadura. Se describe uno de dichos protocolos por Hinnen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978. El protocolo de Hinnen *et al.* selecciona transformantes Trp⁺ en un medio selectivo, en el que el medio selectivo consiste en 0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,5% de casaminoácidos, 2% de glucosa, adenina 10 $\mu\text{g/ml}$ y uracilo 20 $\mu\text{g/ml}$.

25 Las células hospedadoras de levadura transformadas por vectores que contienen la secuencia promotora ADH2 pueden cultivarse para inducir la expresión en un medio "rico". Es un ejemplo de un medio rico aquel consistente en 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 1% de glucosa, suplementado con adenina 80 $\mu\text{g/ml}$ y uracilo 80 $\mu\text{g/ml}$. Aparece la desrepresión de promotor ADH2 cuando se agota la glucosa del medio.

30 Podrían emplearse también sistemas de cultivo de células hospedadoras de mamífero o insecto para expresar polipéptidos de LDCAM recombinantes. Se revisan los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogoas en células de insecto por Luckow y Summers, Bio/Technology 6: 47 (1988). Pueden emplearse también estirpes celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de estirpes celulares de mamífero adecuadas incluyen la estirpe COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, Cell 23: 175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa y estirpes celulares BHK (ATCC CRL 10) y la estirpe celular CV-1/EBNA-1, derivada de la estirpe celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) como se describe por McMahan *et al.* (EMBO J. 10: 2821,1991).

35 Las secuencias de control transcripcional y traduccional para vectores de expresión de células hospedadoras de mamífero pueden extraerse de genomas víricos. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras usadas habitualmente derivan de poliomavirus, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano. Pueden usarse secuencias de ADN derivadas del genoma vírico de SV40, por ejemplo, el origen, sitios promotor temprano y tardío, potenciador, de corte y empalme y de poliadenilación de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula hospedadora de mamífero. Los promotores víricos temprano y tardío son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente a partir de un genoma vírico en forma de un fragmento que puede contener también un origen de replicación vírico (Fiers *et al.*, Nature 273: 113, 1978). Pueden usarse también fragmentos de SV40 más cortos o largos, a condición de que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hasta el sitio *Bgl* I localizado en el sitio de origen de replicación vírico de SV40.

40 Los vectores de expresión ejemplares para uso en células hospedadoras de mamífero pueden construirse como se da a conocer por Okayama y Berg (Mol. Cell. Biol. 3: 280, 1983). Puede construirse un sistema útil para una expresión de alto nivel estable de ADNc de mamífero en células epiteliales de mamífero múrido C127 sustancialmente como se describe por Cosman *et al.* (Mol. Immunol. 23: 935, 1986). Se ha depositado un vector de alta expresión útil, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman *et al.*, Nature 312: 768, 1984, como ATCC 39890. Se describen vectores de expresión de mamífero útiles adicionales en el documento EP-A-0367566 y en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 07/701.415, presentada el 16 de mayo de 1991. Los vectores pueden derivar de retrovirus. En lugar de la secuencia señal nativa, y además de una metionina iniciadora, puede añadirse una secuencia señal heteróloga, tal como la secuencia señal de IL-7 descrita en la patente de EE.UU. n° 4.965.195, la secuencia señal de receptor de IL-2 descrita en Cosman *et al.*, Nature 312: 768 (1984), la secuencia señal de IL-4 descrita en el documento EP 367.566, el péptido señal de receptor de IL-1 de tipo I descrito en la patente de EE.UU. n° 4.968.607 y el péptido señal de receptor de IL-1 de tipo II descrito en el documento EP 460.846.

Los antagonistas y agonistas de LDCAM, en forma de proteína aislada, purificada u homogénea según la invención, pueden producirse mediante sistemas de expresión recombinantes como se describen anteriormente o purificarse a partir de células de origen natural. La LDCAM puede purificarse hasta homogeneidad sustancial, como se indica por una sola banda de proteína tras análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS).

5 Un proceso para producir LDCAM comprende cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica LDCAM en condiciones suficientes para promover la expresión de LDCAM. Se recupera entonces la LDCAM del medio de cultivo o extractos celulares, dependiendo del sistema de expresión empleado. Como es conocido por el especialista en la materia, los procedimientos para purificar una proteína recombinante variarán según factores tales como el tipo de células hospedadoras empleadas y si la proteína recombinante se secreta o no en el medio de cultivo.

10 Por ejemplo, cuando se emplean sistemas de expresión que secretan la proteína recombinante, el medio de cultivo puede concentrarse en primer lugar usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, puede aplicarse el concentrado a una matriz de purificación tal como un medio de filtración en gel. Como alternativa, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetilo (DEAE) pendientes. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados habitualmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo. Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (HPLC-FI) que emplean medios de HPLC-FI hidrófobos (por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros alifáticos pendientes) para purificar adicionalmente la LDCAM. Son bien conocidas algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, y pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante sustancialmente homogénea.

15 Es posible utilizar una columna de afinidad que comprende el dominio de unión a ligando de una proteína de unión a LDCAM para purificar por afinidad polipéptidos de LDCAM expresados. Los polipéptidos de LDCAM pueden eliminarse de la columna de afinidad usando técnicas convencionales, por ejemplo en un tampón de elución rico en sales, y dializarse entonces con un tampón pobre en sales para uso, o cambiarse el pH u otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada. Como alternativa, la columna de afinidad puede comprender un anticuerpo que se une a LDCAM. El ejemplo 10 describe un procedimiento para emplear LDCAM para generar anticuerpos monoclonales dirigidos contra LDCAM.

20 La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano puede aislarse mediante la disociación inicial de las células hospedadoras, centrifugación, extracción a partir de aglomerados celulares si es un polipéptido insoluble, o a partir del fluido sobrenadante si es un polipéptido soluble, seguido de una o más etapas de concentración, desalado, intercambio iónico, purificación por afinidad o cromatografía de exclusión por tamaño. Finalmente, puede emplearse HPLC-FI para las etapas de purificación finales. Las células microbianas pueden disociarse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, disociación mecánica o el uso de agentes de lisado celular.

25 Se emplean preferiblemente células hospedadoras de levadura transformadas para expresar LDCAM en forma de un polipéptido secretado para simplificar la purificación. El polipéptido recombinante secretado desde una fermentación de células hospedadoras de levadura puede purificarse mediante métodos análogos a los dados a conocer por Urdal *et al.* (*J. Chromatog.* 296: 171, 1984). Urdal *et al.* describen dos etapas de HPLC en fase inversa secuenciales para la purificación de IL-2 humana recombinante en una columna de HPLC preparativa.

30 Los fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de LDCAM incluyen oligonucleótidos anticodificante o codificantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (de ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm de LDCAM diana (codificante) o de ADN de LDCAM (anticodificante). Los oligonucleótidos codificantes o anticodificantes, como se dan a conocer en la presente memoria, comprenden un fragmento de la región de codificación del ADNc de LDCAM. Dicho fragmento comprende generalmente al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido anticodificante o codificante basándose en la secuencia de ADNc que codifica una proteína dada, se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen (*Cancer Res.* 48: 2659, 1988) y van der Krol *et al.* (*BioTechniques* 6: 958, 1988).

4. CRTAM

35 Como se describe anteriormente, los antagonistas y agonistas de LDCAM comprenden anticuerpos específicos de CRTAM, peptidocuerpos específicos de CRTAM o polipéptidos solubles que se unen a CRTAM (tales como LDCAM) y que modulan los efectos biológicos posteriores a la unión a CRTAM a uno o más copartícipes de unión a CRTAM, tales como LDCAM. La CRTAM se describe en la patente de EE.UU. nº 5.686.257. La secuencia de CRTAM humana se proporciona en la SEQ ID NO:11.

5. Ensayos de actividades de antagonistas y agonistas de LDCAM

Los polipéptidos de LDCAM de la invención (incluyendo polipéptidos, fragmentos, variantes, oligómeros y otras formas) son útiles en una variedad de ensayos.

Las realizaciones incluyen ensayos de cribado para identificar compuestos de ensayo que actúan como agonistas o antagonistas de LDCAM. Se prevén una serie de formatos y permutaciones de los mismos incluyendo, pero sin limitación: un método de cribado de un antagonista o agonista de LDCAM que comprende: (a) combinar un polipéptido de LDCAM aislado con un compuesto de ensayo; (b) añadir un polipéptido de CRTAM aislado y (c) determinar la unión relativa entre el polipéptido de LDCAM y el polipéptido de CRTAM en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Una realización alternativa incluye un método de cribado de un antagonista o agonista de LDCAM que comprende: (a) combinar una célula que expresa un polipéptido de LDCAM con un compuesto de ensayo; (b) añadir un polipéptido de CRTAM aislado y (c) determinar la unión relativa entre la célula que expresa un polipéptido de LDCAM y el polipéptido de CRTAM en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Una realización alternativa incluye un método de cribado de un antagonista o agonista de LDCAM que comprende: (a) combinar una célula que expresa un polipéptido de LDCAM con un compuesto de ensayo; (b) añadir una célula que expresa un polipéptido de CRTAM y (c) determinar la unión relativa entre la célula que expresa un polipéptido de LDCAM y la célula que expresa el polipéptido de CRTAM en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Una realización alternativa incluye un método de cribado de un antagonista o agonista de LDCAM que comprende: (a) combinar un polipéptido de LDCAM aislado con un compuesto de ensayo; (b) añadir una célula que expresa un polipéptido de CRTAM y (c) determinar la unión relativa entre el polipéptido de LDCAM y las células que expresan un polipéptido de CRTAM en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Una realización alternativa incluye un método de cribado de un agonista de LDCAM que comprende: (a) combinar un polipéptido de CRTAM aislado con un compuesto de ensayo y (b) determinar la unión relativa entre el compuesto de ensayo y el polipéptido de CRTAM. Una realización alternativa incluye un método de cribado de un agonista de LDCAM que comprende: (a) combinar una célula que expresa un polipéptido de CRTAM y (b) determinar la unión relativa o los efectos biológicos entre la célula que expresa un polipéptido de CRTAM y el compuesto de ensayo.

Por ejemplo, la LDCAM y las moléculas de tipo LDCAM dadas a conocer en la presente memoria pueden usarse para identificar copartícipes de unión de polipéptidos de LDCAM, que pueden usarse también para modular la comunicación intercelular, estimulación celular o actividad celular inmunitaria. Como alternativa, pueden usarse para identificar moléculas no copartícipes de unión o sustancias, concretamente antagonistas o agonistas de LDCAM, que modulan la comunicación intercelular, las rutas estimulantes celulares o la actividad celular inmunitaria.

Los polipéptidos de LDCAM encuentran uso también en la medida de la actividad biológica de polipéptidos de unión a LDCAM en términos de su afinidad de unión. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, LDCAM, CRTAM, B7L-4, B7L-1, así como anticuerpos y peptidocuerpos anti-LDCAM. Pueden emplearse los ejemplos enumerados anteriormente por los que realizan estudios de "control de calidad", por ejemplo, para monitorizar la vida de almacenamiento y estabilidad de polipéptido en diferentes condiciones. Por ejemplo, los polipéptidos de LDCAM pueden emplearse en un estudio de afinidad de unión para medir la actividad biológica de un polipéptido copartícipe de unión tal como, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1, B7L-4 y CRTAM, que se ha almacenado a diferentes temperaturas o producido en diferentes tipos celulares. Los polipéptidos pueden usarse también para determinar si se retiene una actividad biológica después de la modificación de un polipéptido copartícipe de unión (por ejemplo, modificación química, truncamiento, mutación, etc.). La afinidad de unión del polipéptido modificado se compara con la de un polipéptido de unión no modificado para detectar cualquier impacto adverso de las modificaciones sobre la actividad biológica del polipéptido de unión.

Ensayos para identificar copartícipes de unión. Los polipéptidos de LDCAM y fragmentos de la misma pueden usarse para identificar copartícipes de unión. Los copartícipes de unión de LDCAM incluyen, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1, B7L-4 y CRTAM. Por ejemplo, puede ensayarse su capacidad de unirse a un candidato a copartícipe de unión en cualquier ensayo adecuado, tal como un ensayo de unión convencional. Para ilustrar, el polipéptido de LDCAM puede marcarse con un reactivo detectable (por ejemplo, un radionucleido, cromóforo, enzima que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica y similares). El polipéptido de LDCAM marcado se pone en contacto con células que expresan el candidato a copartícipe de unión. Se lavan entonces las células para eliminar el polipéptido marcado no unido y se determina la presencia del marcador unido a célula mediante una técnica adecuada, elegida según la naturaleza del marcador.

Los polipéptidos de LDCAM descritos anteriormente pueden usarse cada uno como reactivos en métodos para cribar o identificar copartícipes de unión tales como, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1, B7L-4 y CRTAM. Por ejemplo, los polipéptidos de LDCAM pueden enlazarse con un material de soporte sólido y pueden unirse a sus copartícipes de unión de manera similar a la cromatografía de afinidad. Un polipéptido puede enlazarse con un soporte sólido mediante procedimientos convencionales. Como ejemplo, están disponibles columnas de cromatografía que reaccionarán con los grupos funcionales en las cadenas laterales aminoácidas de polipéptidos (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). Como alternativa, se enlaza una proteína de fusión de polipéptido de LDCAM/Fc (como se discute anteriormente) con columnas de cromatografía que contienen proteína A o proteína G mediante interacción con el resto Fc. Los polipéptidos de LDCAM encuentran uso también en la identificación de células que expresan un copartícipe de unión a LDCAM sobre la superficie celular tal como, pero

sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1, B7L-4 y CRTAM. Los polipéptidos de LDCAM purificados, así como otras formas tales como variantes, fragmentos, proteínas de fusión o derivados, están unidos a una fase sólida tal como una matriz de cromatografía en columna o un sustrato adecuado similar. Por ejemplo, pueden recubrirse microesferas magnéticas con polipéptidos y mantenerse en un matraz de incubación bajo un campo magnético. Se ponen en contacto suspensiones de mezclas de células que contienen células de expresión de copartícipe de unión potenciales con la fase sólida que tiene los polipéptidos sobre ella. Las células que expresan el copartícipe de unión sobre la superficie celular se unen a los polipéptidos fijados, y las células no unidas se separan por lavado. Como alternativa, los polipéptidos de LDCAM pueden conjugarse con un resto detectable e incubarse entonces con células para ensayar la expresión del copartícipe de unión. Después de la incubación, se elimina el material marcado no unido y se determina la presencia o ausencia del resto detectable en las células. En una realización alternativa, se incuban mezclas de células sospechosas de expresar el copartícipe de unión con polipéptidos biotinilados. Los periodos de incubación son típicamente de al menos una hora de duración para asegurar una unión suficiente. Se pasa entonces la mezcla resultante a través de una columna empaquetada con perlas recubiertas de avidina, con lo que la alta afinidad de la biotina por la avidina proporciona la unión de las células deseadas a las perlas. Son conocidos los procedimientos para uso de perlas recubiertas de avidina (véase Berenson, *et al.* J. Cell. Biochem., 10D: 239, 1986). Se efectúa el lavado para eliminar el material no unido y la liberación de las células unidas usando métodos convencionales. En algunos casos, los métodos anteriores para cribar o identificar copartícpes de unión pueden usarse o modificarse también para aislar o purificar dichas moléculas copartícpes de unión o células que las expresan. Los ejemplos de copartícpes de unión descubiertos mediante dichos métodos incluyen, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1, B7L-4 y CRTAM, como se describe en los ejemplos.

Es un ejemplo de procedimiento de ensayo de unión como sigue. Se construye un vector de expresión recombinante que contiene el ADNc de candidato a copartícipe de unión (tal como, pero sin limitación, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1, B7L-4 y CRTAM). Se transfectan células CV1-EBNA-1 en discos de 10 cm² con este vector de expresión recombinante. Las células CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478) expresan constitutivamente antígeno 1 nuclear de EBV activado por el potenciador/promotor inmediato-temprano de CMV. Se derivaron las CV1-EBNA-1 de la estirpe celular CV-1 de riñón de mono verde africano (ATCC CCL 70), como se describe por McMahan *et al.*, (EMBO J. 10: 2821, 1991). Se cultivan las células transfectadas durante 24 horas y se dividen las células de cada disco en una placa de 24 pocillos. Después de cultivar durante 48 horas adicionales, se lavan las células transfectadas (aproximadamente 4 x 10⁴ células/pocillo) con BM-NFDM, que es un medio de unión (RPMI 1640 que contiene seroalbúmina bovina 25 mg/ml, azida de sodio 2 mg/ml, HEPES 20 mM, pH 7,2) al que se ha añadido leche desecada no desnatada 50 mg/ml. Se incuban entonces las células durante 1 hora a 37°C con diversas concentraciones de, por ejemplo, un polipéptido de fusión de LDCAM de polipéptido soluble/Fc preparado como se expone anteriormente. Se lavan entonces las células y se incuban con una concentración saturada constante de una ¹²⁵I-IgG de ratón anti-humana en medio de unión, con agitación suave durante 1 hora a 37°C. Después de un extenso lavado, se liberan las células mediante tripsinación. Se dirige la IgG de ratón anti-humana empleada anteriormente contra la región Fc de IgG humana, y puede obtenerse en Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. Se radioyoda el anticuerpo usando el método de cloramina T estándar. El anticuerpo se unirá a la porción Fc de cualquier polipéptido de LDCAM/polipéptido de Fc que se haya unido a las células. En todos los ensayos, se ensaya la unión no específica de ¹²⁵I-anticuerpo en ausencia de polipéptido de fusión de Fc/Fc, así como en presencia del polipéptido de fusión de Fc y un exceso molar de 200 veces de anticuerpo IgG de ratón anti-humano no marcado. Se cuantifica el ¹²⁵I-anticuerpo unido a célula en un contador Packard Autogamma. Se generan los cálculos de afinidad (Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660, 1949) en RS/1 (BBN Software, Boston, MA) procesado en un ordenador Microvax. La unión puede detectarse también usando métodos que son bien adecuados para procedimientos de cribado de alto rendimiento, tales como ensayos de centelleo por proximidad (Udenfriend *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8672-8676), métodos de fluorescencia de resolución temporal homogéneos (Park *et al.*, 1999, Anal. Biochem. 269: 94-104), métodos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (Clegg RM, 1995, Curr. Opin. Biotechnol. 6: 103-110) o métodos que miden cualquier cambio en la resonancia de plasmón superficial cuando se expone un polipéptido unido a un copartícipe de unión potencial usando, por ejemplo, un biosensor tal como se suministra por Biacore AB (Uppsala, Suecia). Los compuestos en que puede ensayarse la unión de polipéptidos de LDCM y/o de tipo LDCAM incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas tales como aquellas comercialmente disponibles, a menudo como parte de grandes "colecciones" de compuestos de química combinatoria, en compañías tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Arqual (Woburn, MA), Enzymed (Iowa City, IA), Maybridge Chemical Co.(Trevillet, Cornwall, RU), MDS Panlabs (Bothell, WA), Pharmacopeia (Princeton, NJ) y Trega (San Diego, CA). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas para cribado que usan estos ensayos son habitualmente de menos de 10 kDa de peso molecular y pueden poseer una serie de propiedades fisicoquímicas y farmacológicas que potencien la penetración celular, resistan la degradación y/o prolonguen sus semividas fisiológicas (Gibbs, J., 1994, "Pharmaceutical Research in Molecular Oncology", Cell 79 (2): 193-198). Puede ensayarse también usando estos métodos la capacidad de unirse a polipéptidos de LDCAM en compuestos que incluyen productos naturales, productos químicos inorgánicos y materiales biológicamente activos tales como proteínas y toxinas.

Ensayos de doble híbrido de levadura o "trampa interactiva". Cuando el polipéptido de LDCAM se une o se une potencialmente a otro polipéptido (tal como, por ejemplo, LDCAM (agregación homotípica), B7L-1 y CRTAM), puede usarse también el ácido nucleico que codifica el polipéptido de LDCAM en ensayos de trampa interactiva (tales como, por ejemplo, el descrito en Gyuris *et al.*, Cell 75: 791-803 (1993)) para identificar ácidos nucleicos que

codifican el otro polipéptido con el que aparece unión o para identificar inhibidores de la interacción de unión. Los polipéptidos implicados en estas interacciones de unión pueden usarse también para cribar inhibidores o agonistas de la interacción de unión peptídicos o de molécula pequeña.

5 Ensayos de unión competitiva. Es otro tipo de ensayo de unión adecuado un ensayo de unión competitiva. Para ilustrar, la actividad biológica de una variante puede determinarse ensayando la capacidad de la variante de competir con el polipéptido nativo en la unión al candidato a copartícipe de unión. Los ensayos de unión competitiva pueden efectuarse mediante metodología convencional. Los reactivos que pueden emplearse en ensayos de unión competitiva incluyen LDCAM radiomarcada y células intactas que expresan polipéptidos de LDCAM, B7L-1, B7L-4 o CRTAM (endógenos o recombinantes) sobre la superficie celular. Por ejemplo, puede usarse un fragmento de LDCAM soluble radiomarcado, tal como un constructo de LDCAM-Fc descrito en los ejemplos, para competir con una variante de LDCAM soluble por la unión a copartícipes de unión. Puede usarse un polipéptido de fusión copartícipe de unión/Fc soluble unido a una fase sólida mediante la interacción de polipéptido A o polipéptido G (sobre la fase sólida) con el resto Fc. Las columnas de cromatografía que contienen polipéptido A y polipéptido G incluyen aquellas disponibles en Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ.

15 Ensayos para identificar moduladores de la comunicación celular, estimulación celular o actividad celular inmunitaria. Puede manipularse la influencia de polipéptidos de LDCAM sobre la comunicación celular, estimulación celular o actividad celular inmunitaria para controlar estas actividades en células diana. Por ejemplo, los polipéptidos de LDCAM dados a conocer, ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de LDCAM dados a conocer o agonistas o antagonistas de dichos polipéptidos, pueden administrarse a una célula o grupo de células para inducir, potenciar, suprimir, o detener la unión celular, comunicación celular, estimulación celular o actividad de las células diana. La identificación de polipéptidos de LDCAM, agonistas o antagonistas que pueden usarse de esta manera puede llevarse a cabo mediante una variedad de ensayos conocidos por los especialistas en la materia. Se incluyen en dichos ensayos aquellos que evalúan la capacidad de un polipéptido de LDCAM de influir en la unión celular, comunicación intercelular, estimulación o actividad celular. Dicho ensayo implicaría, por ejemplo, el análisis de la interacción de células inmunitarias en presencia de un polipéptido de LDCAM. En dicho ensayo, se determinaría la tasa de comunicación o estimulación celular en presencia del polipéptido de LDCAM y se determinaría entonces si dicha comunicación o estimulación celular se altera en presencia de un candidato a agonista o antagonista u otro polipéptido de LDCAM. Los ensayos ejemplares de este aspecto de la invención incluyen ensayos de secreción de citocina, ensayos de coestimulación de linfocitos T y reacciones de linfocitos mixtos que implican células presentadoras de antígeno y linfocitos T. Estos ensayos son bien conocidos por los especialistas en la materia. Se presentan ensayos adicionales en la sección de ejemplos siguiente.

25 Ensayos de proliferación celular, muerte celular, diferenciación celular y adhesión celular. Un polipéptido útil en los métodos de la presente invención puede exhibir actividad citocínica de proliferación celular (inductora o inhibidora) o de diferenciación celular (inductora o inhibidora), o puede inducir la producción de otras citocinas en ciertas poblaciones celulares. Muchos factores polipeptídicos descubiertos hasta la fecha han exhibido dicha actividad en uno o más ensayos de proliferación celular dependientes de factor, y por tanto los ensayos sirven como confirmación conveniente de la actividad estimulante celular. La actividad del polipéptido útil en los métodos de la presente invención se prueba mediante uno cualquiera de una serie de ensayos de proliferación celular dependientes de factor rutinarios para estirpes celulares que incluyen, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK. La actividad de un polipéptido útil en los métodos de LDCAM de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes métodos:

35 Los ensayos de proliferación de linfocitos T o timocitos incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* eds, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (pág. 3.1-3.19: "In vitro assays for mouse lymphocyte function"; Capítulo 7: "Immunologic studies in humans"); Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137: 3494-3500, 1986; Bertagnolli *et al.*, *J. Immunol.* 145: 1706-1712, 1990; Bertagnolli *et al.*, *Cellular Immunology* 133: 327-341, 1991; Bertagnolli, *et al.*, *J. Immunol.* 149: 3778-3783, 1992; Bowman *et al.*, *J. Immunol.* 152: 1756-1761, 1994.

45 Los ensayos de producción de citocinas y/o proliferación de células de bazo, células de nódulo linfático o timocitos incluyen, pero sin limitación, aquellos descritos en: Kruisbeek y Shevach, 1994, "Polyclonal T cell stimulation", en "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed. vol 1 pág. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto y Schreiber, 1994, "Measurement of mouse and human interferon gamma in Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed. vol 1 pág. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto.

50 Los ensayos de proliferación y diferenciación de células hematopoyética y linfopoyéticas incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Bottomly *et al.*, 1991, "Measurement of human and murine interleukin 2 and interleukin 4", en "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed. vol 1 pág. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto; deVries *et al.*, *J. Exp. Med.* 173: 1205-1211, 1991; Moreau *et al.*, *Nature* 336: 690-692, 1988; Greenberger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2931-2938, 1983; Nordan, 1991, "Measurement of mouse and human interleukin 6", en "Current Protocols in Immunology" Coligan *et al.* ed. vol 1 pág. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto; Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1857-1861, 1986; Bennett *et al.*, 1991, "Measurement of human interleukin 11", en "Current Protocols in Immunology"; Coligan *et al.* ed. vol 1 pág. 6.15.1 John Wiley and Sons,

Toronto; Ciarletta *et al.*, 1991, "Measurement of mouse and human Interleukin 9", en "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed. vol 1 pág. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto.

5 Los ensayos de respuestas clonales de linfocitos T frente a antígenos (que identificarán, entre otros, a polipéptidos que afectan a las interacciones de CPA-linfocitos T así como a los efectos directos de linfocitos T mediante la medida de la proliferación y producción de citocina) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3: "In vitro assays for mouse lymphocyte function"; capítulo 6: "Cytokines and their cellular receptors"; capítulo 7: "Immunologic studies in humans"); Weinberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6091-6095, 1980; Weinberger *et al.*, Eur. J. Immunol. 11: 405-411, 1981; Takai *et al.*, J. Immunol., 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988.

10 Los ensayos de citotoxicidad de timocitos o esplenocitos incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3, "In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19"; capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bowman *et al.*, J. Virology 61: 1992-1998; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Brown *et al.*, J. Immunol. 153: 3079-3092, 1994.

15 Los ensayos de respuestas de inmunoglobulina dependientes de linfocitos T y conmutación isotípica (que identificarán, entre otros, polipéptidos que modulan las respuestas de anticuerpo dependientes de linfocitos T y que afectan a los perfiles de Th1/Th2) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Maliszewski, J. Immunol. 144: 3028-3033, 1990 y Mond y Brunswick, 1994, "Assays for B cell function: in vitro antibody production", en "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed. vol 1 pág. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto.

20 Los ensayos de reacción de linfocitos mixtos (MLR) (que identificarán entre otros, polipéptidos que generan predominantemente respuestas Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: "Current Protocols in Immunology", Coligan *et al.* ed, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3, "In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19"; capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992.

25 Los ensayos dependientes de células dendríticas (que identificarán, entre otros, polipéptidos expresados por células dendríticas que activan linfocitos inmaduros) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Guery *et al.*, J. Immunol. 134: 536-544, 1995; Inaba *et al.*, J. Exp. Med. 173: 549-559, 1991; Macatonia *et al.*, J. Immunol. 154: 5071-5079, 1995; Porgador *et al.*, J. Exp. Med. 182: 255-260, 1995; Nair *et al.*, J. Virology 67: 4062-4069, 1993; Huang *et al.*, Science 264: 961-965, 1994; Macatonia *et al.*, J. Exp. Med. 169: 1255-1264, 1989; Bhardwaj *et al.*, J. Clin. Invest. 94: 797-807, 1994 e Inaba *et al.*, J. Exp. Med. 172: 631-640, 1990.

30 Los ensayos de supervivencia/apoptosis linfocítica (que identificarán, entre otros, polipéptidos que evitan la apoptosis después de la inducción de superantígeno y polipéptidos que regulan la homeostasis linfocítica) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Darzynkiewicz *et al.*, Cytometry 13: 795-808, 1992; Gorczyca *et al.*, Leukemia 7: 659-670, 1993; Gorczyca *et al.*, Cancer Research 53: 1945-1951, 1993; Itoh *et al.*, Cell 66: 233-243, 1991; Zacharchuk, J. Immunol. 145: 4037-4045, 1990; Zamai *et al.*, Cytometry 14: 891-897, 1993; Gorczyca *et al.*, International Journal of Oncology 1: 639-648, 1992.

35 Los ensayos de polipéptidos que influyen en las etapas tempranas de la agrupación y desarrollo de linfocitos T incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Antica *et al.*, Blood 84: 111-117, 1994; Fine *et al.*, Cell. Immunol. 155: 111-122, 1994; Galy *et al.*, Blood 85: 2770-2778, 1995; Toki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7548-7551, 1991

40 Los ensayos de diferenciación de células madre embrionarias (que identificarán, entre otros, polipéptidos que influyen en la hematopoyesis de diferenciación embrionaria) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Johansson *et al.*, Cellular Biology 15: 141-151, 1995; Keller *et al.*, "Molecular and Cellular Biology" 13: 473-486, 1993; McClanahan *et al.*, Blood 81: 2903-2915, 1993.

45 Los ensayos de supervivencia y diferenciación de células madre (que identificarán, entre otros, polipéptidos que regulan la linfematopoyesis) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: "Methylcellulose colony forming assays", Freshney, 1994, en "Culture of Hematopoietic Cells", Freshney *et al.* ed. pág. 265-268, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Hirayama *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5907-5911, 1992; "Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potencial", McNiece and Briddell, 1994, en "Culture of Hematopoietic Cells", Freshney *et al.* ed. pág. 23-39, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Neben *et al.*, "Experimental Hematology" 22: 353-359, 1994; Ploemacher, 1994, "Cobblestone area forming cell assay", en "Culture of

Hematopoietic Cells”, Freshney *et al.* ed. pág. 1-21, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Spooncer *et al.*, 1994, “Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells”, en “Culture of Hematopoietic Cells”, Freshney *et al.* ed. pág. 163-179, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Sutherland, 1994, “Long term culture initiating cell assay”, en “Culture of Hematopoietic Cells”, Freshney *et al.* ed. vol. pág. 139-162, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY.

Los ensayos de actividad de generación de tejido incluyen, sin limitación, aquellos descritos en la publicación de patente internacional nº WO95/16035 (hueso, cartílago, tendón); publicación de patente internacional nº WO95/05846 (nervio, neurona); publicación de patente internacional nº WO91/07491 (piel, endotelio). Los ensayos de actividad de curación de heridas incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Winter, “Epidermal Wound Healing”, págs. 71-112 (Maibach and Rovee, eds.), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, modificado por Eaglstein y Mertz, *J. Invest. Dermatol.* 71: 382-84 (1978).

Los ensayos de actividad activina/inhibina incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Vale *et al.*, *Endocrinology* 91: 562-572, 1972; Ling *et al.*, *Nature* 321: 779-782, 1986; Vale *et al.*, *Nature* 321: 776-779, 1986; Mason *et al.*, *Nature* 318: 659-663, 1985; Forage *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3091-3095, 1986.

Los ensayos de movimiento y adhesión celular incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: “Current Protocols in Immunology”, Coligan *et al.* ed, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 6.12, “Measurement of alpha and beta chemokines 6.12.1-6.12.28”); Taub *et al.* *J. Clin. Invest.* 95: 1370-1376, 1995; Lind *et al.* *APMIS* 103: 140-146, 1995; Muller *et al.* *Eur. J. Immunol.* 25: 1744-1748; Gruber *et al.* *J. Immunol.* 152: 5860-5867, 1994; Johnston *et al.* *J. Immunol.* 153: 1762-1768, 1994.

Los ensayos de actividad hemostática y trombolítica incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Linet *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* 26: 131-140, 1986; Burdick *et al.*, *Thrombosis Res.* 45: 413-419, 1987; Humphrey *et al.*, *Fibrinolysis* 5: 71-79 (1991); Schaub, *Prostaglandins* 35: 467-474, 1988.

Los ensayos de actividad receptor-ligando incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: “Current Protocols in Immunology”, Coligan *et al.* eds, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 7.28, “Measurement of cellular adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22”), Takai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6864-6868, 1987; Bierer *et al.*, *J. Exp. Med.* 168: 1145-1156, 1988; Rosenstein *et al.*, *J. Exp. Med.* 169: 149-160, 1989; Stoltenborg *et al.*, *J. Immunol. Methods* 175: 59-68, 1994; Stitt *et al.*, *Cell* 80: 661-670, 1995.

Los ensayos de actividad adhesiva de cadherina y supresora invasiva incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Hortsch *et al.* *J. Biol. Chem.* 270 (32): 18809-18817, 1995; Miyaki *et al.* *Oncogene* 11: 2547-2552, 1995; Ozawa *et al.* *Cell* 63: 1033-1038, 1990.

6. Diagnóstico y otros usos de antagonistas y agonistas de LDCAM

Los ácidos nucleicos que codifican los antagonistas y agonistas de LDCAM proporcionados por la presente invención pueden usarse para numerosos fines de diagnóstico u otros útiles. Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse para expresar polipéptidos recombinante para análisis, caracterización o uso terapéutico; como marcadores para tejidos en que se expresa preferiblemente el correspondiente polipéptido (constitutivamente o en una etapa particular de la diferenciación de tejido o desarrollo o en estados patológicos); como marcadores de peso molecular en geles Southern; como marcadores o marcajes cromosómicos (cuando están marcados) para identificar cromosomas o para cartografiar posiciones génicas relacionadas; para comparar con secuencias de ADN endógeno en pacientes para identificar trastornos genéticos potenciales; como sondas para hibridar y por tanto descubrir secuencias de ADN relacionadas novedosas; como fuente de información para derivar cebadores de PCR para identificación genética; como sonda para “sustraer” secuencias conocidas en el proceso de descubrimiento de otros ácidos nucleicos novedosos; para seleccionar y preparar oligómeros de enlace con un “chip genético” u otro soporte, incluyendo para el examen de patrones de expresión; para generar anticuerpos antipolipeptídicos usando técnicas de inmunización de ADN; como antígeno para generar anticuerpos anti-ADN o para desencadenar otra respuesta inmunitaria y para terapia génica. Los usos de polipéptidos de LDCAM y polipéptidos fragmentados incluyen, pero sin limitación, los siguientes: purificar polipéptidos y medir la actividad de los mismos; agentes de suministro; agentes terapéuticos y de investigación; marcadores de peso molecular y de enfoque isoelectrico; controles de la fragmentación peptídica; identificación de polipéptidos desconocidos y preparación de anticuerpos. Cualquiera o todos los ácidos nucleicos adecuados para estos usos pueden desarrollarse con pureza de reactivo o formato de kit para comercialización como productos. Los métodos para efectuar los usos enumerados anteriormente son bien conocidos por los especialistas en la materia. Las referencias que dan a conocer dichos métodos incluyen, sin limitación, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis ed., 1989 y “Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques”, Academic Press, Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1987.

Sondas y cebadores: Entre los usos de los ácidos nucleicos de LDCAM dados a conocer, y las combinaciones y fragmentos de los mismos, está el uso de fragmentos como sondas o cebadores. Dichos fragmentos comprenden generalmente al menos aproximadamente 17 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras realizaciones, un fragmento de ADN comprende al menos 30, o al menos 60, nucleótidos contiguos de una

secuencia de ADN. Se exponen los parámetros básicos que afectan a la elección de las condiciones de hibridación y la guía para idear las condiciones adecuadas por Sambrook *et al.*, 1989, y se describen con detalle anteriormente. Usando el conocimiento del código genético en combinación con las secuencias aminoacídicas expuestas anteriormente, pueden prepararse conjuntos de oligonucleótidos degenerados. Dichos oligonucleótidos son útiles como cebadores, por ejemplo, en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la que se aíslan y amplifican fragmentos de ADN. Pueden usarse cebadores degenerados como sondas para colecciones genéticas no humanas. Dichas colecciones incluirían, pero sin limitación, colecciones de ADNc, colecciones genómicas e incluso colecciones electrónicas de EST (marcador de secuencia expresada) o ADN. Se usarían entonces secuencias homólogas identificadas mediante este método como sondas para identificar homólogos de LDCAM no humanos

5 Cartografía cromosómica. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de LDCAM, y los fragmentos y combinaciones de estos ácidos nucleicos dados a conocer, puede usarse por los especialistas en la materia usando técnicas bien conocidas para identificar el cromosoma humano en el que se cartografían estos ácidos nucleicos. Las técnicas útiles incluyen, pero sin limitación, usar la secuencia o porciones, incluyendo oligonucleótidos, como sonda en diversas técnicas bien conocidas tales como cartografía híbrida por radiación (alta resolución), hibridación *in situ* con dispersiones cromosómicas (resolución moderada) e hibridación de transferencia Southern para hibridar con estirpes celulares que contienen cromosomas humanos individuales (baja resolución). Por ejemplo, los cromosomas pueden cartografiarse mediante hibridación por radiación. Se efectúa la PCR usando el panel 4 del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research Genebridge de 93 híbridos de radiación, usando cebadores que se encuentran en un presunto exón del gen de interés y que amplifican un producto a partir de ADN genómico humano, pero no amplifican ADN genómico de hámster. Los resultados de PCR se convierten en un vector de datos que se remite al sitio Whitehead/MIT Radiation Mapping (www-seq.wi.mit.edu). Se puntúan los datos y se proporciona la adjudicación cromosómica y colocación respecto a marcadores de sitio de secuencia marcada (STS) conocidos en el mapa de híbridos de radiación. Como alternativa, se cartografían las secuencias genómicas correspondientes a los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de LDCAM por comparación con secuencias en bases de datos públicas y privadas tales como la base de datos no redundante GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), Locuslink (ncbi.nlm.nih.gov:80/LocusLink/), Unigene (ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/UniGene), AceView (ncbi.nlm.nih.gov/AceView/), herencia mendeliana en línea en el hombre (OMIM) (ncbi.nlm.nih.gov/Omim), Gene Map Viewer (ncbi.nlm.nih.gov/genemap), y bases de datos privadas tales como Celera Discovery System (celera.com). Estos análisis informáticos de la información de secuencia genómica disponible pueden proporcionar la identificación de la localización cromosómica específica de secuencias genómicas correspondientes a secuencias que codifican polipéptidos de LDCAM y relaciones de cartografía genética únicas entre las secuencias genómicas de LDCAM y las localizaciones en el mapa genético de trastornos humanos conocidos.

10 Diagnóstico y terapia génica. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de LDCAM, y los fragmentos y combinaciones de estos ácidos nucleicos dados a conocer, pueden usarse por un especialista en la materia que usa técnicas bien conocidas para analizar anomalías asociadas a los genes correspondientes a estos polipéptidos. Esto permite distinguir las condiciones en que el marcador se transpone o elimina. Además, pueden usarse ácidos nucleicos dados a conocer en la presente memoria o un fragmento de los mismos como marcador posicional para cartografiar otros genes de localización desconocida. El ADN puede usarse en el desarrollo de tratamientos para cualquier trastorno mediado (directa o indirectamente) por cantidades defectivas o insuficientes de los genes correspondientes a los ácidos nucleicos de la invención. La divulgación en la presente memoria de las secuencias nucleotídicas nativas permite la detección de genes defectivos y el reemplazo de los mismos por genes normales. Los genes defectivos pueden detectarse en ensayos de diagnóstico *in vitro* y por comparación de una secuencia nucleotídica nativa dada a conocer en la presente memoria con la de un gen derivado de una persona sospechosa de albergar un defecto en este gen.

15 Portadores y agentes de suministro. Los polipéptidos de LDCAM (fragmentos, variantes, proteínas de fusión, derivados, oligómeros y similares), antagonistas y agonistas (que incluyen anticuerpos de todos los tipos descritos en la presente memoria), así como peptidocuerpos y similares, pueden encontrar uso también como transportadores para suministrar agentes a células. Los polipéptidos de LDCAM (fragmentos, variantes, proteínas de fusión, derivados, oligómeros y similares), antagonistas y agonistas (que incluyen anticuerpos de todos los tipos descritos en la presente memoria), así como peptidocuerpos y similares pueden usarse para suministrar agentes de diagnóstico o terapéuticos a dichas células en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Los agentes detectables (de diagnóstico) y terapéuticos que pueden enlazarse con un polipéptido incluyen, pero sin limitación, toxinas, otros agentes citotóxicos, fármacos, radionucleidos, cromóforos, enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica y similares, eligiéndose el agente particular según la aplicación pretendida. Entre las toxinas están ricina, abrina, toxina de la difteria, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, polipéptidos inactivadores ribosómicos, micotoxinas tales como tricotecenos y derivados y fragmentos (por ejemplo monocatenarios) de los mismos. Los radionucleidos adecuados para uso de diagnóstico incluyen, pero sin limitación, ^{123}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In y ^{76}Br . Los ejemplos de radionucleidos adecuados para uso terapéutico son ^{131}I , ^{211}At , ^{77}Br , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{109}Pd , ^{64}Cu y ^{67}Cu . Dichos agentes pueden enlazarse con el polipéptido mediante cualquier procedimiento convencional adecuado. El polipéptido comprende grupos funcionales en las cadenas laterales aminoacídicas que pueden hacerse reaccionar con grupos funcionales en un agente deseado, formando enlaces covalentes, por ejemplo. Como alternativa, el polipéptido o agente puede derivatizarse generando o enlazando con un reactivo funcional reactivo deseado disponible para enlazar diversas moléculas con polipéptidos (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Son

conocidas una serie de técnicas para el radiomarcaje de polipéptidos. Los metales radionucleidos pueden enlazarse con polipéptidos usando un agente quelante bifuncional adecuado, por ejemplo. Se preparan por tanto conjugados que comprenden polipéptidos y un agente de diagnóstico o terapéutico adecuado (preferiblemente ligado covalentemente). Los conjugados se administran o emplean de otro modo en una cantidad apropiada para la aplicación particular.

7. Aplicación terapéutica de antagonistas o agonistas de LDCAM

Los antagonistas y agonistas de LDCAM, que se definen anteriormente e incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de LDCAM (así como variantes de los mismos, fragmentos, proteínas de fusión, derivados mimotopos y similares), anticuerpos anti-LDCAM, pepticuerpos anti-LDCAM, polipéptidos de CRTAM (así como variantes de los mismos, fragmentos, proteínas de fusión, derivados, mimotopos y similares), anticuerpos anti-CRTAM y pepticuerpos anti-CRTAM, es probable que sean útiles para tratar afecciones médicas y enfermedades. Por lo tanto, a lo largo de la memoria descriptiva, "antagonistas o agonistas de LDCAM" designa todas las diversas realizaciones descritas en la definición de antagonistas o agonistas de LDCAM.

En general, estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, inflamación, cáncer, enfermedades infecciosas así como otras afecciones como se describen con más detalle a continuación. La molécula o moléculas terapéuticas que se use dependerá de la etiología de la afección que se vaya a tratar y de las rutas biológicas implicadas. Por ejemplo, puede seleccionarse un antagonista o agonista de la interacción LDCAM/CRTAM o LDCAM/LDCAM para el tratamiento de afecciones que impliquen unión celular, señalización intracelular, activación celular, producción de citocinas que influyan en enfermedades autoinmunitarias, inflamación, cáncer, enfermedades infecciosas, etc. Más específicamente, un agonista de LDCAM "enfriaría" los procesos inflamatorios tales como la proliferación de linfocitos T y la liberación de citocinas proinflamatorias tales como, pero sin limitación, interferón gamma e IL-2, como se describe en los ejemplos. Los agonistas de LDCAM pueden usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, hipersensibilidad de contacto, esclerosis múltiple, rechazo de injertos y similares. Un antagonista de LDCAM potenciaría las respuestas inmunitarias al interferir con la unión de LDCAM y CRTAM. Por tanto, un antagonista de LDCAM sería útil en el tratamiento de enfermedades y afecciones que requieran una respuesta inmunitaria potenciada, y en particular de enfermedades caracterizadas por una respuesta de linfocitos T deficiente tal como, pero sin limitación, cáncer, infección (vímica o bacteriana) y en algunos entornos de transplante.

Los anticuerpos de DC BDCA3+ pueden usarse en una variedad de entornos terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, modular la función de DC BDCA3+ para influir en el resultado de respuestas inmunitarias, tales como orientar las DC BDCA3+ con el anticuerpo 1F12 ligado a un antígeno y suministrar así específicamente el antígeno a la población de DC, que puede conferir inmunotolerancia a ese antígeno. Como alternativa, en presencia de señales inflamatorias tales como citocinas proinflamatorias, quimiocinas y similares, el antígeno diana elevaría las respuestas inmunitarias específicas de antígeno frente a ese antígeno. El anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse con fines de pronóstico tales como la cuantificación comparativa o relativa de DC BDCA3+ en tejidos normales y patológicos. El anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse para purificar o aislar DC BDCA3+ DC a partir de diversos fluidos corporales, órganos y tejidos. El anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse para agotar las DC BDCA3+ DC *in vivo* o interferir con su función inmunológica tal como, pero sin limitación, la sensibilización de linfocitos T, migración de DC, presentación cruzada de antígeno frente a linfocitos T CD8+ y similares. Debido a que la presentación cruzada de antígenos y la tolerancia cruzada a antígenos son mecanismos celulares básicos de muchas enfermedades autoinmunitarias, transplante y cáncer, el anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse para tratar estos trastornos al modular las respuestas inmunitarias en consecuencia mediante las DC BDCA3+.

Además, el anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM pueden usarse en terapia celular *ex vivo*. Las DC BDCA3+ pueden aislarse con el anticuerpo 1F12 y otros anticuerpos anti-LDCAM, manipularse *ex vivo* y reintroducirse en el paciente para tratar enfermedades. Solo con fines ejemplares, podría anularse la inmunotolerancia al cáncer exponiendo las DC BDCA3+ aisladas a antígenos del cáncer (tales como, pero sin limitación, aquellos presentados en la Tabla 2 anterior) e infundiendo las DC BDCA3+/antígeno del cáncer procesado de vuelta al paciente. El antígeno del cáncer puede proceder del paciente y puede estar en forma de células cancerosas. Las DC BDCA3+ son capaces de fagocitar células apoptóticas y de presentar este antígeno exógeno a linfocitos T CD8+ para generar efectores CTL específicos del cáncer. Por tanto, las células cancerosas o tumorales retiradas del paciente pueden exponerse a estímulos inductores de apoptosis, tales como irradiación o productos químicos/fármacos y exponerse a las DC BDCA3+ aisladas del paciente. Las DC BDCA3+ fagocitarían las células cancerosas apoptóticas y presentarían antígenos del cáncer en el contexto de MHC de clase I. Estas DC se reinfundirían en el paciente y cebarían una respuesta efectora CTL frente a los antígenos del cáncer del propio paciente. Los efectores CTL lisisarían solo aquellas células que expresasen los antígenos del cáncer del paciente. Esta forma de terapia *ex vivo* puede usarse en combinación con otras terapias convencionales tales como, pero sin limitación, cirugía, radioterapia y/o quimioterapia.

El ejemplo 19 describe el descubrimiento de que la CRTAM es un asociado o copartícipe de unión de LDCAM. La LDCAM se expresa en células dendríticas y especialmente en las células dendríticas BDCA3+ recién descubiertas, que es probable que tengan las propiedades inmunológicas únicas descritas anteriormente. La CRTAM se expresa

en linfocitos T activados (véase la Figura 17, que muestra la expresión aumentada determinada mediante experimentos de expresión diferencial). Tanto los linfocitos T CD4+ como CD8+ expresan CRTAM, y a niveles especialmente altos en linfocitos T CD8+ activados. Por lo tanto, la interacción entre LDCAM y CRTAM puede estar implicada en la formación de una sinapsis inmunológica entre las células presentadoras de antígeno y las células efectoras linfoides (tal como entre células dendríticas, incluyendo DC BDCA3+, y linfocitos T, incluyendo linfocitos T limitados a la clase I tales como linfocitos T CD8+). Sin ligarse a teoría alguna, puede ser que la interacción LDCAM/CRTAM entre células presentadoras de antígeno y linfocitos T sea un regulador negativo de la muerte. Como se muestra en los ejemplos, la interacción LDCAM/CRTAM evitaba la activación de linfocitos T en presencia de una variedad de estímulos de activación de linfocitos T, incluyendo la estimulación con anticuerpo anti-CD3 y diversos mitógenos. Puede ser que la interacción entre LDCAM/CRTAM sea un modo en que la célula presentadora de antígeno active y sensibilice los linfocitos T ante el antígeno sin ser destruida por los linfocitos T. Esto permitiría múltiples activaciones con la célula presentadora de antígeno, lo que es conocido que ocurre en DC.

Además, se ha notificado que la CRTAM se expresa en linfocitos NK y NK-T activados y que estas células se han implicado en la inmunopatología de la diabetes (Kennedy, *et al.*, *J. Leuk. Bio.* 67 (2000)). Estos datos se han confirmado por experimentos de expresión diferencial, que muestran que la CRTAM se expresa en gran medida en linfocitos NK activados (Figura 17). Por lo tanto, la interacción entre LDCAM y CRTAM puede estar implicada en la formación de una sinapsis inmunológica entre células presentadoras de antígeno y linfocitos NK. Por tanto, los antagonistas de LDCAM pueden usarse para inhibir o bloquear la interacción entre las células presentadoras de antígeno (tales como DC) y los linfocitos NK y/o NK-T que causan los síntomas de enfermedad en la diabetes.

Adicionalmente, se ha mostrado que la LDCAM se expresa en tejido neuronal, particularmente en el cerebro (Biederer, *et al.*, *Science* 297, 1525 (2002)). Por lo tanto, la interacción entre LDCAM en neuronas y CRTAM en linfocitos T puede estar implicada en la formación de una sinapsis inmunológica entre el sistema nervioso y el sistema inmunitario. Por tanto, los antagonistas de LDCAM pueden usarse para inhibir o bloquear la interacción entre células inmunitarias que expresan CRTAM (tales como linfocitos T) y neuronas que expresan LDCAM, evitando o tratando así la enfermedad resultante de esa interacción. Los ejemplos incluyen esclerosis múltiple y otras enfermedades del sistema nervioso enumeradas a continuación. Se ha determinado mediante experimentos de expresión diferencial que la CRTAM se expresa en lesiones de esclerosis múltiple (EM) activas (Figura 17). Esto proporciona una base conocida sobre la que predecir que un agonista de LDCAM reduciría la respuesta proinflamatoria de linfocitos T activados y, en particular, evitaría o reduciría la liberación de interferón gamma desde linfocitos T activados. Es bien conocido en la materia que el interferón gamma aumenta en lesiones de EM activas y en los niveles en circulación de pacientes que experimentan recaída, y que los niveles aumentados de interferón gamma están correlacionados con el empeoramiento de síntomas y la destrucción de mielina. Por lo tanto, un agonista de LDCAM evitaría o reduciría la destrucción de tipo autoinmunitaria de la materia blanca al bloquear la liberación de citocinas proinflamatorias desde linfocitos T tales como interferón gamma.

Los antagonistas de LDCAM pueden usarse para tratar sujetos con cáncer tal como, pero sin limitación: leucemia, carcinoma nasofaríngeo positivo de virus de Epstein-Barr, cánceres de colon, estómago, próstata, células renales, cervicouterino y de ovario, cáncer de pulmón, sarcomas y carcinomas de mamíferos tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condriosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma escamoso, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma renal, hepatoma, colangiocarcinoma, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cervicouterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del estatoacústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias tales como 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 verdadera, linfoma (hodgkiniano y no hodgkiniano), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de la cadena pesada. Son también tratables diversos trastornos linfoproliferativos que incluyen síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLAI), leucemia linfoblástica crónica, tricoleucemia, leucemia linfática crónica, linfoma de linfocitos T periféricos, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos T positivo del virus de Epstein-Barr, linfoma histiocítico, enfermedad de Hodgkin, linfoma agresivo difuso, leucemias linfáticas agudas, enfermedad linfoproliferativa T gamma, linfoma cutáneo de linfocitos B, linfoma cutáneo de linfocitos T (concretamente, micosis fungoide) y síndrome de Sézary.

Los antagonistas de LDCAM pueden usarse también en combinación con otros tratamientos reconocidos conocidos en la materia. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, los antagonistas y agonistas de LDCAM pueden usarse en combinación con cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia adoptiva y similares. Es una justificación subyacente que el volumen tumoral es mínimo y/o las células tumorales se segregan a la circulación durante y después de la cirugía, y la inmunoterapia por antagonistas de LDCAM puede ser más eficaz en esta situación.

El efecto de los antagonistas de LDCAM sobre la progresión de enfermedades neoplásicas puede monitorizarse mediante cualquier método conocido por un especialista en la materia incluyendo, pero sin limitación, medir: a) la hipersensibilidad retardada como valoración de la inmunidad celular; b) la actividad de linfocitos T citolíticos *in vitro*; c) los niveles de antígenos específicos de tumor; d) los cambios en la morfología de los tumores usando técnicas tales como tomografía axial computerizada (TAC); e) los cambios en los niveles de presuntos biomarcadores de riesgo para un cáncer particular en individuos de alto riesgo y f) los cambios en la morfología de los tumores. Como alternativa, las respuestas inmunitarias frente al antígeno de interés pueden medirse usando técnicas estándares tales como ensayos de CTL, ensayos de proliferación, ensayos de captura de anticuerpo y similares.

Los antagonistas y agonistas de LDCAM pueden combinarse con inmunoterapia adoptiva usando células presentadoras de antígenos (CPA) sensibilizadas con uno o más de los antígenos descritos anteriormente. La inmunoterapia adoptiva designa un enfoque terapéutico para tratar enfermedades infecciosas o cáncer en que se administran células inmunitarias a un hospedador con el objeto de que las células medien la inmunidad específica, directa o indirectamente, con las células infectadas o células tumorales y/o componentes antigénicos, y den como resultado el tratamiento de la enfermedad infecciosa o la regresión del tumor. Las CPA sensibilizadas con antígeno pueden administrarse antes, concurrentemente o después de la administración de una vacuna. Además, el modo de administración para inmunoterapia adoptiva puede variar incluyendo, pero sin limitación, por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o mucosa.

Los agonistas de LDCAM pueden usarse para tratar enfermedades cardiovasculares.

Los métodos de tratamiento de enfermedades cardiovasculares en un sujeto que tiene una enfermedad cardiovascular comprenden la administración una cantidad eficaz de uno o más agonistas de LDCAM, solos o en cualquier combinación.

Las enfermedades cardiovasculares incluyen estados patológicos que tienen fisiopatología de los sistemas cardiaco y vascular, así como órganos y sistemas comprometidos por estados patológicos de los sistemas cardiaco y vascular. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: inflamación del corazón y/o los vasos tal como miocarditis, miocarditis autoinmunitaria crónica, miocarditis bacteriana y vírica así como endocarditis infecciosa; insuficiencia cardiaca; insuficiencia cardiaca congestiva; insuficiencia cardiaca crónica; caquexia por insuficiencia cardiaca; miocardiopatía, incluyendo no isquémica (miocardiopatía dilatada; miocardiopatía dilatada idiopática; choque cardíaco; insuficiencia cardiaca secundaria por soporte de circulación extracorpórea ("síndrome postbomba"), insuficiencia cardiaca después de lesión por isquemia/reperusión, insuficiencia cardiaca asociada a muerte cerebral (como se describe en Owen *et al.*, 1999 (Circulation, 18 de mayo de 1999; 99(19): 2565-70)); miocardiopatía hipertrófica; miocardiopatía restrictiva; hipertensión sistémica no isquémica; enfermedad valvular; miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho e isquémica (aterogénesis, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial coronaria; infartos, incluyendo apoplejía, ataques isquémicos transitorios e infartos de miocardio). Los estados patológicos adicionales comprendidos por la definición de enfermedad cardiovascular incluyen: aneurismas; arteritis; angina; embolia; trastornos isquémicos asociados a plaquetas; lesión por isquemia/repercusión; reestenosis; regurgitación mitral y/o tricuspídea; estenosis mitral; isquemia miocárdica silente; enfermedad de Raynaud; trombosis; trombosis venosa profunda; embolia pulmonar; microangiopatías trombóticas, incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y síndrome urémico hemolítico (SUH), trombocitemia esencial, coagulación intravascular diseminada (CIV) y trombosis y coagulopatías asociadas a la exposición a una superficie de tejido extraño o dañado; tromboflebitis; vasculitis, incluyendo vasculitis de Kawasaki; arteritis de Takayasu; enfermedad venoclusiva, arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener; púrpura de Schoenlein-Henoch, así como enfermedad cardiovascular que surge por infecciones periodontales por uno o más patógenos orales, tales como bacterias.

Los ejemplos adicionales de los usos terapéuticos de uno o más agonistas de LDCAM incluyen el tratamiento de individuos que padecen enfermedad arterial coronaria o lesión después de trastornos isquémicos asociados a plaquetas, incluyendo isquemia pulmonar, isquemia coronaria e isquemia cerebral, y para la prevención de la reoclusión después de trombosis, trastornos trombóticos incluyendo trombosis arterial coronaria, trombosis arterial cerebral, trombosis intracardiaca, trombosis arterial periférica, trombosis venosa, microangiopatías trombóticas incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y síndrome urémico hemolítico (SUH), trombocitemia esencial, coagulación intravascular diseminada (CID) y trombosis y coagulopatías asociadas a la exposición a una superficie de tejido extraño o dañado, en combinación con angioplastia, endoarteriectomía carotídea, anastomosis de injertos vasculares y dispositivos cardiovasculares permanentes tales como catéteres o derivaciones permanentes.

Indicaciones adicionales incluyen sujetos que experimentan o experimentarán procedimientos de angioplastia (concretamente, angioplastia con globo, angioplastia por láser, aterectomía coronaria y técnicas similares), colocación de dispositivos protésicos endovasculares tales como prótesis endovasculares carotídeas, coronarias, arteriales periféricas u otras, dispositivos de acceso a diálisis o procedimientos para tratar enfermedad vascular periférica; individuos que experimentan cirugía que tienen un alto riesgo de formación de trombos (concretamente, cirugía de derivación coronaria, inserción de una válvula o vaso protésico y similares).

Pueden tratarse también con los agonistas de LDCAM una serie de trastornos pulmonares. Una de dichas afecciones es el síndrome de dificultades respiratorias en el adulto (SDRA), que está asociado a un TNF α elevado y

puede desencadenarse por una variedad de causas, incluyendo la exposición a productos químicos tóxicos, pancreatitis, traumatismo u otras causas. Los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención dados a conocer son también útiles para tratar displasia broncopulmonar (DBP), linfangioleiomiomatosis y enfermedad pulmonar fibrótica crónica de infantes prematuros. Además, los compuestos, composiciones y terapias de combinación de la invención se usan para tratar enfermedades laborales pulmonares, incluyendo asbestosis, antracosis pulmonar sintomática, silicosis o afecciones similares asociadas con la exposición a largo plazo de partículas finas. Los agonistas de LDCAM y terapias de combinación pueden usarse para tratar trastornos pulmonares, incluyendo trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC) asociado con bronquitis crónica o enfisema; enfermedades pulmonares fibróticas tales como fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis pulmonar inducida por radiación; sarcoidosis pulmonar y alergias, incluyendo rinitis alérgica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica y asma.

Se describen también métodos para el uso de agonistas de LDCAM o terapias de combinación para tratar una variedad de trastornos reumáticos. Estos incluyen: artritis reumatoide adulta y juvenil; lupus sistémico eritematoso; gota; artrosis; polimialgia reumática; espondiloartropatías seronegativas, incluyendo espondilitis anquilosante y enfermedad de Reiter. Los agonistas de LDCAM y terapias de combinación en cuestión se usan para tratar artritis psoriásica y artritis de Lyme crónica. Son también tratables con estos antagonistas y agonistas de LDCAM y terapias de combinación la enfermedad de Still y uveítis asociada a artritis reumatoide. Además, los agonistas de LDCAM y terapias de combinación pueden usarse para tratar trastornos que dan como resultado la inflamación de músculos voluntarios, incluyendo dermatomiositis y polimiositis. Además, los agonistas de LDCAM y combinaciones dados a conocer en la presente memoria son útiles para tratar miositis con cuerpos de inclusión esporádica, ya que el TNF α puede desempeñar un papel significativo en la progresión de esta enfermedad muscular. Además, los antagonistas y agonistas de LDCAM y combinaciones dados a conocer en la presente memoria se usan para tratar reticulohistiocitosis multicéntrica, una enfermedad en que la destrucción articular y los nódulos papulares de la cara y manos están asociados con una producción en exceso de citocinas proinflamatorias por células gigantes plurinucleares.

Los trastornos asociados a trasplantes son también tratables con los antagonistas de LDCAM o terapias de combinación dados a conocer, tales como enfermedad del injerto contra el hospedador y complicaciones resultantes del trasplante de órganos sólidos, incluyendo trasplante de corazón, hígado, pulmón, piel, riñón u otros órganos. Los antagonistas de LDCAM pueden administrarse, por ejemplo, para evitar o inhibir el desarrollo de bronquiolitis obliterante después del trasplante de pulmón.

Los diversos otros trastornos médicos tratables con los agonistas de LDCAM y terapias de combinación dados a conocer incluyen: esclerosis múltiple, síndrome de Behcet, síndrome de Sjogren, anemia hemolítica autoinmunitaria, betatalasemia, esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de Parkinson y tenosinovitis de causa desconocida, así como diversos trastornos o enfermedades autoinmunitarios asociados a deficiencias hereditarias.

Los antagonistas de LDCAM pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de infección vírica, incluyendo infección por: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humanos, tales como VIH-1 (también designado como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III y otros aislamientos tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, poliovirus, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus de Cocksackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de paragripe, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo, hantavirus, bungavirus, flebovirus o nairovirus); *Arenaviridae* (virus de fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Bimaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (papilomavirus, polioma virus); *Adenoviridae* (la mayoría de adenovirus); *Herpesviridae* (herpesvirus simplex (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), herpesvirus); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus *Vaccinia*, poxvirus) e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana) y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectivo del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis ni A ni B (clase 1=transmitida internamente, clase 2: transmitida parenteralmente (concretamente, hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados y astrovirus).

Los antagonistas de LDCAM pueden usarse en el tratamiento y/o prevención de infección por bacterias, incluyendo infección por: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria spp.* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (*spp.* aneróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógeno, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira* y *Actinomyces israelii*.

Los antagonistas de LDCAM pueden usarse para tratar o inmunizar sujetos frente a organismos infecciosos unicelulares, incluyendo infección por: esquistosomas, tripanosomas, especies de *Leishmania*, nematodos filariales, tricomoniasis, sarcoesporidiasis; *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Cryptococcus neoformans*, *Apergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *trichinelosis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Toxoplasma gondii* y similares.

Aplicaciones terapéuticas adicionales incluyen: ELA; enfermedad de Alzheimer; asma; aterosclerosis; anemia hemolítica autoinmunitaria; cáncer, particularmente cánceres relacionados con los linfocitos B; caquexia/anorexia; síndrome de fatiga crónica; cirrosis (por ejemplo, cirrosis biliar primaria); diabetes (por ejemplo, diabetes insulino dependiente); fiebre, glomerulonefritis, incluyendo glomerulonefritis de IgA y glomerulonefritis primaria; síndrome de Goodpasture; síndrome de Guillain-Barre, enfermedad del injerto contra el hospedador; tiroiditis de Hashimoto; choque hemorrágico; hiperalgesia; enfermedad inflamatoria intestinal; afecciones inflamatorias de las articulaciones, incluyendo artrosis, artritis psoriásica y artritis reumatoide; afecciones inflamatorias resultantes de distensión, esguince, lesión de cartilago, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otro proceso patológico; diabetes sacarina insulino dependiente, lesión isquémica, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o apoplejía, cada una de las cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedades pulmonares (por ejemplo, SDR); mieloma múltiple; esclerosis múltiple; miastenia grave; leucemia mielogenosa (por ejemplo, AML y CML) y otras; miopatías (por ejemplo, por metabolismo de proteína muscular, esp. en sepsis); neurotoxicidad (por ejemplo, inducida por VIH); osteoporosis; dolor; enfermedad de Parkinson; péñfigo; polimiositis/dermatomiositis; inflamación pulmonar, incluyendo inflamación pulmonar autoinmunitaria; psoriasis; enfermedad de Reiter; lesión por reperfusión; choque séptico, efectos secundarios de radioterapia; síndrome de Sjogren; enfermedad de la articulación temporomandibular; trombocitopenia, incluyendo trombocitopenia idiopática y trombocitopenia neonatal autoinmunitaria; metástasis tumoral; uveítis y vasculitis. Las afecciones del sistema gastrointestinal son también tratables con antagonistas y agonistas de LDCAM y terapias de combinación de la invención, incluyendo la enfermedad celíaca. Los agonistas de LDCAM y terapias de combinación pueden usarse para tratar enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; gastroparesis idiopática; pancreatitis, incluyendo pancreatitis crónica y lesión pulmonar asociada con pancreatitis aguda. Se incluyen también métodos para usar agonistas de LDCAM y terapias de combinación para tratar trastornos del sistema genitourinario tales como glomerulonefritis, incluyendo glomerulonefritis autoinmunitaria, glomerulonefritis debida a exposición a toxinas o glomerulonefritis secundaria a infecciones con estreptococos hemolíticos u otros agentes infecciosos.

8. Formulación y administración de antagonistas y agonistas de LDCAM

Se describen en la presente memoria agentes farmacéuticos o terapéuticos en forma de composiciones y métodos para tratar un paciente, preferiblemente un paciente mamífero, y lo más preferiblemente un paciente humano, que padece un trastorno médico, y en particular un trastorno mediado por LDCAM. Dichos trastornos mediados por LDCAM incluyen afecciones causadas (directa o indirectamente) o exacerbadas por la unión entre LDCAM y un copartícipe de unión tal como, pero sin limitación, LDCAM, CRTAM y B7L-1. Con fines de esta divulgación, los términos “dolencia”, “enfermedad”, “afección médica”, “afección anormal” y similares se usan intercambiamente con el término “trastorno médico”. Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento” usados en la presente memoria incluyen tratamiento curativo, preventivo (por ejemplo profiláctico) y paliativo o mejorativo. Para dichos usos terapéuticos, los antagonistas y agonistas de LDCAM pueden administrarse al paciente necesitado mediante medios bien conocidos. Las composiciones farmacéuticas o terapéuticas pueden contener uno o más antagonistas y agonistas de LDCAM en cualquier forma como se describe en la presente memoria.

Cantidad terapéuticamente eficaz. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico descrito anteriormente a un paciente que tenga una afección que tratar, preferiblemente para tratar o mejorar enfermedades asociadas con la actividad de antagonistas y agonistas de LDCAM. Como se usa en la presente memoria, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad total de cada agente terapéutico u otro componente activo de la composición farmacéutica o método que sea suficiente para mostrar un beneficio apreciable para el paciente, concretamente, tratamiento, curación, prevención o mejora de la afección médica relevante, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas afecciones. Cuando se aplica a un agente terapéutico o ingrediente activo individual administrado solo, el término designa ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término designa las cantidades combinadas de los ingredientes que dan como resultado el efecto terapéutico, tanto administrados en combinación, en serie o simultáneamente. Como se usa en la presente memoria, la frase “administrar una cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente terapéutico significa que el paciente se trata con dicho agente terapéutico en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora, y preferiblemente una mejora prolongada, en al menos un indicador que refleje la gravedad del trastorno. Una mejora se considera “prolongada” si el paciente exhibe la mejora en al menos dos ocasiones separadas por uno o más días, o más preferiblemente por una o más semanas. El grado de mejora se determina basándose en las señales o síntomas, y las determinaciones pueden emplear también cuestionarios que se proporcionan al paciente, tales como cuestionarios de calidad de vida. Pueden valorarse diversos indicadores que reflejen la extensión de la dolencia del paciente para determinar si la cantidad y el tiempo de tratamiento son suficientes. El valor inicial para el indicador o indicadores elegidos se establece mediante el examen del paciente antes de la administración de la primera dosis del agente terapéutico. Preferiblemente, el examen del valor inicial se realiza aproximadamente a los 60 días de administración de la primera dosis. Si el agente

terapéutico se está administrando para tratar síntomas agudos, la primera dosis se administra tan pronto como sea posible en la práctica después de ocurrir la lesión. La mejora se induce administrando agentes terapéuticos tales como antagonistas o agonistas de LDCAM hasta que el paciente manifieste una mejora respecto al valor inicial para el indicador o indicadores elegidos. En el tratamiento de afecciones crónicas, se obtiene este grado de mejora administrando repetidamente este medicamento durante un periodo de al menos un mes o más, por ejemplo, durante uno, dos o tres meses o más, o indefinidamente. A menudo es suficiente un periodo de una a seis semanas, o incluso una sola dosis, para tratar lesiones u otras afecciones agudas. Aunque la extensión de la dolencia del paciente después del tratamiento puede parecer mejorada según uno o más indicadores, el tratamiento puede continuarse indefinidamente al mismo nivel o a una dosis o frecuencia reducida. Una vez se ha reducido o suspendido el tratamiento, puede retomarse después al nivel original si los síntomas reaparecieran.

Dosificación. Un especialista en la materia relevante reconocerá que las dosificaciones adecuadas variarán dependiendo de factores tales como la naturaleza y gravedad del trastorno a tratar, el peso corporal, edad, estado general y dolencias y/o tratamientos previos del paciente, y la vía de administración. Las dosis preliminares pueden determinarse según ensayos animales, y el aumento de escala de las dosificaciones para administración humana se efectúa según prácticas aceptadas en la materia tales como ensayos de dosificación estándares. Por ejemplo, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. La dosificación dependerá de la actividad específica del compuesto y puede determinarse fácilmente mediante experimentación rutinaria. Puede formularse una dosis en modelos animales que alcance un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluya la CI_{50} (concretamente, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular, minimizando las toxicidades. Dicha información puede usarse para determinar más eficazmente las dosis útiles en seres humanos. En última instancia, el médico a cargo decidirá la cantidad de polipéptido con que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico a cargo administrará dosis bajas del polipéptido descrito anteriormente y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores del polipéptido descrito anteriormente hasta obtener el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosificación ya no se aumenta. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para practicar el método de la presente invención deberían contener de aproximadamente 0,01 ng a aproximadamente 100 mg (o de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 1 mg) de polipéptido de la presente invención por kg de peso corporal. Se administran los antagonistas y agonistas de LDCAM una vez por semana para tratar los diversos trastornos médicos dados a conocer en la presente memoria, al menos dos veces por semana o al menos tres veces por semana. Si se inyectan, la cantidad eficaz de antagonistas y agonistas de LDCAM por dosis para adulto oscila de 1-20 mg/m², y preferiblemente es de aproximadamente 5-12 mg/m². Como alternativa, puede administrarse una dosis fija cuya cantidad puede oscilar de 5-100 mg/dosis. Los intervalos de dosis ejemplares para una dosis fija para administrar por inyección subcutánea son 5-25 mg/dosis, 25-50 mg/dosis y 50-100 mg/dosis. Se tratan las diversas indicaciones descritas a continuación administrando una preparación aceptable para inyección que contiene antagonistas y agonistas de LDCAM a 25 mg/dosis, o como alternativa, que contienen 50 mg por dosis. La dosis de 25 mg o 50 mg puede administrarse repetidamente, particularmente para afecciones crónicas. Si se usa una vía de administración distinta de la inyección, la dosis se ajusta apropiadamente según las prácticas médicas estándares. En muchos casos, se obtendrá una mejora del estado del paciente inyectando una dosis de aproximadamente 25 mg de antagonistas y agonistas de LDCAM una a tres veces por semana durante un periodo de al menos tres semanas, o una dosis de 50 mg de antagonistas y agonistas de LDCAM una o dos veces por semana durante al menos tres semanas, aunque puede ser necesario un tratamiento durante periodos más largos para inducir el grado deseado de mejora. Para afecciones crónicas incurables, el régimen puede continuarse indefinidamente, realizándose ajustes en la dosis y frecuencia si se considera necesario por el médico del paciente. Las dosis anteriores son ejemplos para un paciente adulto que sea una persona de 18 años o mayor. Para pacientes pediátrico (de 4-17 años de edad), un régimen adecuado implica la inyección subcutánea de 0,4 mg/kg, hasta una dosis máxima de 25 mg, de antagonistas y agonistas de LDCAM, administrada por inyección subcutánea una o más veces por semana. Si se usa un anticuerpo contra un polipéptido de LDCAM como antagonista de LDCAM, es un intervalo de dosis preferido de 0,1 a 20 mg/kg, y más preferiblemente de 1-10 mg/kg. Es otro intervalo de dosis preferido para un anticuerpo anti-polipéptido de LDCAM de 0,75 a 7,5 mg/kg de peso corporal. Se prefieren anticuerpos humanizados, es decir, anticuerpos en que solo la porción de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo deriva de una fuente no humana. Dichos anticuerpos pueden inyectarse o administrarse por vía intravenosa.

Formulaciones. Se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un antagonista o agonista de LDCAM descrito anteriormente (derivado de cualquier fuente, incluyendo sin limitación fuentes recombinantes y no recombinantes), en combinación con otros componentes tales como un diluyente, portador o excipiente fisiológicamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las formulaciones adecuadas para administración incluyen disoluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Los polipéptidos pueden formularse según métodos conocidos usados para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Pueden combinarse en mezclas, como único material activo o con otros materiales activos conocidos adecuados para una indicación dada, con diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, disolución salina, Tris-HCl, disoluciones tamponadas con acetato y fosfato), conservantes (por

ejemplo, timerosal, alcohol bencílico y parabenos), emulsionantes, solubilizantes, coadyuvantes y/o portadores. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen aquellas descritas en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª ed. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA. Además, dichas composiciones pueden complejarse con polietilenglicol (PEG), iones metálicos o incorporarse a compuestos poliméricos tales como poli(ácido acético), poli(ácido glicólico), hidrogeles, dextrano, etc., o incorporarse a liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Los lípidos adecuados para formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de dichas formulaciones liposómicas está dentro del nivel de habilidad de la materia como se da a conocer, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.235.871; patente de EE.UU. n° 4.501.728; patente de EE.UU. n° 4.837.028 y patente de EE.UU. n° 4.737.323. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de aclaramiento *in vivo*, y se eligen por tanto según la aplicación pretendida, de modo que las características del portador dependerán de la vía de administración seleccionada. Pueden usarse formas de liberación prolongada de LDCAM o polipéptidos de tipo LDCAM. Las formas de liberación prolongada adecuadas para uso en los métodos dados a conocer incluyen, pero sin limitación, LDCAM y/o polipéptidos de tipo LDCAM que se encapsulan en un polímero biocompatible de disolución lenta (tal como las micropartículas de alginato descritas en el documento U.S. n° 6.036.978), mezclados con dicho polímero (incluyendo hidrogeles aplicados tópicamente) y/o revestidos en un implante semipermeable biocompatible.

Pueden usarse antagonistas y agonistas de LDCAM de liberación prolongada. Las formas de liberación prolongada adecuadas para uso en los métodos dados a conocer incluyen, pero sin limitación, antagonistas y agonistas de LDCAM que se encapsulan en un polímero biocompatible de disolución lenta (tal como las micropartículas de alginato descritas en la patente de EE.UU. n° 6.036.978), mezclados con dicho polímero (incluyendo hidrogeles de aplicados tópicamente) y/o revestidos en un implante semipermeable biocompatible.

Un tipo de tecnología de liberación prolongada que puede usarse en la administración de composiciones terapéuticas de antagonistas y agonistas de LDCAM solubles es el que utiliza materiales de hidrogel, por ejemplo, hidrogeles fotopolimerizables (Sawhney *et al.*, Macromolecules 26: 581; 1993). Se han usado hidrogeles similares para prevenir la formación de adhesión postquirúrgica (Hill-West *et al.*, Obstet. Gynecol. 83: 59, 1994) y para prevenir la trombosis y estrechamiento de vasos después de lesión vascular (Hill-West *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5967, 1994). Pueden incorporarse polipéptidos a dichos hidrogeles para proporcionar la liberación prolongada y localizada de agentes activos (West y Hubbel, Reactive Polymers 25: 139, 1995; Hill-West *et al.*, J. Surg. Res. 58: 759; 1995). La liberación prolongada y localizada de antagonistas y agonistas de LDCAM, cuando se incorporan a hidrogeles, se amplificaría por la larga semivida de los antagonistas y agonistas de LDCAM.

Los compuestos descritos anteriormente pueden incluirse en la formulación como multipartículas finas en forma de gránulos o aglomerados de aproximadamente 1 mm de tamaño de partícula. La formulación del material para administración de cápsulas podría ser también en forma de polvo, bloques ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. La forma terapéutica podría prepararse mediante compresión.

Pueden incluirse todos los colorantes y agentes aromatizantes. Por ejemplo, la proteína (o derivado) puede formularse (tal como mediante encapsulación en liposoma o microesfera) y ponerse entonces en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes aromatizantes.

Puede disminuirse o aumentarse el volumen del compuesto de la invención con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. Ciertas sales inorgánicas pueden usarse también como cargas, incluyendo trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Son algunos diluyentes comercialmente disponibles Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Pueden incluirse disgregantes en la formulación del producto terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen, pero sin limitación, almidón, incluyendo el disgregante comercial basado en almidón Explotab. Pueden usarse todos de almidón glicolato de sodio, Amberlite, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Son otra forma de disgregantes las resinas de intercambio catiónico insolubles. Pueden usarse gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes y éstas pueden incluir gomas en polvo tales como de agar, karaya o tragacanto. El ácido alginico y su sal de sodio son también útiles como disgregantes.

Los aglutinantes pueden usarse para mantener el agente terapéutico unido formando un comprimido duro e incluyen materiales de productos naturales tales como goma arábica, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Podrían usarse ambos de polivinilpirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en disoluciones alcohólicas para granular el producto terapéutico.

Puede incluirse un agente antifricción en la formulación del producto terapéutico para prevenir la adhesión durante el proceso de formulación. Pueden usarse lubricantes como capa entre el producto terapéutico y la pared del troquel, y estos pueden incluir, pero sin limitación: ácido esteárico, incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites y ceras vegetales. Pueden usarse también lubricantes solubles

tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

5 Podrían añadirse deslizantes que podrían mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y ayudar a la redistribución durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

10 Para ayudar a la disolución del compuesto descrito anteriormente en el entorno acuoso, podría añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctilsodio y sulfonato de dioctilsodio. Podrían usarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación como tensioactivos son laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de la proteína o derivado solos o en mezcla a diferentes relaciones.

15 Los aditivos pueden incluirse también en la formulación para potenciar la captación del compuesto. Los aditivos que tienen potencialmente esta propiedad son, por ejemplo, los ácidos grasos ácido oleico, ácido linoleico y ácido linoléico.

20 Pueden ser deseables formulación de liberación controlada. El compuesto podría incorporarse a una matriz inerte que permita la liberación por mecanismos de difusión o lixiviación, por ejemplo, gomas. Pueden incorporarse también matrices de degeneración lenta a la formulación, por ejemplo alginatos y polisacáridos. Es otra forma de liberación controlada de los compuestos de esta invención mediante un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), concretamente, el fármaco se incluye en una membrana semipermeable que deja entrar el agua y empuja al fármaco fuera a través de una sola abertura pequeña debido a efectos osmóticos. Algunos recubrimientos entéricos tienen también un efecto de liberación retardada.

25 Pueden usarse otros recubrimientos para la formulación. Estos incluyen una variedad de azúcares que podrían aplicarse en una cubeta de recubrimiento. El agente terapéutico podría administrarse también en un comprimido recubierto con película y los materiales usados en este caso se dividen en dos grupos. El primero son materiales no entéricos e incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, povidona y polietilenglicoles. El segundo grupo consiste en materiales entéricos que son habitualmente ésteres de ácido ftálico.

30 Puede usarse una mezcla de materiales para proporcionar el recubrimiento de película óptimo. El recubrimiento de película puede llevarse a cabo en un recubridor de cubeta o en un lecho fluidificado o mediante recubrimiento por compresión.

35 Se contempla también en la presente memoria el suministro pulmonar de la presente proteína (o derivados de la misma). La proteína (o derivado) se suministra a los pulmones de un mamífero mientras inhala y atraviesa el recubrimiento epitelial pulmonar hasta la corriente sanguínea. (Otros informes de esto incluyen Adjei *et al.*, Pharma. Res. (1990) 7: 565-9; Adjei *et al.* (1990), Internat. J. Pharmaceutics 63: 135-44 (acetato de leuprolida); Braquet *et al.* (1989), J. Cardiovasc. Pharmacol. 13 (supl.5): s.143-146 (endotelina); Hubbard *et al.* (1989), Annals Int. Med. 3: 206-12 (antitripsina α 1); Smith *et al.* (1989), J. Clin. Invest. 84: 1145-6 (proteínasa α 1); Oswein *et al.* (marzo de 1990), "Aerosolization of Proteins", Proc. Symp. Resp. Drug Delivery II, Keystone, Colorado (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs *et al.* (1988), J. Immunol. 140: 3482-8 (interferón γ y factor de necrosis tumoral α) y Platz *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos).

45 Se da a conocer en la presente memoria un amplio intervalo de dispositivos mecánicos diseñados para el suministro pulmonar de productos terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, nebulizadores, inhaladores de dosis medida e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los especialistas en la materia. Son algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

50 Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para dispensar el compuesto de la invención. Típicamente, cada formulación es específica del tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propelente apropiado, además de diluyentes, coadyuvantes y/o portadores útiles en terapia.

El compuesto debería prepararse lo más ventajosamente en forma particulada con un tamaño medio de partícula de menos de 10 μ m (o micrómetros), lo más preferiblemente de 0,5 a 5 μ m, para un suministro más eficaz al pulmón distal.

55 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen carbohidratos tales como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros ingredientes para uso en formulaciones pueden incluir DPPC, DOPE, DSPC y DOPC. Pueden usarse tensioactivos naturales o sintéticos. Puede usarse PEG (incluso aparte de su uso en la derivatización

de proteína o análogo). Pueden usarse dextranos, tales como ciclodextrano. Pueden usarse sales biliares y otros potenciadores relacionados. Pueden usarse celulosa y derivados de celulosa. Pueden usarse aminoácidos, tales como el uso en una formulación de tampón.

5 También se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de portadores.

10 Las formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, a chorro o ultrasónico, comprenderán típicamente el compuesto de la invención disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de proteína biológicamente activa por ml de disolución. La formulación puede incluir también un tampón y un azúcar sencillo (por ejemplo, para estabilización de la proteína y regulación de la presión osmótica). La formulación de nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o evitar la agregación inducida en superficie de la proteína causada por la atomización de la disolución al formar el aerosol.

15 Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el compuesto suspendido en un propelente con la ayuda de un tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado con este fin, tal como un clorofluorocarburo, hidrocloreofluorocarburo, hidrofluorocarburo o hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico puede ser también útil como tensioactivo.

20 Las formulaciones para dispensar a partir de un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el compuesto de la invención y puede incluir también un agente de carga tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa o xilitol, en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo de 50 a 90% en peso de la formulación.

25 Combinaciones de compuestos terapéuticos. Un antagonista y agonista de LDCAM descrito anteriormente puede ser activo en multímeros (por ejemplo, heterodímeros u homodímeros) o complejos consigo mismo o con otros polipéptidos. Como resultado, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un polipéptido en dicha forma multimérica o complejada. La composición farmacéutica puede estar en forma de un complejo del polipéptido o polipéptidos descritos anteriormente junto con antígenos polipeptídicos o peptídicos. Se describe la administración de antagonistas o agonistas de LDCAM concurrentemente con uno o más fármacos distintos que se administran al mismo paciente en combinación con los antagonistas y agonistas de LDCAM, administrándose cada fármaco según un régimen adecuado para ese medicamento. "Administración concurrente" comprende el tratamiento simultáneo o secuencial con los componentes de la combinación, así como regímenes en que los fármacos se alternan, o en los que se administra un componente a largo plazo y el otro u otros se administran intermitentemente. Los componentes pueden administrarse en la misma composición o separadas, y por la misma o diferente vía de administración. Son ejemplos de componentes que pueden administrarse concurrentemente con las composiciones farmacéuticas de la invención: citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, trombopoyetina, factor de células madre y eritropoyetina, o inhibidores o antagonistas de cualquiera de estos factores. La composición farmacéutica puede contener adicionalmente otros agentes que potencien la actividad del polipéptido o complementen su actividad o uso en el tratamiento. Dichos factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica, produciendo un efecto sinérgico con el polipéptido de la invención, o minimizando los efectos secundarios. A la inversa, los antagonistas y agonistas de LDCAM de la presente invención pueden incluirse en formulaciones de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombolítico o agente antiinflamatorio particular para minimizar los efectos secundarios de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombolítico o agente antiinflamatorio. Los ejemplos adicionales de fármacos para administrar concurrentemente incluyen, pero sin limitación, antiviricos, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, antagonistas de citocinas inflamatorias, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, pentoxifilina, talidomida y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) tales como azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, sulfato de hidroxicloroquina, metotrexato, leflunomida, minociclina, penicilamina, sulfasalazina y compuestos de oro tales como oro oral, tiomalato de oro y sodio y aurotioglucosa. Adicionalmente, los antagonistas y agonistas de LDCAM pueden combinarse con un segundo antagonista y agonista de LDCAM, incluyendo un anticuerpo o pepticuerpo contra un polipéptido de LDCAM y/o CRTAM, o un péptido derivado de polipéptido de LDCAM o CRTAM que actúe como inhibidor competitivo de un polipéptido de LDCAM y/o CRTAM nativo.

55 La duración del tratamiento variará, pero típicamente se administrarán dosis repetidas durante al menos un periodo de dos semanas o más, o pueden administrarse indefinidamente. Pueden administrarse varias rondas de tratamiento, alternando con periodos sin tratamiento. Si se suspende, puede retomarse si apareciera una recaída del cáncer.

60 El tratamiento de cáncer con antagonistas y agonistas de LDCAM puede administrarse concurrentemente con otros tratamientos, y puede administrarse concurrentemente con tratamiento de quimioterapia o radioterapia. En un ejemplo, los antagonistas y agonistas de LDCAM se administran concurrentemente con un agente que es eficaz contra una variedad de tipos tumorales, tales como ligando Apo2/TRAIL o un agente antiangiogénico tal como un

anticuerpo anti-VEGF o un anticuerpo anti-receptor de EGF. El tratamiento con antagonistas y agonistas de LDCAM puede combinarse también con otros tratamientos que se orientan a clases específicas de cáncer tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales orientados a antígenos específicos de tumor, o con otros tratamientos usados para clases particulares de cáncer. Por ejemplo, el cáncer de mama puede tratarse con antagonistas y agonistas de LDCAM administrados concurrentemente con quimioterapia, tratamiento hormonal, tamoxifeno, raloxifeno o agentes que orientan a HER2, tales como un anticuerpo anti-HER2 tal como HERCEPTIN® (Genentech, Inc.) o cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo, se trata leucemia linfocítica crónica o linfoma no hodgkiniano con una combinación de antagonistas y agonistas de LDCAM y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 RITUXIN® (Genentech, Inc.). Se da a conocer la administración concurrente de antagonistas y agonistas de LDCAM con diversos receptores de citocina solubles o citocinas u otros fármacos usados para la quimioterapia del cáncer. “Administración concurrente” comprende el tratamiento simultáneo o secuencial con los componentes de la combinación, así como regímenes en que los fármacos se alternan, o en los que se administra un componente a largo plazo y el otro u otros se administran intermitentemente. Dichos otros fármacos incluyen, por ejemplo, bisfosfonatos usados para restaurar la pérdida ósea en paciente de cáncer, o el uso de más de un antagonista de RANK administrado concurrentemente. Los ejemplos de otros fármacos para administrar concurrentemente incluyen, pero sin limitación, antivíricos, antibióticos, analgésicos, corticosteroides, antagonistas de citocinas inflamatorias, FARME, diversos regímenes quimioterapéuticos sistémicos y fármacos antiinflamatorios no esteroideos tales como, por ejemplo, inhibidores de COX I o COX II.

Vías de administración. Puede usarse cualquier vía de administración eficaz para administrar terapéuticamente antagonistas y agonistas de LDCAM, incluyendo aquellas composiciones que comprenden ácidos nucleicos. La administración parenteral incluye la inyección, por ejemplo, por vías intraarticular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal o subcutánea, por inyección en bolo o por infusión continua, e incluye también la administración localizada, por ejemplo, en el sitio de enfermedad o lesión. Otros medios de administración adecuados incluyen liberación prolongada desde implantes; inhalación y/o insuflación de aerosol; gotas oculares; supositorios vaginales o rectales; preparaciones bucales; preparaciones orales, incluyendo píldoras, jarabes, pastillas masticables, helados o gomas de mascar y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizadores, pomadas u otras técnicas adecuadas. Como alternativa, los antagonistas y agonistas de LDCAM polipeptídicos pueden administrarse implantando células cultivadas que expresan el polipéptido, por ejemplo, implantando células que expresan antagonistas y agonistas de LDCAM. Las células pueden cultivarse también *ex vivo* en presencia de polipéptidos descritos anteriormente para modular la proliferación celular o para producir un efecto deseado sobre la actividad de dichas células. Las células tratadas pueden introducirse entonces *in vivo* con fines terapéuticos. El polipéptido puede administrarse también mediante el método de transducción de proteína. En este método, los antagonistas y agonistas de LDCAM se ligan covalentemente con un dominio de transducción de proteína (DTP) tal como, pero sin limitación, TAT, Antp o VP22 (Schwarze *et al.*, 2000, *Cell Biology* 10: 290-295). Los péptidos ligados con DTP pueden transducirse entonces en células añadiendo los péptidos a medios de cultivo de tejido que contienen las células (Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285: 1569; Lindgren *et al.*, 2000, *TIPS* 21: 99; Derossi *et al.*, 1998, *Cell Biology* 8: 84; documentos WO 00/34308, WO 99/29721 y WO 99/10376). Pueden inducirse a las propias células del paciente a producir polipéptidos o antagonistas de LDCAM mediante transfección *in vivo* o *ex vivo* con un ADN que codifica antagonistas y agonistas de LDCAM. Este ADN puede introducirse en las células del paciente, por ejemplo, mediante inyección de ADN desnudo o ADN encapsulado en liposoma que codifica antagonistas y agonistas de LDCAM, o mediante otro medio de transfección. Los ácidos nucleicos pueden administrarse también a pacientes mediante otros métodos conocidos para la introducción de ácido nucleico en una célula u organismo (incluyendo, sin limitación, en forma de vectores víricos o ADN desnudo). Cuando se administran antagonistas y agonistas de LDCAM en combinación con uno o más de otros compuestos biológicamente activos, estos pueden administrarse por la misma o diferente vía, y pueden administrarse simultánea, separada o secuencialmente.

Administración oral. Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos descritos anteriormente por vía oral, el polipéptido estará en forma de comprimido, cápsula, polvo, disolución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un portador sólido tal como gelatina o un coadyuvante. El comprimido, cápsula y polvo contienen de aproximadamente 5 a 95% de polipéptido de la presente invención, y preferiblemente de aproximadamente 25 a 90% de polipéptido. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un portador líquido tal como agua, vaselina, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja o aceite de sésamo o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener adicionalmente disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución sacarídica, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene de aproximadamente 0,5 a 90% en peso de polipéptido, y preferiblemente de aproximadamente 1 a 50% de polipéptido.

Administración intravenosa. Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido descrito en la presente memoria por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el polipéptido estará en forma de una disolución acuosa exenta de pirógenos parenteralmente aceptable. La preparación de dichas disoluciones de polipéptido parenteralmente aceptables, teniendo la debida consideración al pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro de las habilidades de la materia. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debería contener, además de polipéptido, un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro de sodio,

inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de lactato de Ringer u otro vehículo conocido en la materia. La composición farmacéutica puede contener también estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los especialistas en la materia. La duración de la terapia intravenosa que usa la composición farmacéutica variará dependiendo de la gravedad de la enfermedad que se esté tratando y del estado y respuesta idiosincrásica potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación del polipéptido estará en el intervalo de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. En última instancia, el médico a cargo decidirá sobre la duración apropiada de la terapia intravenosa que usa la composición farmacéutica.

Administración a hueso y tejido. Para composiciones que son útiles para trastornos de hueso, cartílago, tendón o ligamento, el método terapéutico incluye administrar la composición por vía tópica, sistémica o local en forma de un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica es, por supuesto, una forma exenta de pirógenos fisiológicamente aceptable. Adicionalmente, la composición puede estar deseablemente encapsulada o inyectada en forma viscosa para suministro al sitio de daño de hueso, cartílago o tejido. La administración tópica puede ser adecuada para la curación de heridas y la reparación de tejido. Pueden administrarse como alternativa o adicionalmente agentes terapéuticamente útiles distintos de un polipéptido, que puede incluirse opcionalmente también en la composición como se describe anteriormente, de forma simultánea o secuencial con la composición.

Preferiblemente, para la formación de hueso y/o cartílago, la composición incluiría una matriz capaz de suministrar la composición que contiene polipéptido al sitio de daño de hueso y/o cartílago, proporcionando una estructura para el desarrollo de hueso y cartílago y capaz de resorción óptima en el cuerpo. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas. La elección del material de matriz está basada en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades interfaciales. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatito, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Las matrices adicionales comprenden polipéptidos puros o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos de material anteriormente mencionados, tales como poli(ácido láctico) e hidroxiapatito o colágeno y fosfato de tricalcio. Puede alterarse la composición de las biocerámicas, tales como en aluminato-fosfato de calcio, y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad. Se prefiere actualmente un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico 50:50 (en peso molar) en forma de partículas porosas que tienen diámetros en el intervalo de 150 a 800 μm . En algunas aplicaciones, será útil utilizar un agente secuestrante tal como carboximetilcelulosa o coágulo sanguíneo autólogo, para evitar que las composiciones polipeptídicas se disocien de la matriz. Son una familia preferida de agentes secuestrantes los materiales celulósicos tales como alquilcelulosas (incluyendo hidroxialquilcelulosas), incluyendo metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa, siendo el más preferido las sales catiónicas de carboximetilcelulosa (CMC). Otros agentes secuestrantes preferidos incluyen ácido hialurónico, alginato de sodio, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), polímero de carboxivinilo y poli(alcohol vinílico). La cantidad de agente secuestrante útil en la presente memoria es de 0,5-20% en peso, preferiblemente de 1-10% en peso, basada en el peso de la formulación total, que representa la cantidad necesaria para evitar la desorción del polipéptido de la matriz polimérica y para proporcionar un manejo apropiado de la composición, aunque no tanto que evite que las células progenitoras se infiltren en la matriz, proporcionando así al polipéptido la oportunidad de ayudar a la actividad osteogénica de las células progenitoras. En composiciones adicionales, los polipéptidos pueden combinarse con otros agentes beneficiosos para el tratamiento de los defectos de hueso y/o cartílago, las heridas o el tejido en cuestión. Estos agentes incluyen diversos factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes (TGF- α y TGF- β) y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF). Las composiciones terapéuticas son también actualmente valiosas para aplicaciones veterinarias. Particularmente los animales domésticos y caballos purasangre, además de los seres humanos, son pacientes deseados para dicho tratamiento con los polipéptidos de la presente invención. El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene polipéptido para usar en la regeneración de tejido se determinará por el médico a cargo considerando diversos factores que modifican la acción de los polipéptidos, por ejemplo, la cantidad de peso de tejido que se desea formar, el sitio del daño, el estado del tejido dañado, el tamaño de la herida, el tipo de tejido dañado (por ejemplo, hueso), la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de la infección, el momento de administración y otros factores clínicos. La dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y con la inclusión de otros polipéptidos en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como IGF I (factor de crecimiento de tipo insulina I) a la composición final puede afectar también a la dosificación. Puede monitorizarse la progresión mediante la valoración periódica del crecimiento y/o reparación de tejido/hueso, por ejemplo, mediante rayos X, determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.

Usos veterinarios. Además de en pacientes humanos, los antagonistas y agonistas de LDCAM son útiles en el tratamiento de afecciones patológicas en animales no humanos, tales como mascotas (perros, gatos, aves, primates, etc.), animales domésticos de granja (caballos, vacas, ovejas, cerdos, aves, etc.) o cualquier animal que

5 padezca una afección mediada por antagonistas y agonistas de LDCAM. En dichos casos, puede determinarse la dosis apropiada según el peso corporal del animal. Por ejemplo, puede usarse una dosis de 0,2-1 mg/kg. Como alternativa, la dosis se determina según el área superficial del animal, oscilando la dosis ejemplar de 0,1-20 mg/m², o más preferiblemente, de 5-12 mg/m². Para animales pequeños, tales como perros o gatos, es una dosis adecuada 0,4 mg/kg. Los antagonistas y agonistas de LDCAM (preferiblemente construidos a partir de genes derivados de la misma especie que el paciente) se administran por inyección u otra vía adecuada una o más veces por semana hasta que mejora el estado del animal, o pueden administrarse indefinidamente.

10 Fabricación de medicamentos. Se da a conocer también en la presente memoria el uso de antagonistas y agonistas de LDCAM, como se definen diversamente en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento terapéutico de cada trastorno médico dado a conocer en la presente memoria.

15 La presente invención no ha de limitarse al alcance de las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, que se pretenden como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y los métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Es más, resultarán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria, para los especialistas en la materia a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Dichas modificaciones se pretende que entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Habiéndose descrito la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no de limitación.

Números de identidad de secuencia y moléculas asociadas

SEQ ID NO.	Molécula
1	Secuencia de ADN de LDCAM humana
2	Secuencia aminoacídica de LDCAM humana
3	Secuencia de ADN de LDCAM de múrido
4	Secuencia aminoacídica de LDCAM de múrido
5	Cebador oligo de PCR para el constructo LDCAM-Fc
6	Cebador oligo de PCR para el constructo LDCAM-Fc
7	Secuencia de ADN del dominio extracelular largo de B7L-1 humana
8	Secuencia aminoacídica del dominio extracelular largo de B7L-1 humana
9	Secuencia de ADN del dominio extracelular corto de B7L-1 humana
10	Secuencia aminoacídica del dominio extracelular corto de B7L-1 humana
11	Secuencia aminoacídica de CRTAM humana
12	Secuencia aminoacídica de la cadena pesada variable del anticuerpo 1F12 (Figura 6)
13	Secuencia aminoacídica de la cadena ligera variable del anticuerpo 1F12 (Figura 6)

Ejemplos

20 Ejemplo 1

Preparación de la proteína de fusión B7L-1/Fc

25 A continuación se describe la generación de una proteína B7L-1/Fc humana que se usó para identificar células a las que se une B7L-1. La proteína de fusión incluye la región extracelular soluble de B7L-1 humana y la región Fc humana de muteína, y se preparó aislando en primer lugar ADNc que codifica la región extracelular de B7L-1 humana usando cebadores que flanquean la región extracelular de B7L-1 (véase la patente de EE.UU. nº 5.011.912).

30 Para aislar los nucleótidos que codifican el dominio extracelular de B7L-1 (nucleótidos 108-1249 de SEQ ID NO:1 de la solicitud en tramitación junto con la presente S/N 60/095.663, presentada el 7 de agosto de 1998), se usaron oligonucleótidos que flanquean la región extracelular de B7L-1 como cebadores en una reacción de PCR, obteniéndose un producto de PCR a partir del clon nº 44904, que era el molde de la reacción. Se digirió el producto de PCR resultante con las enzimas de restricción Sal1 y BglII en los sitios Sal1 y BglII incorporados por los cebadores. Se ligó el fragmento resultante en un vector de expresión (pDC409) que contenía la región Fc de IgG 1 humana mutada para reducir la unión a receptor de Fc.

35 Se transfectó el constructo de ADN resultante en estirpes celulares de riñón de mono CV-1/EBNA (con cotransfección de psv3neo). Después de 7 días de cultivo en medio que contiene 0,5% de suero bovino pobre en

inmunoglobulina, se añadió una disolución de 0,2% de azida al sobrenadante y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm. Se pasó entonces aproximadamente 1 l de sobrenadante de cultivo a través de un sistema de purificación de proteína BioCad Protein A HPLC que usa una columna de proteína A de 4,6 x 100 mm (POROS 20A de PerSeptive Biosystems) a 10 ml/min. La columna de proteína A se une a la porción Fc de la proteína de fusión en el sobrenadante, inmovilizando la proteína de fusión y permitiendo que los demás componentes del sobrenadante pasen a través de la columna. Se lavó la columna con 30 ml de disolución de PBS y se eluyó la proteína de fusión unida de la columna de HPLC con ácido cítrico ajustado a pH 3,0. Se neutralizó la proteína de fusión purificada eluida a medida que eluía usando una disolución de HEPES 1 M a pH 7,4.

Ejemplo 2

10 Estudios de unión de B7L-1

Se usó la proteína de fusión B7L-1/Fc preparada como se describe en el ejemplo 1 para cribar en estirpes celulares la unión de B7L-1 usando estudios de unión cuantitativa según metodologías de citometría de flujo estándares. Para cada estirpe celular cribada, el procedimiento implicaba incubar células bloqueadas con 2% de FCS (suero fetal bovino), 5% de suero de cabra normal y 5% de suero de conejo en PBS durante 1 hora. Se incubaron entonces las células bloqueadas con la proteína de fusión B7L-1/Fc 5 µg/ml en 2% de FCS, 5% de suero de cabra y 5% de suero de conejo en PBS. Después de la incubación, se lavó la muestra dos veces con tampón FACS (2% de FCS en PBS) y se trató entonces con anticuerpo de Fc/biotina de ratón anti-humano (adquirido en Jackson Research) y SAPE (estreptavidina-ficoeritrina adquirido en Molecular Probes). Este tratamiento causa que el anticuerpo de Fc/biotina anti-humano se una a cualquier B7L-1/Fc unida y que la SAPE se una al anticuerpo de Fc/biotina anti-humano, dando como resultado un marcador identificador fluorescente en B7L-1/Fc que está unida a células. Se analizó en las células cualquier proteína unida usando citometría de flujo con detección fluorescente. Los resultados indicaron que la B7L-1 humana se une bien a la estirpe epitelial pulmonar humana (WI-28), estirpes linfoblastoides B humanas (Daudi y PAE8LBM1), linfocitos B tonsilares recientes humanos, células dendríticas CD8⁺ de múrido de bazo/nódulos linfáticos de animales tratados con flt3-L y S49.1 de linfoma de linfocitos T de múrido.

25 Ejemplo 3

Cribado en la colección de expresión de WI-26 de contrarreceptores de B7L-1

A continuación se describe un cribado de una colección de colección de expresión con la proteína de fusión B7L-1/Fc preparada como se describe en el ejemplo 1. Se preparó la colección de expresión a partir de la estirpe celular humana WI-26 usando los métodos descritos en Current Protocols In Molecular Biology, vol. 1, (1987). Usando métodos de unión indirecta estándares, se ensayaron monocapas de células CV1/EBNA transfectadas mediante autorradiografía de frotis para la expresión de un contrarreceptor de B7L-1 usando la proteína de fusión B7L-1/Fc radioyodada. Se identificaron frotis positivos que muestran células que expresan un contrarreceptor y se identificó un conjunto que contiene aproximadamente 2.000 clones individuales como potencialmente positivo de unión a proteína de fusión B7L-1/Fc.

Se valoró el conjunto, se sembró y se tomaron muestras entonces por raspado, proporcionando ADN de plásmido combinado para transfección en células CV1/EBNA. Después de cribar los conjuntos menores, un conjunto contenía clones que eran positivos de contrarreceptor de B7L-1, como se indica por la presencia de un producto génico expresado capaz de unirse a B7L-1/Fc. Se valoró el conjunto positivo y se sembró, obteniendo colonias individuales. Se aisló el ADN de cada clon candidato potencial, se retransfectó y se recrió. Los clones positivos resultantes contenían un inserto de ADNc de 1535 nucleótidos. La región de codificación de ADNc del contrarreceptor de B7L-1 (LDCAM) corresponde a la dada a conocer en la SEQ ID NO:1. La secuencia aminoacídica codificada por la SEQ ID NO:1 se da a conocer en la SEQ ID NO: 2.

Ejemplo 4

Expresión de LDCAM humana

A continuación se describe la expresión de LDCAM humana unida a membrana completa en células CV1/EBNA. Se preparó un constructo vectorial para la expresión de LDCAM humana ligando la región codificante de SEQ ID NO:1 con un vector de expresión pDC409. Se transfectó entonces el vector de expresión en células CV1/EBNA y se expresó la LDCAM usando técnicas descritas en McMahan *et al.*, EMBO J. 10: 2821,1991.

Después de someter a choque e incubar las células durante varios días, se recogieron células que tenían LDCAM unida a membrana, se fijaron con paraformaldehído al 1%, se lavaron y se usaron en su forma intacta.

Para expresar una forma soluble de LDCAM que incluye la región extracelular de LDCAM codificada por los nucleótidos 8 a 1130 de SEQ ID NO: 1, se prepara un constructo vectorial ligando la región codificante extracelular de SEQ ID NO:1 con un vector de expresión pDC409. El vector se transfecta en células CV1/EBNA.

Después de un periodo de incubación de 3 días en medio reciente, se recupera LDCAM soluble recogiendo sobrenadantes celulares de CV1/EBNA que contienen la forma soluble y aislando la LDCAM usando técnicas de HPLC o técnicas de cromatografía por afinidad.

Ejemplo 5

5 Estudios de unión de LDCAM

Para identificar las estirpes celulares a las que se une la LDCAM, se preparó la proteína de fusión LDCAM/Fc, descrita en el ejemplo 9 siguiente, y se usó en ensayos de unión celular y FACS. Usando metodologías de unión celular y FACS estándares, se encontró que la LDCAM se une a las estirpes celulares linfoblastoides B DAUDI y PAE8LBM1, células transfectadas con B7L-1 humana, células transfectadas con LDCAM, células S49.1 y DC linfoides de bazo y nódulos linfáticos de ratones tratados con Flt3-L.

Ejemplo 6

Identificación de tejido que expresa LDCAM

Usando metodologías de PCR-FI estándares, análisis Northern y coincidencia de secuencias de bases de datos de EST (Genbank), se examinó en una serie de estirpes celulares la expresión de ARNm de LDCAM humana y LDCAM de ratón. Los resultados demostraron que la LDCAM tiene una distribución de tejido extendida. Se encontró expresión de LDCAM humana en mama, retina, hígado fetal, bazo, corazón fetal, pulmón, músculo, placenta, tiroides y carcinoma pulmonar. Se encontró ARNm de LDCAM de ratón en embrión entero, testículos y células negativas triples.

Ejemplo 7

20 Aislamiento de LDCAM de múrido

Puesto que se ha demostrado que la B7L-1 humana soluble se une a S49.1 de linfoma de múrido (ejemplo 2), se cribaron en una colección de expresión de S49.1 clones de ADNc de LDCAM de múrido. El proceso implicaba metodologías de PCR-TI que usan ARN de la estirpe celular de S49.1 y cebadores descritos en las SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. Estos cebadores están basados en una EST de múrido descubierta en una base de datos y que tiene homología con LDCAM humana. Se amplificaron los ADNc mediante PCR usando los cebadores, confirmando que la LDCAM de múrido está presente en células S49.1.

Se clonó el producto amplificado en un vector de clonación y se detectaron clones que contenían un inserto de ADNc de LDCAM mediante hibridación con un oligonucleótido complementario de la región codificante de LDCAM humana. Para detectar ADNc con extensiones 5' en comparación con LDCAM humana, se usaron un cebador oligonucleotídico complementario del extremo 5' de la región codificante y un cebador complementario de las secuencias vectoriales adyacentes al inserto de ADNc para efectuar una PCR anclada, de modo que se amplifica la región 5' de los clones de ADNc. Se examinaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel y se compararon sus longitudes con un producto de amplificación derivado de forma similar a partir de ADNc de LDCAM. Se secuenciaron los insertos de ADNc de los clones que daban el producto de 5'-PCR más largo, dando un ADNc de LDCAM de múrido que codifica todos menos los 4 primeros aminoácidos, en comparación con la LDCAM humana. Se da la secuencia nucleotídica de LDCAM de múrido en la SEQ ID NO:3. Se proporciona la secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:3 en la SEQ ID NO:4.

Ejemplo 8

Expresión de polipéptido de LDCAM de múrido

Para preparar un constructo vectorial para expresar B7L-1 extracelular de múrido, se ligó la región codificante de SEQ ID NO:3 con un vector de expresión pDC409. Se transfectó entonces el vector de expresión en células CV1/EBNA y se expresó la LDCAM usando técnicas descritas en McMahan *et al.*, EMBO J. 10: 2821,1991.

Después de someter a choque e incubar las células durante varios días, se recogieron sobrenadantes celulares que contenían LDCAM de múrido soluble y se recuperó al proteína usando técnicas de HPLC.

45 Ejemplo 9

Preparación de proteínas de fusión de LDCAM

A continuación se describe la generación de una proteína LDCAM/Fc humana que se usó para identificar células a las que se une LDCAM. La proteína de fusión incluye la región extracelular soluble de LDCAM humana y la región Fc humana de mutéina, y se preparó aislando en primer lugar el ADNc que codifica la región extracelular de LDCAM humana usando cebadores que flanquean la región extracelular de LDCAM (véase la patente de EE.UU. nº 5.011.912).

Para aislar los nucleótidos que codifican el dominio extracelular de LDCAM, nucleótidos 16-1137 de SEQ ID NO:1, se usaron los oligonucleótidos que flanquean la región extracelular de LDCAM como cebadores en una reacción PCR para obtener un producto de PCR a partir del clon WI-26. Se muestran los cebadores en las SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6. Se digirió el producto de PCR resultante con las enzimas de restricción Sal1 y BglIII en los sitios Sal1 y BglIII incorporados por los cebadores. Se ligó el fragmento resultante con un vector de expresión (pDC409) que contiene la región Fc de IgG1 humana mutada para reducir la unión al receptor de Fc.

Se transfectó el constructo de ADN resultante en las estirpes celulares de riñón de mono CV-1/EBNA. Después de 7 días de cultivo en medio que contenía suero bovino al 0,5% pobre en inmunoglobulina, se añadió una disolución de azida al 0,2% al sobrenadante y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm. Se pasó entonces aproximadamente 1 l de sobrenadante de cultivo a través de un sistema de purificación de proteína BioCad Protein A HPLC usando una columna de proteína A de 4,6 x 100 mm (POROS 20A de PerSeptive Biosystems) a 10 ml/min. La columna de proteína A se une a la porción Fc de la proteína de fusión en el sobrenadante, inmovilizando la proteína de fusión y permitiendo pasar a través de la columna a los demás componentes del sobrenadante. Se lavó la columna con 30 ml de disolución de PBS y se eluyó la proteína de fusión unida de la columna de HPLC con ácido cítrico ajustado a pH 3,0. Se neutralizó la proteína de fusión purificada eluida a medida que eluía, usando una disolución HEPES 1 M a pH 7,4.

Ejemplo 10

Anticuerpos monoclonales de LDCAM

Este ejemplo ilustra un método para la preparación de anticuerpos monoclonales de LDCAM. Puede usarse LDCAM purificada, un fragmento de la misma tal como el dominio extracelular, péptidos sintéticos o células que expresen LDCAM para generar anticuerpos monoclonales contra LDCAM usando técnicas convencionales, por ejemplo, aquellas técnicas descritas en la patente de EE.UU. n° 4.411.993. Brevemente, se inmunizan ratones con LDCAM como inmunógeno emulsionado en coadyuvante completo de Freund, y se inyectan en cantidades en el intervalo de 10-100 µg por vía subcutánea o intraperitoneal. De 10 a 12 días después, se refuerzan los animales inmunizados con LDCAM adicional emulsionada en coadyuvante incompleto de Freund. Se refuerzan periódicamente los ratones después de ello con un programa de inmunización de semanal a bisemanal. Se toman periódicamente muestras de suero por sangrado retroorbital o corte de la cola para ensayar los anticuerpos de LDCAM mediante un ensayo de transferencia puntual o ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzima).

Después de la detección de una valoración de anticuerpo apropiada, se proporciona a los animales positivos una última inyección intravenosa de LDCAM en disolución salina. De 3 a 4 días después, se sacrifican los animales, se recogen las células de bazo y se fusionan las células de bazo con una estirpe celular de mieloma de múrido, por ejemplo, NS1 o preferiblemente P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Las fusiones generan células de hibridoma, que se siembran en múltiples placas de microvaloración en medio selectivo de HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Se criba en las células de hibridoma por ELISA la reactividad frente a B7L-1 purificada mediante adaptaciones de las técnicas dadas a conocer en Engvall *et al.*, *Immunochem.* 8: 871, 1971 y en la patente de EE.UU. n° 4.703.004. Es una técnica de cribado preferida la técnica de captura de anticuerpo descrita en Beckmann *et al.*, (*J. Immunol.* 144: 4212, 1990). Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse por vía intraperitoneal en ratones BALB/c singénicos, produciendo ascitis que contienen altas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-LDCAM. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vitro* en matraces o botellas giratorias mediante diversas técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en ascitis de ratón pueden purificarse mediante precipitación con sulfato de amonio, seguida de cromatografía de exclusión en gel. Como alternativa, puede usarse también la cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpo a proteína A o proteína G, así como la cromatografía de afinidad basada en la unión a B7L-1.

Ejemplo 11

Detección de la expresión de LDCAM mediante análisis de transferencia Northern

A continuación se describen experimentos de transferencia Northern llevados a cabo para identificar tipos de tejido y célula que expresen polipéptidos de LDCAM de la presente invención.

Se generaron transferencias Northern fraccionando de 5 µg a 10 µg de ARN total en gel de agarosa-formaldehído al 1,2% y transfiriendo el ARN a membranas de nailon Hybond (Amersham, Arlington Heights, IL). Se usaron procedimientos de generación de transferencia Northern estándares como se describen en Maniatis, ("Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989). Se adquirieron en Clontech múltiples transferencias de tejido poliA+ que contenían 1 µg de ARNm a partir de una serie de diferentes fuentes.

Se generó una ribosonda, que contenía la región codificante de LDCAM, usando el kit de combinación de ribosonda de Promega y ARN polimerasa T7 según las instrucciones del fabricante. Los resultados del sondeo de las transferencias Northern y de la visualización de la película de rayos X resultante para las sondas de unión positiva muestran que se detectaba un ARNm hibridante de 5,0 kb para LDCAM de múrido en pulmón, hígado, cerebro,

testículos y células dendríticas esplénicas. Los ARNm hibridantes adicionales de diferentes tamaños incluían un ARNm de aproximadamente 1,9 kb en pulmón y testículos, un ARNm de aproximadamente 3,0 kb en macrófagos de médula ósea estimulados con LPS, pulmón y testículos, un ARNm hibridante de aproximadamente 7,0 kb en linfocitos T esplénicos estimulados con anticuerpo anti-receptor de linfocitos T, macrófagos de médula ósea estimulados con LPS y testículos y se detectó un ARNm hibridante de aproximadamente 9,0 kb en timo y linfocitos T esplénicos estimulados con anticuerpo anti-receptor de linfocitos T.

Ejemplo 12

Estudios de unión celular del sistema inmunitario

A continuación se describen experimentos de unión celular por FACS que demuestran que la LDCAM se une a ciertas células del sistema inmunitario activadas. Con fines de estudio y comparación, se incluyen también las características de unión de B7L-1. Las células estudiadas incluían linfocitos T de múrido, linfocitos T humanos, linfocitos B de múrido, linfocitos NK de múrido, células endoteliales humanas y estirpes celulares tumorales humanas.

Para estudiar la unión de linfocitos T de múrido, se cultivaron células de nódulo linfático (NL) de múrido BALB/c en medio de cultivo solo y en presencia de diferentes estímulos durante 18-20 horas. Se recogieron las células cultivadas y se prepararon para estudios de unión usando proteína de fusión B7L1/Fc, proteína de fusión LDCAM/Fc y una proteína Fc de control. Después de un cultivo de una noche, las células de NL de múrido BALB/c eran típicamente >90% CD3+. Se detectó la proteína unida usando análisis citométrico de flujo. Los resultados mostrados en la Tabla I indican la unión observada expresada como unidades de intensidad de fluorescencia media (IFM) sobre linfocitos T no estimulados (medio) y linfocitos T estimulados (por estímulos).

Tabla I

Fc	medio	Con A	mAb de TCR	PHA
Fc de control	12,7	10,4	14,5	14,2
B7L1Fc	11,7	14,3	24,0	12,6
LDCAM Fc	18,7	51,7	230,0	91,4

Cuando se analizan por subconjuntos de linfocitos T, un 75-80 % de los linfocitos T de NL de múrido CD4+ exhibían unión de LDCAM detectable después de la estimulación con anticuerpos anti-TCR *in vitro*. Aproximadamente un 50% de los linfocitos T de NL de múrido CD8+ exhiben unión detectable. Además, los linfocitos T CD4+ exhiben mayores niveles de unión de LDCAM que los linfocitos T de múrido CD8+. Los resultados demuestran que la LDCAM/Fc se une a bajos niveles a linfocitos T inmaduros. Sin embargo, después de una activación de una noche con estímulos policlonales, la unión aumentaba 5-20 veces dependiendo de los estímulos. De los estímulos estudiados, el PMA induce la menor unión de LDCAM con linfocitos T de múrido y los anticuerpos anti-TCR inducen la mayor unión.

Para estudiar la unión de linfocitos T humanos a LDCAM y su contrapartida estructural B7L1, se cultivaron linfocitos T de sangre periférica (SP) humana en medio de cultivo solo o en presencia de diferentes estímulos durante 18-20 horas. Se recogieron las células cultivadas y se prepararon para estudios de unión usando la proteína de fusión B7L1/Fc, la proteína de fusión LDCAM/Fc o una proteína Fc de control. Se determinó la proteína unida a linfocitos T de SP humana mediante análisis citométrico de flujo. La Tabla II detalla los resultados observados, expresados como IFM, sobre linfocitos T no estimulados (medio) y sobre linfocitos T estimulados (por estímulos).

Tabla II

Fc	medio	Con A	PMA	PHA
Fc de control	4,7	4,8	3,5	4,3
B7L1Fc	6,3	7,5	4,5	5,7
LDCAM Fc	22,3	42,8	61,9	38,8

Los resultados muestran que el PMA induce una mayor unión de LDCAM en linfocitos T humanos que en linfocitos T de múrido. La presencia de unión específica de LDCAM con linfocitos T tanto de múrido como humanos en ausencia de unión de B7L1 sugiere que la LDCAM se une a B7L1, o una molécula diferente, y no a sí misma. Debido a que los estudios indican que los linfocitos T expresan poca o nada de B7L1, la LDCAM puede tener otro copartícipe de unión.

Se efectuaron estudios similares a los descritos anteriormente para evaluar la unión de LDCAM y B7L1 a linfocitos B esplénicos de múrido. No se detectó unión de B7L1 ni LDCAM en linfocitos B de múrido no estimulados. El cultivo de linfocitos B esplénicos de múrido con muCD40L o LPS indujo bajos niveles de unión de LDCAM, pero no se detectó un nivel apreciable de unión de B7L1.

- 5 Para estudiar la unión a linfocitos NK de múrido, se extirparon bazo de ratones CB-17/SCID tratados con IL-15 y se usaron como fuente de linfocitos NK de múrido altamente enriquecidos y activados. Las células de bazo aisladas a partir de ratones SCID tratadas con IL-15 son un 60-80% positivas de DX-5. DX-5 es un panmarcador de NK que se expresa en linfocitos NK de muchas cepas diferente de ratones. Se efectuó el análisis citométrico de flujo como se describe anteriormente para detectar la unión de B7L1 y LDCAM a linfocitos NK de múrido activados con IL-15 DX-5+ *in vivo*. La Tabla III da los resultados de un estudio de unión de linfocitos NK de múrido.

Tabla III

Molécula de Fc	% de linfocito NK DX-5+ / IFM
Fc de control	8% / 88
B7L1Fc	19% / 265
LDCAM Fc	38% / 432

En contraposición con lo que se observó en linfocitos T de múrido y humanos, puede detectarse unión de LDCAM y B7L1 en linfocitos NK de múrido activados *in vivo*.

- 15 Los resultados de los experimentos dirigidos a estudiar la unión de B7L1 y LDCAM a células endoteliales humanas no demostraron unión en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de diferentes donantes. Sin embargo, una HUVEC de una B7L1 de donante indujo bajos niveles de CD62E y CD 106 en comparación con la Fc de control.

- 20 La Tabla IV detalla los resultados de los experimentos dirigidos a evaluar la unión de B7L1 y LDCAM a estirpes celulares tumorales humanas. Los resultados se expresan como porcentaje de células que se unen a LDCAM o B7L1.

Tabla IV

Estirpe celular	Tipo celular	LDCAM-Fc (%)**	B7L1-Fc (%)**
U937	leucemia monocítica	10	7
K562	leucemia eritoblástica	7	5
Jurkat	leucemia de linfocitos T aguda	10	7
MP-1	LLC de linfocitos B	46	10
DAUDI-hi	linfoma de Burkitt de linfocitos B	8	6
RPMI 8866	linfoma de linfocitos B	0	0
n° 88EBV	LLC de linfocitos B	4	3
n° 33EBV	LLC de linfocitos B	0	0
G EBV de amígdala	LLC de linfocitos B	25	13
MDA231	adenocarcinoma de mama	8	9
OVCAR-3	carcinoma ovárico	48	30
H2126M1	adenocarcinoma pulmonar	0	0

**la unión de Fc de control se ha restado, de modo que este es el % neto de unión de células frente al fondo

- 25 Los resultados muestran una unión de LDCAM significativa en la estirpe celular de carcinoma ovárico y en dos de las estirpes tumorales de linfocitos B (MP-1 y G de amígdala). La B7L1 se une también a estas tres estirpes celulares tumorales, pero a niveles mucho menores. Estos resultados demuestran que la LDCAM es un marcador de ciertos tipos de linfomas de linfocitos B o diferentes tipos de carcinomas. Además, la señalización biológica mediada por LDCAM o B7L1 podría mediar los efectos antitumorales funcionales sobre estos tipos de tumores.

Ejemplo 13**Efectos de LDCAM sobre la proliferación de linfocitos T**

La siguiente discusión describe experimentos efectuados para evaluar los efectos de la LDCAM sobre la proliferación de linfocitos T de murino y humanos inducida por estímulos policlonales.

- 5 Se evaluaron la proteína de fusión LDCAM/Fc y la proteína de fusión B7L1/Fc en un modelo estándar de proliferación de linfocitos T de murino *in vitro*. Se obtuvieron células de nódulo linfático (NL) de ratones BALB/c normales y se pusieron en cultivo en medios. Se pusieron en los medios de cultivo cantidades variables de Fc de control, B7L1/Fc y LDCAM/Fc solas o en presencia de diferentes estímulos policlonales de linfocitos T, incluyendo ConA, PHA o mAb de TCR inmovilizado.
- 10 Los resultados de estos experimentos demostraron que la LDCAM inhibe en gran medida la proliferación de linfocitos T de murino inducida por ConA (50% de inhibición a ~0,625 µg/ml), inhibe moderadamente la proliferación inducida por PHA (50% de inhibición a ~5 µg/ml) y no afecta a la proliferación inducida por mAb de TCR inmovilizado. En ensayos de proliferación de linfocitos T de sangre periférica humana, la LDCAM inhibe la proliferación inducida por ConA, pero no inhibe eficazmente la proliferación inducida por PHA u OKT3. La B7L1/Fc no afecta a las respuestas proliferativas de los linfocitos T de murino o humanos.

- 15 Los resultados sugieren que los efectos inhibidores de la LDCAM/Fc sobre la proliferación de linfocitos T de murino y humanos inducida por mitógeno son debidos a la inhibición de la secreción de citocina (especialmente IL-2) o a la regulación de las respuestas posteriores de los linfocitos T después de la activación, y a aumentos de la expresión del copartícipe de unión de LDCAM. La LDCAM puede modular también interacciones célula-célula entre linfocitos T, linfocitos T y CPA o linfocitos T y linfocitos NK. La incapacidad de la LDCAM de inhibir la proliferación inducida por mAb de TCR sugiere que aparece desregulación de citocina porque la proliferación inducida por ConA y PHA es muy dependiente de citocina, mientras que la inducida por mAb anti-TCR lo es menos.

Ejemplo 14**Efectos de la LDCAM sobre la producción de citocina por linfocitos T**

- 25 A continuación se describen experimentos efectuados para evaluar los efectos de la LDCAM sobre la secreción de citocinas de células de NL o linfocitos T purificados de murino después de la activación *in vivo* de linfocitos T con PHA, ConA y mAb de TCR. Se muestran los resultados en la Tabla V. Se expresan los niveles de citocina detectados en pg/ml.

Tabla V

condición de cultivo	molécula de Fc	IL-2 (pg/ml)	IFN-gamma (pg/ml)
medio	ninguna	<2	<10
	Fc de control	<2	<10
	LDCAM/Fc	<2	<10
ConA	ninguna	366	100
	Fc de control	614	244
	LDCAM/Fc	<2	<10
PHA	ninguna	36	358
	Fc de control	39	354
	LDCAM/Fc	10	<10
mAb de TCR inmov.	ninguna	1703	1114
	Fc de control	1722	1215
	LDCAM/Fc	1642	1027

- 30 Los resultados muestran que la LDCAM/Fc inhibe significativamente la producción de IL-2 e IFN-gamma de linfocitos T de NL de murino que es inducida tanto por ConA como PHA. Cuando se usa mAb anti-TCR inmovilizado para inducir la producción de citocina de linfocitos T de murino, se observaron efectos menos pronunciados de la LDCAM sobre la producción de citocina. La LDCAM redujo la producción de IFN-gamma después de la activación de TCR. En contraposición, la producción de IL-2 no se redujo después de la activación de TCR. Se generó muy poca IL-4

por los linfocitos T en estos experimentos, de modo que no se evaluó si la LDCAM afecta a la producción de IL-4 u otras citocinas/quimiocinas adicionales por linfocitos T.

Ejemplo 15

Efectos de LDCAM sobre ensayos de activación de células mixtas de múrido

5 Se desarrolló un ensayo de células mixtas *in vitro* para examinar la capacidad de los linfocitos T de activar linfocitos B mediante su interacción CD40L/CD40. El ensayo implica el cultivo de células de bazo y células de NL con mAb anti-TCR *in vitro* durante 36 horas, seguido del análisis citométrico de flujo de la activación celular de linfocitos T y B/CPA que ocurre después de que los linfocitos T se activen e interaccionen con linfocitos B/CPA.

10 Se cultivaron las células de bazo con mAb anti-TCR, ConA, PHA o en medio solo con Fc de control o LDCAM/Fc durante 36 horas. La activación de linfocitos B CD19+ y linfocitos T CD3+ fue seguida por el examen de la expresión en la superficie celular de CD25, CD69, CD54, CD45Rb, CD44, CD28, CD23, CD86 y CD152 usando tinción de dos colores y análisis citométrico de flujo.

15 Los resultados demostraron que, después de la activación con PHA o ConA, aumenta varias veces la expresión de CD69, CD54 y CD25 en linfocitos T y linfocitos B en el cultivo. En comparación con una Fc de control que tiene poco efecto sobre estos aumentos, la LDCAM redujo significativamente la expresión (casi a los mismos niveles que los linfocitos T no activados) de CD69, CD54 y CD25 que se inducen en ambos tipos celulares en este sistema de cultivo mediante activación con ConA. La ConA activa los linfocitos T que expresan moléculas de activación (por ejemplo CD40L) sobre su superficie. Las moléculas de activación se unen a receptores sobre la superficie de linfocitos B y activan los linfocitos B para expresar diversas proteínas relacionadas con la activación sobre su superficie celular. La inhibición de linfocitos T y B activados con PHA ocurrió en una medida más moderada que la observada después de la activación con ConA.

20 Además, la LDCAM redujo los niveles de CD45RB expresada tanto en CD3+ como CD3- en células de bazo cultivadas con ConA. Este efecto sobre la reducción de los niveles de CD45RB era más pronunciado cuando se cultivaba la LDCAM con células de bazo estimuladas con mAb de TCR, y no se observaba cuando se usaba PHA como estímulo o cuando las células se cultivaban en medio solo.

25 Usar mAb de TCR para estimular las células de bazo cultivadas en presencia de una Fc de control o LDCAM/Fc mostró que los niveles de CD69, CD25 y CD25 inducidos en linfocitos T y linfocitos B por este estímulo no estaban afectados por la LDCAM. Sin embargo, la LDCAM aumentaba la expresión de CD28 tanto en linfocitos T CD3+ como en linfocitos distintos de T. En un experimento, el aumento fue de 5-10 veces y en los demás experimentos el aumento fue de un 50%. Esto se observó también en un experimento cuando se usó ConA como estímulo además de mAb de TCR. La LDCAM causó reducciones moderadas de la intensidad de expresión de CD45RB en linfocitos B (50% de reducción) y linfocitos T (20-30% de reducción) después de la activación con mAb de TCR.

30 De forma interesante, la LDCAM no afecta a la expresión de CD45RB en células de bazo cuando se cultivan en ausencia de estímulos policlonales de linfocitos T. Se ha notificado que la expresión de CD45RB en roedores se reduce a medida que los linfocitos T progresan desde inmaduros a células de memoria. También, subpoblaciones diferentes de linfocitos T CD4+ expresan niveles altos o bajos de CD45RB y median distintas funciones inmunitarias *in vivo*.

35 Los resultados anteriormente discutidos sugieren que, en ciertas condiciones de estimulación inmunitaria, particularmente estimulaciones por ConA y PHA, la LDCAM inhibe la activación de linfocitos T a nivel celular en ensayos de células mixtas e inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por estos mitógenos al menos parcialmente, al reducir la producción de IL-2 e IFN-gamma.

40 Aunque la LDCAM regula negativamente de forma moderada la producción de IFN-gamma inducida por la activación de mAb de TCR, tiene poco efecto sobre la producción de IL-2 en este sistema y no afecta a la proliferación de linfocitos T de múrido inducida por mAb de TCR inmovilizado. La LDCAM causa un aumento de la expresión de CD28 y una reducción de la expresión de CD45RB por linfocitos T y linfocitos B activados por mAb de TCR. Basándose en estos datos, la LDCAM o su copartícipe de unión en linfocitos T puede regular (aumentar, reducir o redirigir) las respuestas inmunitarias *in vivo* dependientes de efector de linfocitos T incluyendo, pero sin limitación, respuestas inmunitarias antitumorales, respuestas de DTH y respuestas inmunitarias anti-enfermedades infecciosas dependientes de linfocitos T.

45 Los resultados anteriores sugieren que la LDCAM es útil en la modulación de las rutas de activación de linfocitos T y puede usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias e inflamación.

Ejemplo 16**La LDCAM-Fc se une a linfocitos NK de múrido y causa la multiplicación de linfocitos NK**

A continuación se describen experimentos que demuestran que la LDCAM se une a la superficie de linfocitos NK esplénicos constitutivamente y que la activación de estas células con IL-15 aumentaba los niveles de unión de LDCAM. Los experimentos describen también la administración de LDCAM:Fc a ratones CB-17 SCID y los efectos de la administración sobre la multiplicación y activación de linfocitos NK en el bazo.

Se dividieron 12 ratones CB-17/SCID hembra de edades coincidentes en 4 grupos, a 3 animales por grupo. El día 0, día 1 y día 2, se administraron al grupo I, grupo II, grupo III y grupo IV las siguientes proteínas IP: los ratones del grupo I recibieron 10 µg de IgG humana, los ratones del grupo II recibieron 10 µg de IL-15 humana, los ratones del grupo III recibieron 10 µg de LDCAM:Fc humana (nº de lote 7488-16 de Immunex) y el grupo IV recibió 10 µg de cada una de LDCAM:Fc humana e IL-15 humana.

El día 3 (el 4º día del experimento) se sacrificaron los ratones y se extirparon sus bazos. Se enumeró separadamente cada bazo y se combinaron entonces conjuntamente para análisis citométrico de flujo. Se determinó el número de linfocitos NK en el bazo de cada grupo tratado mediante citometría de flujo usando el anticuerpo DX-5 como panmarcador de linfocitos NK de múrido. Además, se evaluaron otras medidas de la activación de linfocitos NK, incluyendo la expresión de CD69 y CD54.

Se muestran los resultados del experimento en la Tabla VI. La administración de LDCAM:Fc sola (grupo III) aumentó el número de células de bazo recuperadas totales aproximadamente 5 veces frente al grupo de control de IgG humana (grupo I). La administración de IL-15 humana sola (grupo II) aumentó el número de células de bazo recuperadas totales aproximadamente 9 veces frente al grupo de control (grupo I). El tratamiento de combinación con IL-15 y LDCAM aumentó el número de células de bazo aditivamente.

El número de linfocitos NK recuperados de los bazos se correlaciona con la recuperación celular total en el bazo. Más particularmente, la LDCAM indujo un aumento de aproximadamente 5 veces de los linfocitos NK recuperados, la IL-15 causó un aumento de aproximadamente 9 veces de los linfocitos NK recuperados y la combinación de LDCAM e IL-15 indujo un aumento de aproximadamente 13 veces en el número de linfocitos NK recuperados de los bazos de ratones tratados. La LDCAM aumentó también el número de linfocitos NK en el bazo que expresaban CD69 y CD54. Este aumento fue debido a la multiplicación de linfocitos NK globales en lugar de a aumentos específicos en la expresión de CD69 o CD54 en linfocitos NK *in vivo* después de la administración de LDCAM:Fc.

TABLA VI

Grupo de ratones SCID	Recuento de células de bazo X 10 ⁶	Número de ratones	% de linfocitos DX-5 ⁺ (NK)	Nº de linfocitos NK recuperados X 10 ⁶
Grupo I (control de IgG humana)	2,3	3	67,8	1,6
Grupo II (control positivo de IL15)	17,8	3	81,7	14,5
Grupo III (LDCAM:Fc)	10,25	3	51,2	5,3
LDCAM:Fc e IL15	24,8	3	72,6	18,0

Ejemplo 17**Identificación de la población de células dendríticas únicas derivadas del ligando Flt3**

Se ha identificado una rara población de células (un 0,2% de las PBMC) en la sangre de seres humanos tratados con ligando Flt3 que pueden sensibilizar linfocitos T inmaduros CD4⁺ y CD8⁺ alorreactivos, que es una de las características funcionales de las células dendríticas (DC). Se realizaron ensayos clínicos de fase I en voluntarios humanos sanos que recibieron una inyección subcutánea diaria de ligando Flt3 (FL) 10 mg/kg/día durante 10 días. Se mostró que la inyección de ligando Flt3 aumentaba en gran medida en número de pDC CD123⁺, DC CD1c⁺, así como monocitos, en circulación. En el transcurso de este estudio clínico, se identificó una rara población de células CD162⁺⁺ que expresan el antígeno de células dendríticas sanguíneas 3 (BDCA3). Las DC BDCA3⁺ representan un 0,06% de las PBMC totales en donantes normales. La frecuencia de las DC BDCA3⁺ aumenta de 4 a 8 veces después de la inyección de ligando Flt3. La naturaleza del antígeno reconocido por el anticuerpo anti-BDCA3 era desconocida, pero parecía estar regulado positivamente por la estimulación por IL-3, reforzando por tanto la noción de que las DC CD15^sCD162⁺⁺ podrían representar una forma más "madura" de DC de sangre periférica.

Como se muestra en la Figura 1, estas células exponen algunas características mieloides y se identificaron porque no expresan sialil-lewis-X (CD15s) y expresan altos niveles de CD162 (PSGL1). Sialil-lewis-X es un azúcar complejo

expresado en la amplia mayoría de DC sanguíneas. La presencia de sialil-lewis-X (CD15s) en proteínas de superficie desempeña un papel en la transmigación de DC a través del endotelio vascular. La falta de expresión de CD15s en DC sugiere que estas células podrían no ser capaces de dejar la corriente sanguínea mediante transmigación. La caracterización fenotípica adicional de estas células reveló un fenotipo relacionado con el mielóide (CD11c⁺, CD13⁺⁺, CD33^{dim}). De forma interesante, al contrario que otras células mieloides, las DC sanguíneas CD15s⁻CD162⁺⁺ no expresan receptores de Fc ni CD11b. La expresión del receptor de Fc está regulada negativamente tras la maduración y marca la transición desde una etapa de captura de antígeno (inmaduro) a una etapa de presentación de antígeno (maduro). Por tanto, las DC CD15s⁻CD162⁺⁺DC podrían ser más maduras que otros subconjuntos de DC sanguíneas.

Para caracterizar adicionalmente la población de DC en un esfuerzo por identificar las moléculas de superficie celular únicas de la población de DC, se emplearon la selección de células enteras por exposición en fago y el análisis del perfil génico global. El análisis de matriz génica global reveló que las DC BDCA3⁺ es probable que sean las contrapartidas humanas de las DC CD8a⁺ de ratón. Como se muestra en la Figura 2, se expresan preferiblemente una serie de diferentes genes tanto en DC CD8a⁺ de ratón como DC BDCA3⁺ humanas. De estos genes, solo las DC BDCA3⁺ y las DC CD8a⁺ de ratón expresan LDCAM (también designada como Igsf4). Estos resultados muestran que las células BDCA3⁺ están mejor definidas como DC que expresan Igsf4. Estas células presentadoras de antígeno (CPA) es probable que sean la contrapartida humana de las DC CD8a⁺ de murido, una población especializada de DC implicadas en presentación cruzada de antígeno/tolerancia cruzada. La presentación cruzada/tolerancia cruzada es un mecanismo celular que desempeña un papel determinante en muchas enfermedades autoinmunitarias, procesos inflamatorios, así como trasplantes. La orientación a DC BDCA3⁺ (usando diversas formas de anticuerpos, peptidocuerpos y proteínas solubles tales como LDCAM y/o CRTAM) puede ser importante en muchas áreas terapéuticas (como se describe anteriormente).

Para determinar la aloactividad de la población de DC, se purificaron células CD162⁺⁺ y CD14⁺ de la sangre de voluntarios humanos sanos tratados con ligando Flt3 y se cultivaron durante 4 días en presencia de 10⁵ linfocitos T alogénicos. Se añadió timidina tritiada durante las 16 últimas horas de cultivo. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes (Figura 3). Estos resultados muestran que las DC positivas de LDCAM son potentes aloestimulantes.

Ejemplo 18

Anticuerpo específico de LDCAM (1F12)

Estos estudios muestran que se aislaron moléculas de unión a scfv específicas de LDCAM usando un enfoque de selección de célula entera por exposición en fago, que los fagos que expresan scfv anti-LDCAM se convirtieron exitosamente en una proteína de fusión scfv-Fv (designada en la presente memoria intercambiablemente como un "maxicuerpo") sin alteración importante de su especificidad de unión y que las proteínas de fusión scfv-Fv anti-LDCAM se usaron exitosamente en ensayos de inmunoprecipitación, inmunohistoquímica y funcionales. Se orientaron células dendríticas sanguíneas BDCA3⁺ humanas en el contexto de PBMC enteras usando una colección de fagos de scfv. Algunos de los fagos recuperados en este enfoque de selección se unían específicamente a DC BDCA3⁺. Brevemente, las PBMC de voluntarios humanos sanos tratados con ligando Flt3 se marcaron con fago y anticuerpo anti-fago conjugado con fluorocromo. Se incubaron los fagos filamentosos de scfv con PBMC de voluntarios sanos tratados con ligando Flt3. Se eliminaron las moléculas sin unión mediante lavados extensivos. Se marcaron las PBMC con anticuerpo anti-BDCA3 y se purificaron mediante citometría de flujo. Se eluyó el fago de la superficie de DC BDCA3⁺ mediante choque ácido. Se amplificaron las moléculas de unión a DC BDCA3⁺ en *E-coli*. Se usó el fago de unión a DC BDCA3⁺ de primera ronda en una segunda ronda de selección.

Se mostró que el 1F12 se une específicamente a DC BDCA3⁺. Se añadieron entonces anticuerpos contra CD1c, CD123, CD 14 y BDCA3. Los resultados de la Figura 4 muestran que el fago 1F12 (fila inferior) marca específicamente DC BDCA3⁺. La fila superior muestra el marcaje de fondo sin fago filamentosos. El 1F12 es uno del 4% de fagos derivados del enfoque de selección de célula entera por exposición en fago que son reactivos cruzados entre especies, concretamente entre ratón y ser humano. Se ha mostrado que el scfv de 1F12 se une a DC BDCA3⁺ mediante citometría de flujo, histología e inmunoprecipitación. En ratones, se ha mostrado que el scfv de 1F12 se une específicamente a un subconjunto discreto de DC esplénicas (DC CD8a⁺) que se cree que desempeñan un papel crítico en la activación de linfocitos T citotóxicos, como se describe en el ejemplo 17.

Se convirtió un fago de scfv específico (1F12) en una proteína de fusión scfv-Fc al fusionar el scfv con el dominio Fc de IgG1 humana usando técnicas bien conocidas en la materia. La conversión del scfv en la proteína de fusión scfv-Fc no afectó adversamente a la especificidad de la región de unión a scfv. (Como se muestra en la Figura 5, obsérvese que la proteína de fusión scfv-Fc de 1F12 se biotiniló para análisis por FACS). La secuencia de la región variable de cadena pesada se proporciona en la SEQ ID NO: 12 y la región variable de la cadena ligera de 1F12 se proporciona en la SEQ ID NO: 13.

Se ha mostrado que el 1F12 se une específicamente a LDCAM (también conocida en la materia como Igsf4, TSLC1, SynCAM y de tipo nectina 2). Se introdujo la scfv-Fc en un vector de expresión de mamífero y se produjo en células COS. Se mostró que la scfv-Fc de 1F12 inmunoprecipita una glucoproteína de 100 kDa a partir de DC de ratón

derivada de médula ósea (véase la Figura 7). Se confirmó que la proteína de 100 kDa era LDCAM por espectrometría de masas.

- Se usó la proteína de fusión LDCAM-Fc descrita en el ejemplo 9 en un ensayo de unión de transferencia puntual para mostrar definitivamente que la 1F12-Fc se une específicamente a LDCAM. Brevemente, se aplicaron puntualmente 2 µl de una disolución de LDCAM-Fc o RANK-Fc (un control de Fc no relacionada) 1 mg/ml sobre un filtro de nitrocelulosa y se dejaron secar. Después de bloquear durante 1 h con leche/BSA/PBS, se aplicaron puntualmente los siguientes reactivos sobre la membrana: 100 ng de mAb anti-BDCA3-biotina, 100 ng de anticuerpo scfv-Fc de 1F12 o anticuerpo anti-IgG-biotina humana (Fab'2 de ratón de anticuerpo anti-IgG-biotina humana de Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Después de añadir strep-HRP, se reveló el marcaje mediante el sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland). Como se muestra en la Figura 8, el anticuerpo scfv-Fc de 1F12 se une específicamente a LDCAM-Fc recombinante pero no al RANK-Fc no relacionado. La LDCAM de ratón y humana son casi idénticas, teniendo un 98% de identidad a nivel de proteína, lo que explica la reactividad cruzada entre especies del anticuerpo 1F12. El mAb contra BDCA3 no se une significativamente a LDCAM-Fc, sugiriendo por tanto que el antígeno de BDCA3 es diferente de LDCAM.
- Estos resultados muestran que el anticuerpo scfv-Fc de 1F12 (o proteína de fusión) se une específicamente a LDCAM.

Ejemplo 19

La LDCAM inhibe la activación de linfocitos T

- Estos estudios muestran que la LDCAM inhibe la activación de linfocitos T. Se expusieron simultáneamente CD4+ y CD8+ de ratón (Blk-6) a LDCAM-Fc unida a placa y a uno de los siguientes estímulos de activación de linfocitos T: mAb anti-CD3, conA, PHA o conA + IL-2. Se ensayó en los sobrenadantes de cultivo la producción de IFN-gamma por los linfocitos T, que es un marcador de la activación de linfocitos T. Brevemente, se recogieron bazos de B6D2F1, se trituraron, se lisaron los eritrocitos y se contaron las células. Se purificaron las células CD8+ y CD4+ usando perlas MAC™ anti-CD8 (nº de cat. 130-049-401) y anti-CD4 (nº de cat. 130-049-201) de Miltenyi Biotech siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Se recubrieron placas de 48 pocillos con moléculas de Fc LDCAM-Fc (5 µg/ml) o P7.5-Fc de control negativo (5 µg/ml) durante 2 horas a 37°C y se lavaron dos veces. Se incluyó también un pocillo que no contenía proteína Fc. Se recubrieron los pocillos apropiados con mAb anti-CD3 durante 2 h a 37°C y se lavaron 2 veces. Se sembraron las células a $1,25 \times 10^6$ /ml en 1 ml de medio (40% de IMDM + 40% Clicks + 10% de suero fetal bovino + piruvato de sodio + aminoácidos no esenciales + 2 Me + PSG). Se añadieron los mitógenos: conA (1 µg/ml), IL-2 (200 unidades/ml) o PHA (al 1%) a los pocillos apropiados. Se extrajeron los sobrenadantes los días 1 y 5 y se ensayó la IFN-gamma usando un kit ELISA de IFN-gamma comercial.

- La Figura 9 muestra que los linfocitos T CD4+ se anergizaron por LDCAM frente a la activación por mAb anti-CD3 y conA (Figuras 9A y 9C, respectivamente). Las Figuras 9B, 9D, 9F y 9H muestran que los linfocitos T CD8+ se energizaron por LDCAM frente a la activación por mAb anti-CD3, conA, PHA y conA + IL-2, respectivamente. Estos estudios muestran que la LDCAM interacciona con una molécula expresada sobre la superficie de linfocitos T activados de manera dependiente del contacto que evita o reprime la activación de linfocitos T por una variedad de estímulos. Estos estudios muestran que la LDCAM es un agente regulador de rutas inflamatorias. Por lo tanto, la LDCAM tiene aplicación terapéutica como composición farmacéutica para la prevención de la activación de linfocitos T y para el tratamiento de enfermedades que impliquen la activación de linfocitos T, tales como en enfermedades autoinmunitarias, inflamación, trasplante, cáncer, infección y similares. Además, los agonistas y antagonistas de LDCAM, como se definen anteriormente, pueden ser composiciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente memoria.

Ejemplo 19

La CRTAM es un asociado de la LDCAM

- Estos estudios muestran que la CRTAM es un asociado o copartícipe de unión de la LDCAM.
- El análisis por FACS mostró que la LDCAM-Fc se unía a linfocitos T CD8+, y en menor medida a linfocitos T CD4+ (Figuras 10D y 10C, respectivamente), mientras que el anticuerpo scfv-Fc de 1F12 (concretamente, el anticuerpo anti-LDCAM) no lo hacía (las Figuras 10A y 10B son controles isotípicos). El análisis por FACS adicional muestra que los linfocitos T CD8+ activados por anticuerpo anti-CD3 se unen a LDCAM-Fc a altos niveles (Figura 11A) y solo con unión marginal al anticuerpo scfv-Fc de 1F12 (Figura 11B). En contraposición, la LDCAM-Fc mostró una unión marginal de LDCAM-Fc (Figura C) y una alta unión de la proteína de fusión scfv-Fc de 1F12 (Figura 11D). Las células esplénicas CD8+ de ratones tratados con ligando Flt3 mostraron una unión heterogénea tanto de LDCAM-Fc como de scfv-Fc de 1F12 (Figuras 11E y 11F, respectivamente). Tomados en conjunto, estos estudios muestran que la LDCAM se une a linfocitos T citotóxicos (CTL) activados. En contraposición, la proteína de fusión scfv-Fc de 1F12 no consigue marcar esas células. Estos resultados demuestran que está presente una contrapartida estructural o asociado de LDCAM alternativo sobre la superficie de CTL activados.

5 Se ha mostrado que la expresión en superficie celular de la contrapartida estructural de LDCAM se expresa temporalmente sobre la superficie celular de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados. El análisis por FACS mostró que la expresión en superficie celular de la unión de LDCAM-Fc a su asociado en linfocitos T CD4+ se reducía después de aproximadamente 24 horas (Figuras 12C, 12F y 12I). De forma interesante, los linfocitos T CD8+ mostraron un fuerte aumento de la expresión en superficie celular del asociado de LDCAM 24 horas después de la activación (Figura 12D) y una mengua progresiva de expresión en superficie celular a las 48 y 72 horas después de la activación (Figuras 12G y 12J, respectivamente). La expresión de LDCAM sobre la superficie celular de los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados era mínima y constante con el tiempo (Figuras 12B, 12E, 12H y 12K).

10 Se determinó que el asociado de LDCAM era CRTAM mediante inmunoprecipitación de las parejas de unión y la práctica de un análisis de espectrometría de masas de las bandas aisladas. Scfv-Fc de 1F12 y LDCAM-Fc inmunoprecipitaron proteínas de pesos moleculares cercanos pero distintos. Los CTL de ratón activados o DC derivadas de médula ósea de ratón se biotinilaron en superficie y se lisaron con detergente. Se preaclaron los lisados celulares con una matriz de perla de proteína A. Se añadió scfv-Fc de 1F12 al lisado celular de DC derivadas de médula ósea de ratón y se añadió LDCAM-Fc al lisado celular de CTL activados, y se usaron entonces para
15 inmunoprecipitar su diana respectiva. Se añadió matriz de perla de proteína A para extraer los complejos de LDCAM-Fc y scfv-Fc de 1F12 de los lisados. Se comparó el PM aparente de las proteínas precipitadas en un gel reductor mostrado en la Figura 13. La Figura 13A es la banda inmunoprecipitada por LDCAM-Fc a partir de CTL activados. La Figura 13B es la banda inmunoprecipitada por scfv-Fc de 1F12 a partir de DC derivadas de médula ósea. Se obtuvieron resultados similares con DC CD8⁺ esplénicas.

20 Se cortó la banda de la Figura 13A y se analizó por espectrometría de masas. Se presentan esos resultados a continuación, que confirman que la CRTAM es el asociado de la LDCAM.

Ajustes usados

PM peptídico:

Estado de carga:

25 Error de péptido: 0,75 u

Error de fragmento: 0,75 u

Anchura de pico: 1,0 u

Corte del valor de e: $1,0 \times 10^{-15}$

Recalibrar: no

30 PiroGlu N-terminal considerada: sí

Oxidación de Met considerada (máx. 2): sí

Cisteína fija: carbamidometilo (160.031)

Masa de Cys variable (máx. 2):

Bases de datos buscadas: nr_aa, patent_aa, ms_garbage_aa, celera_human_aa, celera_mouse_aa

		2+			2+		
		b	b	b - H2O	y	y	
E	0	---	---	---	---	---	13
S	1	130,05	65,53	112,04	1411,67	706,34	12
E	2	217,08	109,04	199,07	1324,64	662,82	11
I	3	346,13	173,56	328,11	1195,60	598,30	10
S	4	459,21	230,10	441,19	1082,51	541,76	9
E	5	546,24	273,62	528,23	995,48	498,24	8
Q	6	675,28	338,14	657,27	866,44	433,72	7
A	7	803,34	402,17	785,33	738,38	369,69	6
L	8	874,38	437,69	856,36	667,34	334,17	5
E	9	987,46	494,23	969,45	554,26	277,63	4

ES 2 383 328 T3

S	10	1116,51	558,75	1098,49	425,21	213,11	3
Y	11	1203,54	602,27	1185,52	338,18	169,59	2
R	12	1366,60	683,80	1348,59	175,12	88,06	1

MAPLINK	VALOR DE E	CARGA	INICIO-FIN	SECUENCIA	BD BÚSQUEDA	DE	DESCRIPCIÓN DE PROTEÍNA
MAP(01)	8,1 10 ⁻²⁶	x +2	319-331	ESEISEQALESYR	nr_aa		ref NP_062338.1 molécula citotóxica y reguladora de linfocitos T; molécula asociada a linfocitos T limitada a la clase I (<i>Mus musculus</i>) gij 3930161 gb AAC80266.1 molécula asociada a linfocitos T limitada a MHC de clase I (<i>Mus musculus</i>)
MAP(01)	8,1 10 ⁻²⁶	x +2	319-331	ESEISEQALESYR	patent_aa		gsp AAW04405 CRTAM de ratón
MAP(01)	8,1 10 ⁻²⁶	x +2	145-157	ESEISEQALESYR	nr_aa		dbj BAB24204.2 producto proteico sin nombre (<i>Mus musculus</i>)
MAP(01)	8,1 10 ⁻²⁶	x +2	331-343	ESEISEQALESYR	nr_aa		ref XP_236103.1 similar a molécula citotóxica y reguladora de linfocitos T; molécula asociada a linfocitos T limitada a la clase I (<i>Mus musculus</i>) (<i>Rattus norvegicus</i>)
MAP(01)	8,1 10 ⁻²⁶	x +2	319-331	ESEISEQALESYR	patent_aa		gb AAC10711.1 secuencia 4 de la patente de EE.UU. 5686257
MAP(01)	8,1 10 ⁻²⁶	x +2	319-331	ESEISEQALESYR	celera_mouse_aa		cra MCP17461.1 /len= 388 /protein_uid= 197000028318745 /ga_name= GA_x6K02T2PVD /ga_uid=232000009795437 /transcript_name= mCT4204.1 /transcript_uid=110000066470850 /cg_name=mCG5069.1 /start_codon=0 /class= Otto

- En formato ELISA, la Figura 14 muestra que la LDCAM se une específicamente a CRTAM-Fc, pero no a proteína Necl1 ni a un control de IgG. En un conjunto separado de experimentos, se transdujo la estirpe celular EL4 de timoma de ratón (The American Type Culture Collection, ATCC TIB-39) con vectores lentivíricos que codifican LDCAM humana (Figura 15A) o Necl1 humana (Figura 15B). Se enriquecieron entonces las células transducidas mediante clasificación celular magnética usando el maxicuerpo 1F12 o un anticuerpo monoclonal anti-Necl1, respectivamente. Se sondearon las células transducidas enriquecidas con huCRTAM-Fc (línea gruesa), scfv -Fc de 1F12 (línea fina) o anticuerpo anti-Necl1 (línea de puntos). Las líneas verticales representan el límite de unión no específica medido mediante anticuerpos de isotipo de Fc coincidente no relacionados.
- 5
- 10 Se mostró que la reticulación de CRTAM regula negativamente la secreción de citocina (IFN γ) por linfocitos T CD8+ de ratón activados *in vitro* (Figura 16). Se recubre una placa ELISA estándar con anticuerpo monoclonal anti-CD3 y/o proteína LDCAM-Fc. Se aislaron linfocitos T CD8+ activados usando procedimientos estándares y se añadieron al pocillo o pocillos en presencia de un control isotípico de IgG1 o CRTAM-Fc soluble. Se observó un aumento drástico de secreción de IFN-gamma por los linfocitos T cuando se reticularon las células por la LDCAM-Fc unida a la placa. A la inversa, se observó un aumento de la secreción de IFN-gamma por los linfocitos T cuando se añadió CRTAM-Fc al ensayo como competidor entre la LDCAM-Fc unida a la placa y la CRTAM expresada en las células. Estos estudios demuestran adicionalmente que la consecuencia biológica de la unión de LDCAM y la reticulación de CRTAM es reducir la activación, proliferación y liberación de citocinas proinflamatorias de linfocitos T. Como tal, un agonista de LDCAM tal como, pero sin limitación, una proteína de fusión LDCAM-Fc o una forma multimerizada de LDCAM, así como un anticuerpo anti-CRTAM capaz de reticular CRTAM sobre la superficie de las células, sería útil para reducir la activación, proliferación y liberación de citocinas proinflamatorias de linfocitos T.
- 15
- 20
- 25 Estos estudios muestran que la LDCAM interacciona con la CRTAM expresada sobre la superficie de linfocitos T activados de manera dependiente del contacto. Los estudios *in vitro* descritos en el ejemplo 18 demuestran claramente que la interacción de LDCAM y CRTAM evita o reprime la activación de linfocitos T por una variedad de estímulos. Estos estudios muestran que la LDCAM y su asociado CRTAM están implicados en rutas inflamatorias. Por lo tanto, la LDCAM tiene aplicación terapéutica como composición farmacéutica para prevenir la activación de

linfocitos T, y para el tratamiento de enfermedades que implican la activación de linfocitos T, tales como enfermedades autoinmunitarias, inflamación, trasplante, cáncer, infección y similares. Además, los agonistas y antagonistas de la interacción LDCAM/CRTAM, como se definen a lo largo de la memoria descriptiva, pueden tener valor terapéutico como composiciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente memoria.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC. GALIBERT, Laurent J. YAN, Wei
 <120> ANTAGONISTAS Y AGONISTAS DE LDCAM Y SUS MÉTODOS DE USO
 <130> 3467-WO
 <140> por asignar
 5 <141> 23-07-2004
 <150> 60/490.027
 <151> 25-07-2003
 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.2
 10 <210> 1
 <211> 1598
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 15 <221> CDS
 <222> (16)...(1341)
 <400> 1

```

gcggccgcgc ccgac atg gcg agt gta gtg ctg ccg agc gga tcc cag tgt      51
                Met Ala Ser Val Val Leu Pro Ser Gly Ser Gln Cys
                1                    5                    10

gcg gcg gca gcg gcg gcg gcg gcg cct ccc ggg ctc cgg ctc egg ctt      99
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Leu Arg Leu
                15                    20                    25

ctg ctg ttg ctc ttc tcc gcc gcg gca ctg atc ccc aca ggt gat ggg      147
Leu Leu Leu Leu Phe Ser Ala Ala Ala Leu Ile Pro Thr Gly Asp Gly
                30                    35                    40

cag aat ctg ttt acg aaa gac gtg aca gtg atc gag gga gag gtt gcg      195
Gln Asn Leu Phe Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val Ala
45                    50                    55                    60

acc atc agt tgc caa gtc aat aag agt gac gac tct gtg att cag cta      243
Thr Ile Ser Cys Gln Val Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln Leu
                65                    70                    75

ctg aat ccc aac agg cag acc att tat ttc agg gac ttc agg cct ttg      291
Leu Asn Pro Asn Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro Leu
                80                    85                    90

aag gac agc agg ttt cag ttg ctg aat ttt tct agc agt gaa ctc aaa      339
Lys Asp Ser Arg Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu Lys
                95                    100                    105

gta tca ttg aca aac gtc tca att tct gat gaa gga aga tac ttt tgc      387
Val Ser Leu Thr Asn Val Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe Cys
                110                    115                    120
    
```

ES 2 383 328 T3

cag ctc tat acc gat ccc cca cag gaa agt tac acc acc atc aca gtc Gln Leu Tyr Thr Asp Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr Val 125 130 135 140	435
ctg gtc cca cca cgt aat ctg atg atc gat atc cag aaa gac act gcg Leu Val Pro Pro Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Lys Asp Thr Ala 145 150 155	483
gtg gaa ggt gag gag att gaa gtc aac tgc act gct atg gcc agc aag Val Glu Gly Glu Glu Ile Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser Lys 160 165 170	531
cca gcc acg act atc agg tgg ttc aaa ggg aac aca gag cta aaa ggc Pro Ala Thr Thr Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Glu Leu Lys Gly 175 180 185	579
aaa tcg gag gtg gaa gag tgg tca gac atg tac act gtg acc agt cag Lys Ser Glu Val Glu Glu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser Gln 190 195 200	627
ctg atg ctg aag gtg cac aag gag gac gat ggg gtc cca gtg atc tgc Leu Met Leu Lys Val His Lys Glu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile Cys 205 210 215 220	675
cag gtg gag cac cct gcg gtc act gga aac ctg cag acc cag cgg tat Gln Val Glu His Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg Tyr 225 230 235	723
cta gaa gta cag tat aag cct caa gtg cac att cag atg act tat cct Leu Glu Val Gln Tyr Lys Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr Pro 240 245 250	771
cta caa ggc tta acc cgg gaa ggg gac gcg ctt gag tta aca tgt gaa Leu Gln Gly Leu Thr Arg Glu Gly Asp Ala Leu Glu Leu Thr Cys Glu 255 260 265	819
gcc atc ggg aag ccc cag cct gtg atg gta act tgg gtg aga gtc gat Ala Ile Gly Lys Pro Gln Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val Asp 270 275 280	867
gat gaa atg cct caa cac gcc gta ctg tct ggg ccc aac ctg ttc atc Asp Glu Met Pro Gln His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile 285 290 295 300	915
aat aac cta aac aaa aca gat aat ggt aca tac cgc tgt gaa gct tca Asn Asn Leu Asn Lys Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala Ser 305 310 315	963
aac ata gtg ggg aaa gct cac tcg gat tat atg ctg tat gta tac gat Asn Ile Val Gly Lys Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp 320 325 330	1011
ccc ccc aca act atc cct cct ccc aca aca acc acc acc acc acc Pro Pro Thr Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 335 340 345	1059
acc acc acc acc acc atc ctt acc atc atc aca gat tcc cga gca ggt Thr Thr Thr Thr Thr Ile Leu Thr Ile Ile Thr Asp Ser Arg Ala Gly 350 355 360	1107

ES 2 383 328 T3

gaa gaa ggc tgc atc agg gca gtg gat cat gcc gtg atc ggt ggc gtc 1155
 Glu Glu Gly Ser Ile Arg Ala Val Asp His Ala Val Ile Gly Gly Val
 365 370 375 380

gtg gcg gtg gtg gtg ttc gcc atg ctg tgc ttg ctc atc att ctg ggg 1203
 Val Ala Val Val Val Phe Ala Met Leu Cys Leu Leu Ile Ile Leu Gly
 385 390 395

cgc tat ttt gcc aga cat aaa ggt aca tac ttc act cat gaa gcc aaa 1251
 Arg Tyr Phe Ala Arg His Lys Gly Thr Tyr Phe Thr His Glu Ala Lys
 400 405 410

gga gcc gat gac gca gca gac gca gac aca gct ata atc aat gca gaa 1299
 Gly Ala Asp Asp Ala Ala Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu
 415 420 425

gga gga cag aac aac tcc gaa gaa aag aaa gag tac ttc atc 1341
 Gly Gly Gln Asn Asn Ser Glu Glu Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
 430 435 440

tagatcagcc tttttgtttc aatgaggtgt ccaactggcc ctatttagat gataaagaga 1401

cagtgatatt ggaacttgcg agaaattcgt gtgttttttt atgaatgggt ggaaaggtgt 1461

gagactggga aggcttggga tttgctgtgt aaaaaaaaaa aaaaaatggt ctttggaaag 1521

aaaaaagcgg ccgctttctt attctatttc aacattcagc ttaatcataa tcctaaaatc 1581

atacatgcta tttccat 1598

<210> 2
 <211> 442
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Met Ala Ser Val Val Leu Pro Ser Gly Ser Gln Cys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25 30

Phe Ser Ala Ala Ala Leu Ile Pro Thr Gly Asp Gly Gln Asn Leu Phe
 35 40 45

Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val Ala Thr Ile Ser Cys
 50 55 60

Gln Val Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln Leu Leu Asn Pro Asn
 65 70 75 80

Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro Leu Lys Asp Ser Arg
 85 90 95

Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu Lys Val Ser Leu Thr
 100 105 110

Asn Val Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe Cys Gln Leu Tyr Thr
 115 120 125

ES 2 383 328 T3

Asp Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr Val Leu Val Pro Pro
 130 135 140
 Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Lys Asp Thr Ala Val Glu Gly Glu
 145 150 155 160
 Glu Ile Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser Lys Pro Ala Thr Thr
 165 170 175
 Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Glu Leu Lys Gly Lys Ser Glu Val
 180 185 190
 Glu Glu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser Gln Leu Met Leu Lys
 195 200 205
 Val His Lys Glu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile Cys Gln Val Glu His
 210 215 220
 Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg Tyr Leu Glu Val Gln
 225 230 235 240
 Tyr Lys Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr Pro Leu Gln Gly Leu
 245 250 255
 Thr Arg Glu Gly Asp Ala Leu Glu Leu Thr Cys Glu Ala Ile Gly Lys
 260 265 270
 Pro Gln Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val Asp Asp Glu Met Pro
 275 280 285
 Gln His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile Asn Asn Leu Asn
 290 295 300
 Lys Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala Ser Asn Ile Val Gly
 305 310 315 320
 Lys Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp Pro Pro Thr Thr
 325 330 335
 Ile Pro Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 340 345 350
 Thr Ile Leu Thr Ile Ile Thr Asp Ser Arg Ala Gly Glu Glu Gly Ser
 355 360 365
 Ile Arg Ala Val Asp His Ala Val Ile Gly Gly Val Val Ala Val Val
 370 375 380
 Val Phe Ala Met Leu Cys Leu Leu Ile Ile Leu Gly Arg Tyr Phe Ala
 385 390 395 400
 Arg His Lys Gly Thr Tyr Phe Thr His Glu Ala Lys Gly Ala Asp Asp
 405 410 415
 Ala Ala Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu Gly Gly Gln Asn
 420 425 430
 Asn Ser Glu Glu Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
 435 440

<210> 3
 <211> 1935
 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (2)...(1270)

5 <400> 3

```

g gcg gcg cct cca ggg ctc cgg ctc cgg ctc ctg ctg ttg ctc ctt tcg      49
Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ser
 1                    5                    10                    15

gcc gcg gca ctg atc ccc aca ggt gat gga cag aat ctg ttt act aaa      97
Ala Ala Ala Leu Ile Pro Thr Gly Asp Gly Gln Asn Leu Phe Thr Lys
 20                    25                    30

gac gtg aca gtg att gaa gga gaa gtg gca acc atc agc tgc cag gtc      145
Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val Ala Thr Ile Ser Cys Gln Val
 35                    40                    45

aat aag agt gac gac tca gtg atc cag ctc ctg aac ccc aac agg cag      193
Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln Leu Leu Asn Pro Asn Arg Gln
 50                    55                    60

acc att tac ttc agg gac ttc agg cct ttg aag gac agc agg ttt cag      241
Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro Leu Lys Asp Ser Arg Phe Gln
 65                    70                    75                    80

ctg ctg aat ttt tct agc agt gaa ctc aaa gtg tca ctg acg aat gtc      289
Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu Lys Val Ser Leu Thr Asn Val
 85                    90                    95

tca atc tcg gat gaa ggg aga tac ttc tgc cag ctc tac acg gac ccc      337
Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe Cys Gln Leu Tyr Thr Asp Pro
 100                   105                   110

cca cag gag agt tac acc acc atc aca gtc ctg gtt cct cca cgt aac      385
Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr Val Leu Val Pro Pro Arg Asn
 115                   120                   125

ttg atg atc gat atc cag aaa gac acg gca gtt gaa ggg gag gag att      433
Leu Met Ile Asp Ile Gln Lys Asp Thr Ala Val Glu Gly Glu Glu Ile
 130                   135                   140

gaa gtc aac tgt act gcc atg gcc agc aag cca gcg acg acc atc agg      481
Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser Lys Pro Ala Thr Thr Ile Arg
 145                   150                   155                   160

tgg ttc aaa ggg aac aag gaa ctc aaa ggc aaa tca gag gtg gag gag      529
Trp Phe Lys Gly Asn Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ser Glu Val Glu Glu
 165                   170                   175

tgg tcg gac atg tac act gtg acc agt cag ctg atg ctg aag gtg cac      577
Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser Gln Leu Met Leu Lys Val His
 180                   185                   190

aag gag gac gac ggg gtc ccg gtg atc tgc cag gtg gag cac cct gcg      625
Lys Glu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile Cys Gln Val Glu His Pro Ala
 195                   200                   205

```


ES 2 383 328 T3

gtc act gga aac ctg cag acc cag cgc tat cta gaa gtg cag tat aaa Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Lys 210 215 220	673
ccg caa gtg cat atc cag atg act tac cct ctg caa ggc cta acc cgg Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr Pro Leu Gln Gly Leu Thr Arg 225 230 235 240	721
gaa ggg gat gca ttt gag tta acg tgt gaa gcc atc ggg aag ccc cag Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu Thr Cys Glu Ala Ile Gly Lys Pro Gln 245 250 255	769
cct gtg atg gta act tgg gtg aga gtc gat gat gaa atg cct caa cat Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val Asp Asp Glu Met Pro Gln His 260 265 270	817
gcc gta ctg tct ggg cca aac ctg ttc atc aat aac cta aac aaa aca Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile Asn Asn Leu Asn Lys Thr 275 280 285	865
gat aac ggt act tac cgc tgt gag gct tcc aac ata gtg gga aag gct Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala Ser Asn Ile Val Gly Lys Ala 290 295 300	913
cat tcg gac tat atg ctg tat gta tac gat ccc ccc aca act atc cct His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp Pro Pro Thr Thr Ile Pro 305 310 315 320	961
cct ccc aca aca acc acc acc act acc acc acc acc acc acc acc atc Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ile 325 330 335	1009
ctt acc atc atc aca gat tct cga gca ggt gaa gag ggg acc att ggg Leu Thr Ile Ile Thr Asp Ser Arg Ala Gly Glu Glu Gly Thr Ile Gly 340 345 350	1057
gca gtg gac cac gca gtg att ggt ggc gtc gta gcc gtg gtg gtg ttt Ala Val Asp His Ala Val Ile Gly Gly Val Val Ala Val Val Val Phe 355 360 365	1105
gcc atg cta tgc ttg ctc atc att ctg ggc cgc tat ttt gcc aga cat Ala Met Leu Cys Leu Leu Ile Ile Leu Gly Arg Tyr Phe Ala Arg His 370 375 380	1153
aaa ggt aca tac ttc act cat gaa gcc aaa gga gcc gat gac gca gca Lys Gly Thr Tyr Phe Thr His Glu Ala Lys Gly Ala Asp Asp Ala Ala 385 390 395 400	1201
gac gca gac aca gct ata atc aat gca gaa gga gga cag aac aac tcc Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu Gly Gly Gln Asn Asn Ser 405 410 415	1249
gaa gaa aag aaa gag tac ttc atctagatca gcctttttgt tccaatgagg Glu Glu Lys Lys Glu Tyr Phe 420	1300
tgtccaactg gcctgtttag atgataaaga gacagtgata ctggaacttt cgagaagctc	1360
gtgtgggttt ttgttttgtt ttgttttttt atgagtgagg ggagagatgc gagactggga	1420
aggcttgga tttgcaatgt acaaacaaaa acaagaatg ttctttgaaa gtacactctg	1480

ES 2 383 328 T3

ctgtttgaca cctcttttta atctggtttt aatttgcttt gggttttggg tttttttggt 1540
 tttttgtttt tttcatttat atttcttctt accaagtcaa acttgggtac ttggatttgg 1600
 tttcggtaga ttgcagaaaa ttctgtgcct tgtttttcat tcgtttggtg tgtttcttcc 1660
 ctcttgccca tttatttttc ccaaaatcaa atttgttttt ttccccctcc caaacctccc 1720
 attttttggg attgacctgc tggaattcct aagactttct cctgtttgcc agtttctttt 1780
 atttgtgtta acggtgactg ctttctgttc caaattcagt ttcataaaag gaaaaccagc 1840
 acaatttaga tttcatagtt cagaatttag tgtctccatg atgcatcctt ctctgttgtt 1900
 gtaaagattt ggggtgaagaa aaaaaaaaaa aaaaa 1935

<210> 4
 <211> 423
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*
 <400> 4

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

ES 2 383 328 T3

Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Lys
 210 215 220

Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr Pro Leu Gln Gly Leu Thr Arg
 225 230 235 240

Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu Thr Cys Glu Ala Ile Gly Lys Pro Gln
 245 250 255

Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val Asp Asp Glu Met Pro Gln His
 260 265 270

Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile Asn Asn Leu Asn Lys Thr
 275 280 285

Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala Ser Asn Ile Val Gly Lys Ala
 290 295 300

His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp Pro Pro Thr Thr Ile Pro
 305 310 315 320

Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ile
 325 330 335

Leu Thr Ile Ile Thr Asp Ser Arg Ala Gly Glu Glu Gly Thr Ile Gly
 340 345 350

Ala Val Asp His Ala Val Ile Gly Gly Val Val Ala Val Val Val Phe
 355 360 365

Ala Met Leu Cys Leu Leu Ile Ile Leu Gly Arg Tyr Phe Ala Arg His
 370 375 380

Lys Gly Thr Tyr Phe Thr His Glu Ala Lys Gly Ala Asp Asp Ala Ala
 385 390 395 400

Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu Gly Gly Gln Asn Asn Ser
 405 410 415

Glu Glu Lys Lys Glu Tyr Phe
 420

<210> 5
 <211> 29
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 5

tatgtcgaca tggcgagtgt agtgctgcc 29

10 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 6

atatagatct atgatccact gccctgatcg 30

ES 2 383 328 T3

<210> 7
 <211> 1820
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (157)...(1452)
 <400> 7

```

aagcttggca cgaggcggtc cccacctcgg ccccgggctc cgaagcggct cgggggcgcc      60
ctttcgggtca acatcgtagt ccaccccctc cccatcccga gccccggggg attcaggctc      120
gccagcggccc agccagggag cgggccggga agcgcg atg ggg gcc cca gcc gcc      174
                                     Met Gly Ala Pro Ala Ala
                                     1                               5
tcg ctc ctg ctc ctg ctc ctg ctg ttc gcc tgc tgc tgg gcg ccc ggc      222
Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Ala Cys Cys Trp Ala Pro Gly
                               10                               15                               20
ggg gcc aac ctc tcc cag gac ggc tac tgg cag gag cag gat ttg gag      270
Gly Ala Asn Leu Ser Gln Asp Gly Tyr Trp Gln Glu Gln Asp Leu Glu
                               25                               30                               35
ctg gga act ctg gct cca ctc gac gag gcc atc agc tcc aca gtc tgg      318
Leu Gly Thr Leu Ala Pro Leu Asp Glu Ala Ile Ser Ser Thr Val Trp
                               40                               45                               50
agc agc cct gac atg ctg gcc agt caa gac agc cag ccc tgg aca tct      366
Ser Ser Pro Asp Met Leu Ala Ser Gln Asp Ser Gln Pro Trp Thr Ser
55                               60                               65                               70
gat gaa aca gtg gtg gct ggt ggc acc gtg gtg ctc aag tgc caa gtg      414
Asp Glu Thr Val Val Ala Gly Gly Thr Val Val Leu Lys Cys Gln Val
                               75                               80                               85
aaa gat cac gag gac tca tcc ctg caa tgg tct aac cct gct cag cag      462
Lys Asp His Glu Asp Ser Ser Leu Gln Trp Ser Asn Pro Ala Gln Gln
                               90                               95                               100
act ctc tac ttt ggg gag aag aga gcc ctt cga gat aat cga att cag      510
Thr Leu Tyr Phe Gly Glu Lys Arg Ala Leu Arg Asp Asn Arg Ile Gln
                               105                               110                               115
ctg gtt acc tct acg ccc cac gag ctc agc atc agc atc agc aat gtg      558
Leu Val Thr Ser Thr Pro His Glu Leu Ser Ile Ser Ile Ser Asn Val
                               120                               125                               130
gcc ctg gca gac gag ggc gag tac acc tgc tca atc ttc act atg cct      606
Ala Leu Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Thr Cys Ser Ile Phe Thr Met Pro
135                               140                               145                               150
    
```

ES 2 383 328 T3

gtg cga act gcc aag tcc ctc gtc act gtg cta gga att cca cag aag	654
Val Arg Thr Ala Lys Ser Leu Val Thr Val Leu Gly Ile Pro Gln Lys	
155 160 165	
ccc atc atc act ggt tat aaa tct tca tta cgg gaa aaa gac aca gcc	702
Pro Ile Ile Thr Gly Tyr Lys Ser Ser Leu Arg Glu Lys Asp Thr Ala	
170 175 180	
acc cta aac tgt cag tct tct ggg agc aag cct gca gcc cgg ctc acc	750
Thr Leu Asn Cys Gln Ser Ser Gly Ser Lys Pro Ala Ala Arg Leu Thr	
185 190 195	
tgg aga aag ggt gac caa gaa ctc cac gga gaa cca acc cgc ata cag	798
Trp Arg Lys Gly Asp Gln Glu Leu His Gly Glu Pro Thr Arg Ile Gln	
200 205 210	
gaa gat ccc aat ggt aaa acc ttc act gtc agc agc tcg gtg aca ttc	846
Glu Asp Pro Asn Gly Lys Thr Phe Thr Val Ser Ser Ser Val Thr Phe	
215 220 225 230	
cag gtt acc cgg gag gat gat ggg gcg agc atc gtg tgc tct gtg aac	894
Gln Val Thr Arg Glu Asp Asp Gly Ala Ser Ile Val Cys Ser Val Asn	
235 240 245	
cat gaa tct cta aag gga gct gac aga tcc acc tct caa cgc att gaa	942
His Glu Ser Leu Lys Gly Ala Asp Arg Ser Thr Ser Gln Arg Ile Glu	
250 255 260	
gtt tta tac aca cca act gcg atg att agg cca gac cct ccc cat cct	990
Val Leu Tyr Thr Pro Thr Ala Met Ile Arg Pro Asp Pro Pro His Pro	
265 270 275	
cgt gag ggc cag aag ctg ttg cta cac tgt gag ggt cgc ggc aat cca	1038
Arg Glu Gly Gln Lys Leu Leu Leu His Cys Glu Gly Arg Gly Asn Pro	
280 285 290	
gtc ccc cag cag tac cta tgg gag aag gag ggc agt gtg cca ccc ctg	1086
Val Pro Gln Gln Tyr Leu Trp Glu Lys Glu Gly Ser Val Pro Pro Leu	
295 300 305 310	
aag atg acc cag gag agt gcc ctg atc ttc cct ttc ctc aac aag agt	1134
Lys Met Thr Gln Glu Ser Ala Leu Ile Phe Pro Phe Leu Asn Lys Ser	
315 320 325	
gac agt ggc acc tac ggc tgc aca gcc acc agc aac atg ggc agc tac	1182
Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Cys Thr Ala Thr Ser Asn Met Gly Ser Tyr	
330 335 340	
aag gcc tac tac acc ctc aat gtt aat gac ccc agt ccg gtg ccc tcc	1230
Lys Ala Tyr Tyr Thr Leu Asn Val Asn Asp Pro Ser Pro Val Pro Ser	
345 350 355	
tcc tcc agc acc tac cac gcc atc atc ggt ggg atc gtg gct ttc att	1278
Ser Ser Ser Thr Tyr His Ala Ile Ile Gly Gly Ile Val Ala Phe Ile	
360 365 370	
gtc ttc ctg ctg ctc atc atg ctc atc ttc ctt ggc cac tac ttg atc	1326
Val Phe Leu Leu Leu Ile Met Leu Ile Phe Leu Gly His Tyr Leu Ile	
375 380 385 390	

Leu Gly Ile Pro Gln Lys Pro Ile Ile Thr Gly Tyr Lys Ser Ser Leu
 165 170 175
 Arg Glu Lys Asp Thr Ala Thr Leu Asn Cys Gln Ser Ser Gly Ser Lys
 180 185 190
 Pro Ala Ala Arg Leu Thr Trp Arg Lys Gly Asp Gln Glu Leu His Gly
 195 200 205
 Glu Pro Thr Arg Ile Gln Glu Asp Pro Asn Gly Lys Thr Phe Thr Val
 210 215 220
 Ser Ser Ser Val Thr Phe Gln Val Thr Arg Glu Asp Asp Gly Ala Ser
 225 230 235 240
 Ile Val Cys Ser Val Asn His Glu Ser Leu Lys Gly Ala Asp Arg Ser
 245 250 255
 Thr Ser Gln Arg Ile Glu Val Leu Tyr Thr Pro Thr Ala Met Ile Arg
 260 265 270
 Pro Asp Pro Pro His Pro Arg Glu Gly Gln Lys Leu Leu Leu His Cys
 275 280 285
 Glu Gly Arg Gly Asn Pro Val Pro Gln Gln Tyr Leu Trp Glu Lys Glu
 290 295 300
 Gly Ser Val Pro Pro Leu Lys Met Thr Gln Glu Ser Ala Leu Ile Phe
 305 310 315 320
 Pro Phe Leu Asn Lys Ser Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Cys Thr Ala Thr
 325 330 335
 Ser Asn Met Gly Ser Tyr Lys Ala Tyr Tyr Thr Leu Asn Val Asn Asp
 340 345 350
 Pro Ser Pro Val Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr His Ala Ile Ile Gly
 355 360 365
 Gly Ile Val Ala Phe Ile Val Phe Leu Leu Leu Ile Met Leu Ile Phe
 370 375 380
 Leu Gly His Tyr Leu Ile Arg His Lys Gly Thr Tyr Leu Thr His Glu
 385 390 395 400
 Ala Lys Gly Ser Asp Asp Ala Pro Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn
 405 410 415
 Ala Glu Gly Gly Gln Ser Gly Gly Asp Asp Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
 420 425 430

<210> 9
 <211> 1718
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (157)...(1350)
 <400> 9

ES 2 383 328 T3

tct cta aag gga gct gac aga tcc acc tct caa cgc att gaa gtt tta 846
 Ser Leu Lys Gly Ala Asp Arg Ser Thr Ser Gln Arg Ile Glu Val Leu
 215 220 225 230

tac aca cca act gcg atg att agg cca gac cct ccc cat cct cgt gag 894
 Tyr Thr Pro Thr Ala Met Ile Arg Pro Asp Pro Pro His Pro Arg Glu
 235 240 245

ggc cag aag ctg ttg cta cac tgt gag ggt cgc ggc aat cca gtc ccc 942
 Gly Gln Lys Leu Leu Leu His Cys Glu Gly Arg Gly Asn Pro Val Pro
 250 255 260

cag cag tac cta tgg gag aag gag ggc agt gtg cca ccc ctg aag atg 990
 Gln Gln Tyr Leu Trp Glu Lys Glu Gly Ser Val Pro Pro Leu Lys Met
 265 270 275

acc cag gag agt gcc ctg atc ttc cct ttc ctc aac aag agt gac agt 1038
 Thr Gln Glu Ser Ala Leu Ile Phe Pro Phe Leu Asn Lys Ser Asp Ser
 280 285 290

ggc acc tac ggc tgc aca gcc acc agc aac atg ggc agc tac aag gcc 1086
 Gly Thr Tyr Gly Cys Thr Ala Thr Ser Asn Met Gly Ser Tyr Lys Ala
 295 300 305 310

tac tac acc ctc aat gtt aat gac ccc agt ccg gtg ccc tcc tcc tcc 1134
 Tyr Tyr Thr Leu Asn Val Asn Asp Pro Ser Pro Val Pro Ser Ser Ser
 315 320 325

agc acc tac cac gcc atc atc ggt ggg atc gtg gct ttc att gtc ttc 1182
 Ser Thr Tyr His Ala Ile Ile Gly Gly Ile Val Ala Phe Ile Val Phe
 330 335 340

ctg ctg ctc atc atg ctc atc ttc ctt ggc cac tac ttg atc cgg cac 1230
 Leu Leu Leu Ile Met Leu Ile Phe Leu Gly His Tyr Leu Ile Arg His
 345 350 355

aaa gga acc tac ctg aca cat gag gca aaa ggc tcc gac gat gct cca 1278
 Lys Gly Thr Tyr Leu Thr His Glu Ala Lys Gly Ser Asp Asp Ala Pro
 360 365 370

gac gcg gac acg gcc atc atc aat gca gaa ggc ggg cag tca gga ggg 1326
 Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu Gly Gly Gln Ser Gly Gly
 375 380 385 390

gac gac aag aag gaa tat ttc atc tagaggcgcc tgcccacttc ctgcgcccc 1380
 Asp Asp Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
 395

caggggcccct gtggggactg ctggggccgt caccaaccgg gacttgtaga gagcaaccgc 1440

agggccgccc ctcccgettg ctcccagcc caccacccc cctgtacaga atgtctgctt 1500

tgggtgcggt tttgtactcg gtttggaatg gggaggagg agggcggggg gaggggagg 1560

ttgccctcag ccctttccgt ggcttctctg catttgggtt attattattt ttgtaacaat 1620

cccaaatcaa atctgtctcc aggctggaga ggcaggagcc ctgggggtgag aaaagcaaaa 1680

aacaacaaa aaaaaaaaaa aaaaattcct gcggccgc 1718

<210> 10
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

Met Gly Ala Pro Ala Ala Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Ala
 1 5 10 15
 Cys Cys Trp Ala Pro Gly Gly Ala Asn Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gln
 20 25 30
 Pro Trp Thr Ser Asp Glu Thr Val Val Ala Gly Gly Thr Val Val Leu
 35 40 45
 Lys Cys Gln Val Lys Asp His Glu Asp Ser Ser Leu Gln Trp Ser Asn
 50 55 60
 Pro Ala Gln Gln Thr Leu Tyr Phe Gly Glu Lys Arg Ala Leu Arg Asp
 65 70 75 80
 Asn Arg Ile Gln Leu Val Thr Ser Thr Pro His Glu Leu Ser Ile Ser
 85 90 95
 Ile Ser Asn Val Ala Leu Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Thr Cys Ser Ile
 100 105 110
 Phe Thr Met Pro Val Arg Thr Ala Lys Ser Leu Val Thr Val Leu Gly
 115 120 125
 Ile Pro Gln Lys Pro Ile Ile Thr Gly Tyr Lys Ser Ser Leu Arg Glu
 130 135 140
 Lys Asp Thr Ala Thr Leu Asn Cys Gln Ser Ser Gly Ser Lys Pro Ala
 145 150 155 160
 Ala Arg Leu Thr Trp Arg Lys Gly Asp Gln Glu Leu His Gly Glu Pro
 165 170 175
 Thr Arg Ile Gln Glu Asp Pro Asn Gly Lys Thr Phe Thr Val Ser Ser
 180 185 190
 Ser Val Thr Phe Gln Val Thr Arg Glu Asp Asp Gly Ala Ser Ile Val
 195 200 205
 Cys Ser Val Asn His Glu Ser Leu Lys Gly Ala Asp Arg Ser Thr Ser
 210 215 220
 Gln Arg Ile Glu Val Leu Tyr Thr Pro Thr Ala Met Ile Arg Pro Asp
 225 230 235 240
 Pro Pro His Pro Arg Glu Gly Gln Lys Leu Leu Leu His Cys Glu Gly
 245 250 255
 Arg Gly Asn Pro Val Pro Gln Gln Tyr Leu Trp Glu Lys Glu Gly Ser
 260 265 270
 Val Pro Pro Leu Lys Met Thr Gln Glu Ser Ala Leu Ile Phe Pro Phe
 275 280 285
 Leu Asn Lys Ser Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Cys Thr Ala Thr Ser Asn
 290 295 300

ES 2 383 328 T3

Met Gly Ser Tyr Lys Ala Tyr Tyr Thr Leu Asn Val Asn Asp Pro Ser
 305 310 315 320
 Pro Val Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr His Ala Ile Ile Gly Gly Ile
 325 330 335
 Val Ala Phe Ile Val Phe Leu Leu Leu Ile Met Leu Ile Phe Leu Gly
 340 345 350
 His Tyr Leu Ile Arg His Lys Gly Thr Tyr Leu Thr His Glu Ala Lys
 355 360 365
 Gly Ser Asp Asp Ala Pro Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu
 370 375 380
 Gly Gly Gln Ser Gly Gly Asp Asp Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
 385 390 395

<210> 11
 <211> 393
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

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

ES 2 383 328 T3

Thr Val Asp Cys Ile Ile Arg His Arg Gly Leu Gln Gly Arg Lys Leu
 195 200 205

Val Ala Pro Phe Arg Phe Glu Asp Leu Val Thr Asp Glu Glu Thr Ala
 210 215 220

Ser Asp Ala Leu Glu Arg Asn Ser Leu Ser Thr Gln Asp Pro Gln Gln
 225 230 235 240

Pro Thr Ser Thr Val Ser Val Thr Glu Asp Ser Ser Thr Ser Glu Ile
 245 250 255

Asp Lys Glu Glu Lys Glu Gln Thr Thr Gln Asp Pro Asp Leu Thr Thr
 260 265 270

Glu Ala Asn Pro Gln Tyr Leu Gly Leu Ala Arg Lys Lys Ser Gly Ile
 275 280 285

Leu Leu Leu Thr Leu Val Ser Phe Leu Ile Phe Ile Leu Phe Ile Ile
 290 295 300

Val Gln Leu Phe Ile Met Lys Leu Arg Lys Ala His Val Ile Trp Lys
 305 310 315 320

Arg Glu Asn Glu Val Ser Glu His Thr Leu Glu Ser Tyr Arg Ser Arg
 325 330 335

Ser Asn Asn Glu Glu Thr Ser Ser Glu Glu Lys Asn Gly Gln Ser Ser
 340 345 350

Leu Pro Met Arg Cys Met Asn Tyr Ile Thr Lys Leu Tyr Ser Glu Ala
 355 360 365

Lys Thr Lys Arg Lys Glu Asn Val Gln His Ser Lys Leu Glu Glu Lys
 370 375 380

His Ile Gln Val Pro Glu Ser Ile Val
 385 390

<210> 12
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly His
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Arg Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Val Ser Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

- <210> 13
- <211> 104
- <212> PRT
- 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Pro Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
 1 5 10 15

Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
 35 40 45

Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala
 50 55 60

Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
 65 70 75 80

Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Ser Thr His Arg Gly Val Phe Gly Gly
 85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de antagonización de la unión de LDCAM y CRTAM, que comprende exponer células que expresan LDCAM o células que expresan CRTAM a un polipéptido de LDCAM soluble, de tal modo que el péptido de LDCAM soluble bloquee la unión entre LDCAM y CRTAM.
- 5 2. Un método *in vitro* de antagonización de la unión de LDCAM y CRTAM, que comprende exponer células que expresan LDCAM a un anticuerpo específico de LDCAM, de tal modo que el anticuerpo específico de LDCAM bloquee la unión entre LDCAM y CRTAM.
3. Un método *in vitro* de agonización de los efectos biológicos de la unión de LDCAM a CRTAM, que comprende exponer células que expresan CRTAM a un anticuerpo específico de CRTAM, de tal modo que el anticuerpo específico de CRTAM se una a CRTAM y active el receptor de CRTAM.
- 10 4. Un método *in vitro* según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo específico de LDCAM comprende una secuencia aminoacídica variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 12 y una secuencia aminoacídica variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 13.
5. Un método de cribado de un antagonista o agonista de LDCAM que comprende
 - 15 (a) combinar un polipéptido de LDCAM aislado con un compuesto de ensayo;
 - (b) añadir un polipéptido de CRTAM aislado o una célula que expresa un polipéptido de CRTAM; y
 - (c) determinar la unión relativa entre el polipéptido de LDCAM y el polipéptido de CRTAM o la célula que expresa un polipéptido de CRTAM en presencia y ausencia del compuesto de ensayo.
6. Un método de cribado de un antagonista o agonista de LDCAM que comprende
 - 20 (a) combinar una célula que expresa un polipéptido de LDCAM con un compuesto de ensayo;
 - (b) añadir un polipéptido de CRTAM aislado o una célula que expresa un polipéptido de CRTAM; y
 - (c) determinar la unión relativa entre la célula que expresa polipéptido de LDCAM y el polipéptido de CRTAM o la célula que expresa el polipéptido de CRTAM en presencia o ausencia del compuesto de ensayo.
7. Un método de cribado de un agonista de LDCAM que comprende
 - 25 (a) combinar un polipéptido de CRTAM aislado o una célula que expresa un polipéptido de CRTAM con un compuesto de ensayo; y
 - (b) determinar la unión relativa entre el compuesto de ensayo y el polipéptido de CRTAM o una célula que expresa un polipéptido de CRTAM o determinar la activación, proliferación, diferenciación celular, liberación de citocina, regulación positiva de genes o expresión en superficie celular de proteínas causadas por la interacción de la célula que expresa un polipéptido de CRTAM y el compuesto de ensayo.
 - 30

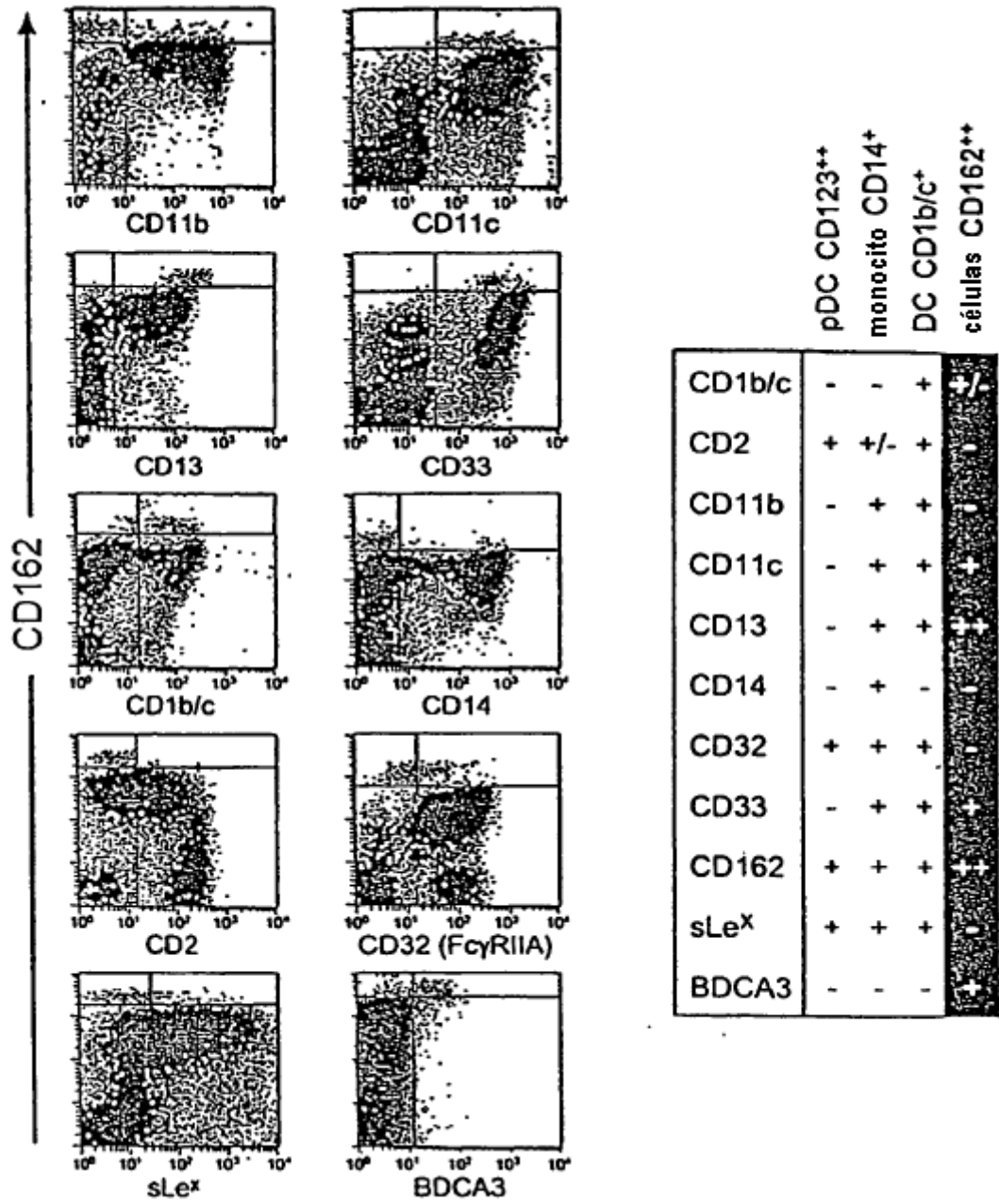


FIGURA 1

ES 2 383 328 T3

Nombre o nombres de secuencia	Descripción de secuencia	Nº de acceso humano	Número de acceso de ratón
ACTN1	ARNm de alfa-actinina no muscular humana, cds completas	M95178	AI195392
ADFP	Proteína relacionada con la diferenciación adiposa	BC005127	M93275
ANPEP	Alanilaminopeptidasa (de membrana) (aminopeptidasa N, aminopeptidasa M, aminopeptidasa microsómica, CD13, p150)	NM_001150	U77083
BST1	Antígeno celular estrómicico 1 de médula ósea	NM_004334	D31788
CD63	Antígeno CD63 (antígeno de melanoma 1)	NM_001780	D16432
CD81	Antígeno CD81 (diana del anticuerpo antiproliferativo 1)	NM_004356	X59047
Clic4	Canal intracelular de cloruro 4 (mitocondrial)	AL577024	AI845237
CREG	Represor celular de genes CREG estimulados por E1A	AF084523	AK010947
CSRP1	Proteína rica en cisteína y glicina 1	NM_004078	AI837225
CXCL9	ligando 9 de quimiocina (motivo C-X-C), monocina inducida por interferón gamma	NM_002416	M34815
CXCL16	ligando 16 de quimiocina (motivo C-X-C)	AL531790	AI019535
DNASE1L3	Similar a desoxirribonucleasa 1	NM_004944	AF047355
DYSF	Disferlina	AF075575	NM_021469
EPLIN	Proteína epitelial perdida en neoplasia beta	NM_016357	AI552619
GADD45B	Proteína GADD45beta inducible por detención del crecimiento y daño del ADN	AF078077	AV138783
IGSF4	Miembro 4 de la superfamilia de inmunoglobulinas	NM_014333	AF061260
ITGAE	Integrina alfa-E asociada a epitelio	L25851	NM_008399
IL15	Interleucina 15	NM_000585	U14332
LY75	Antígeno linfocítico 75	NM_002349	NM_013825
MARCKS	Sustrato de proteína cinasa C rico en alanina miristoilada	NM_002356	M60474
PIK3CB	Isoforma de la subunidad beta catalítica de fosfatidilinositol-3-cinasa	AA805318	AA111021
PPAP2A	ARNm de ácido fosfatídico fosfatasa 2a de <i>Homo sapiens</i> , cds completas	AB000888	D84376
PSMB9	Subunidad beta de proteosoma (prosoma, Macropain) de tipo 9 (proteasa multifuncional grande 2)	NM_002800	D44456
RGS10	Regulador de la señalización de proteína G 10	NM_002925	AA123848
SLC11A1	Miembro 1 de la familia 11 de portadores de soluto (transportadores de ión metálico divalente acoplado con protón)	L32185	L13732
TAP2	Subfamilia B del módulo de unión a ATP del transportador 2, (MDR/TAP)	NM_000544	U60091
UBE2N	Enzima E2N de conjugación con ubiquitina (homóloga de UBC13, levadura)	NM_003348	AW210080

FIGURA 2

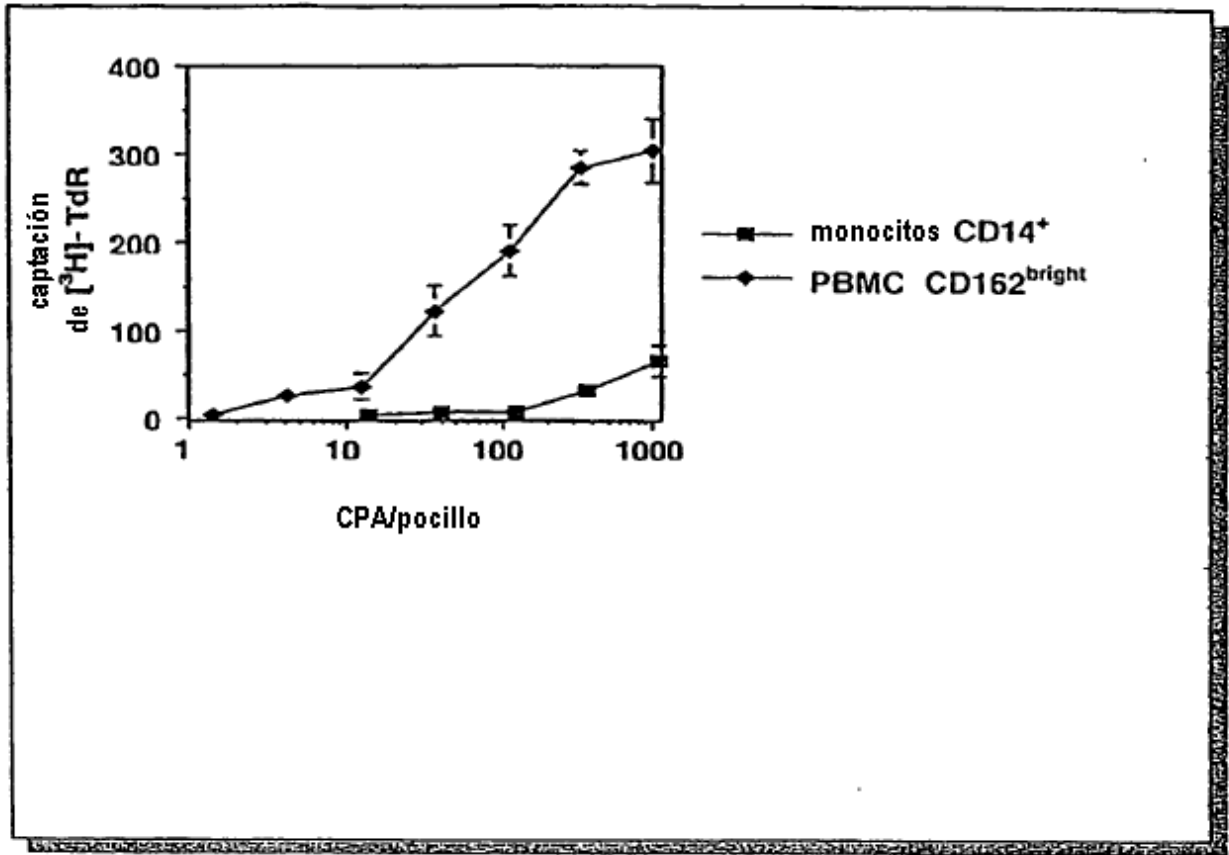


FIGURA 3

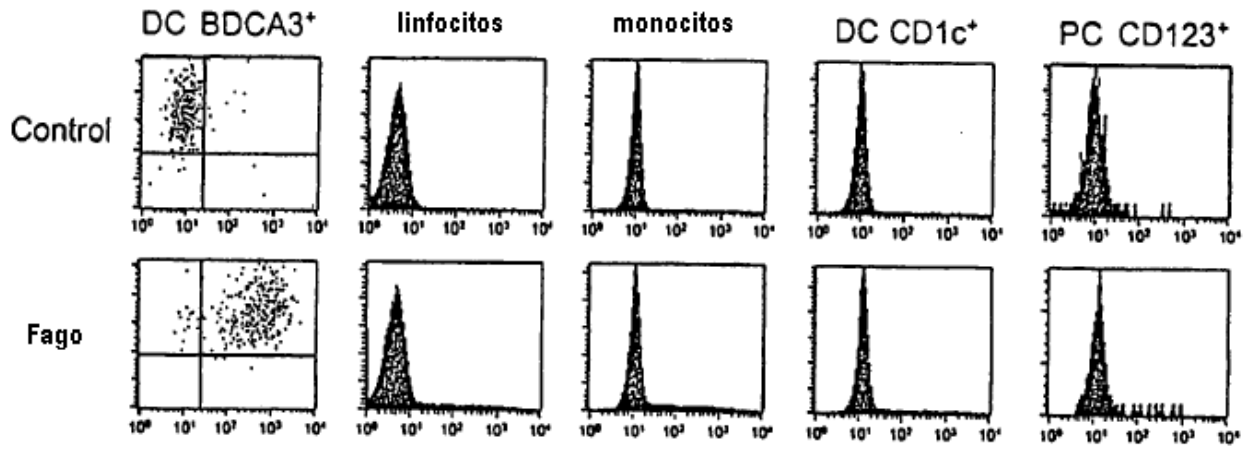


FIGURA 4

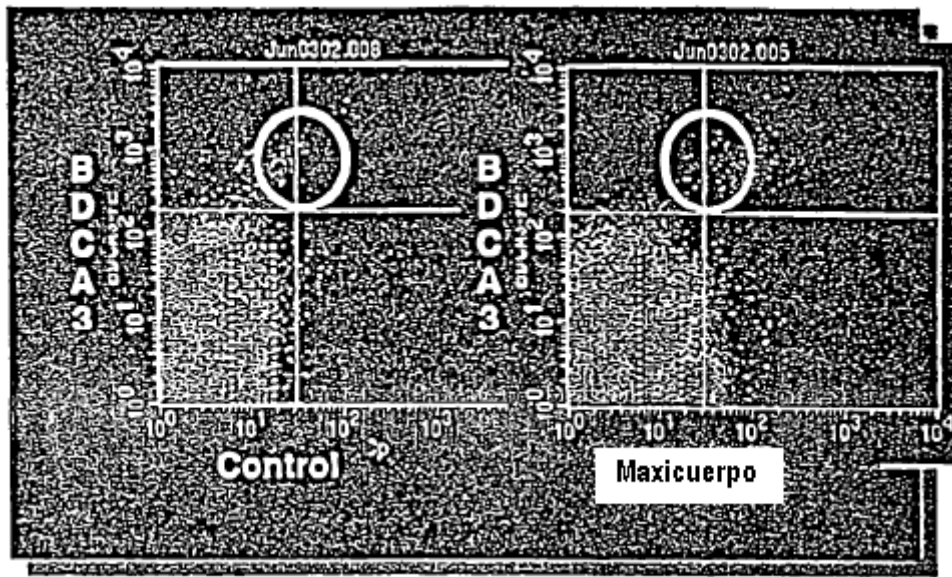


FIGURA 5

Región variable de VH (cadena pesada)

QVQLVQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GHYWSWIRQP PGKGLEWIGE
INHSGSTNYN PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL RLNSVTAADT AVYYCARVSW
YFDLWGKGT L VTVSS

Región variable de VL (cadena ligera)

PELTQDPAVS VALGQTVRIT CQGDSLRSY ASWYQQKPGQ APVLVIYGKN NRPSG
SGSSSGNTAS LTITGAQAED EADYYCNSRD SSSTHRGVFG GTKLTVLG

5

FIGURA 6

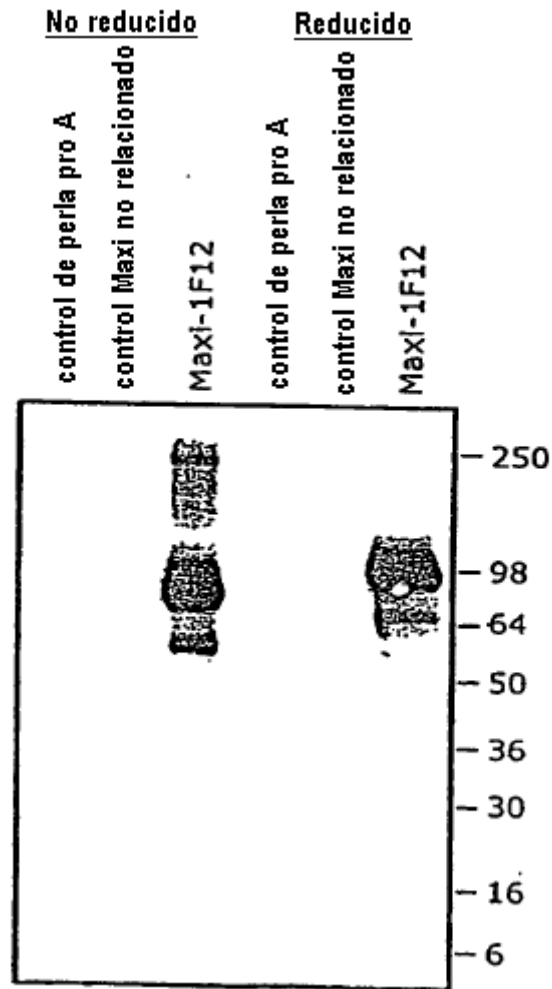


FIGURA 7

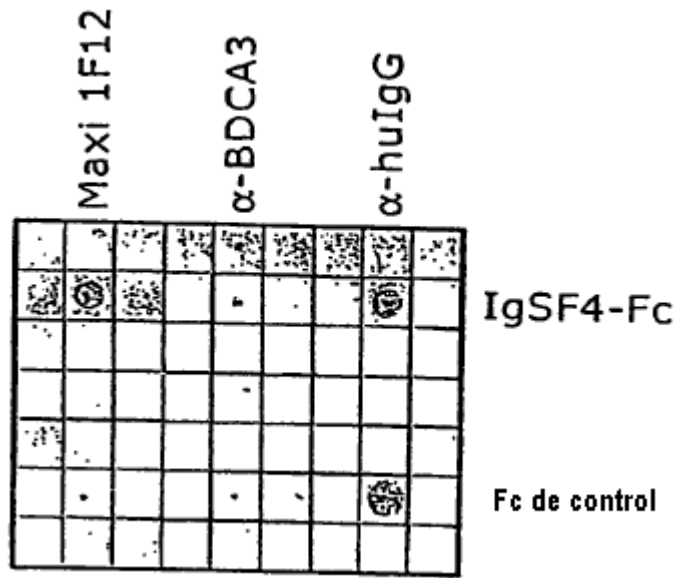
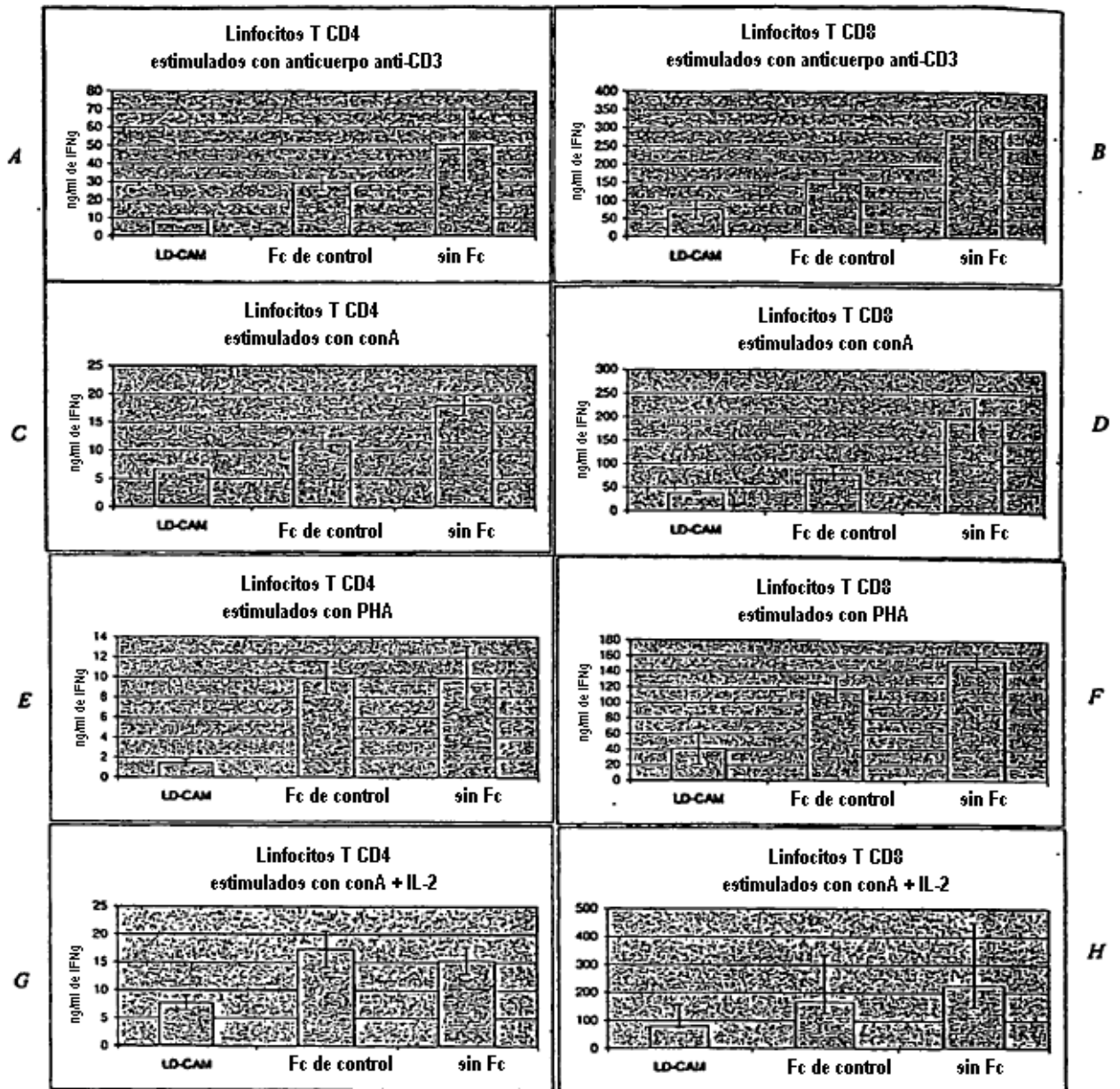
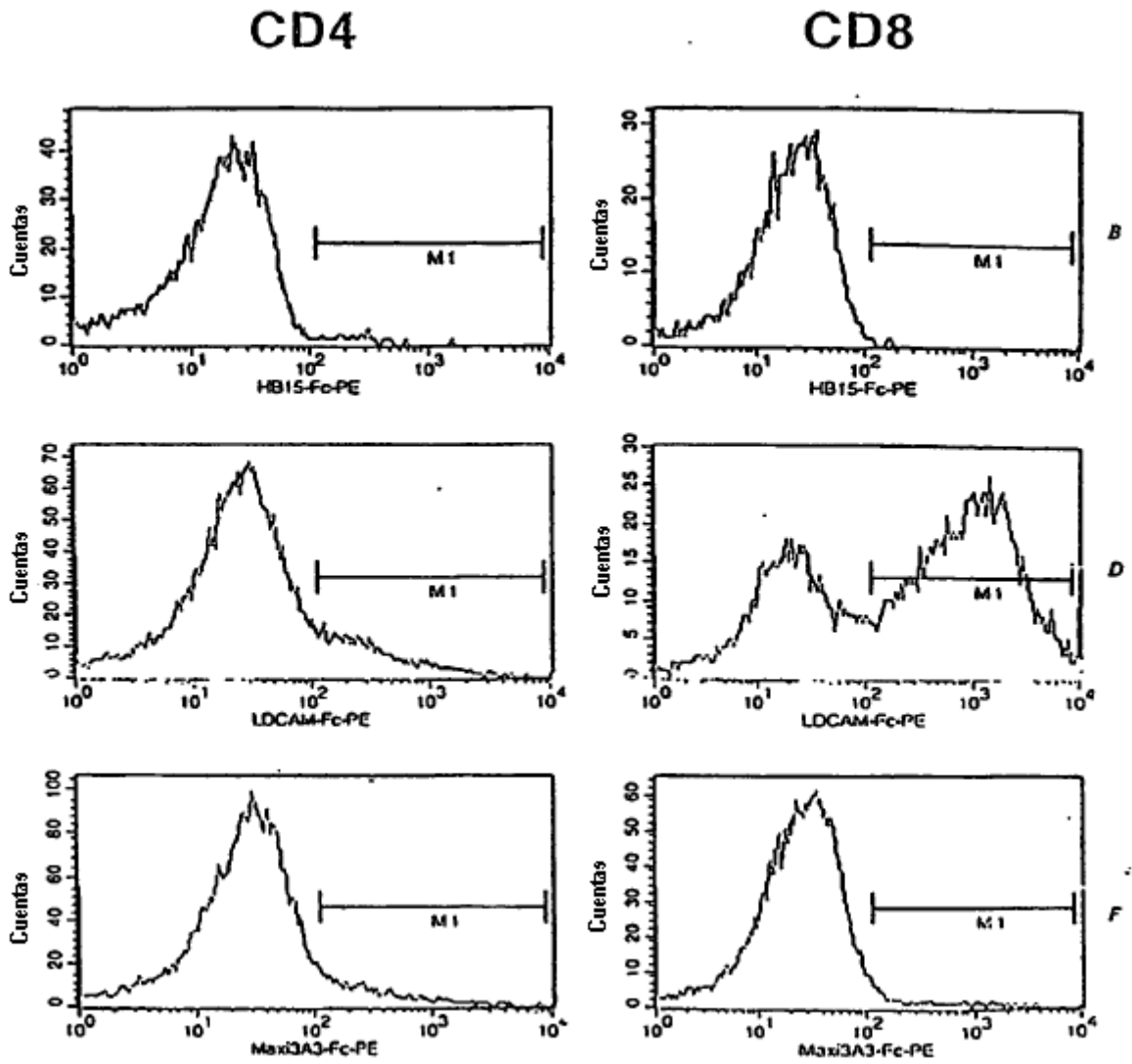


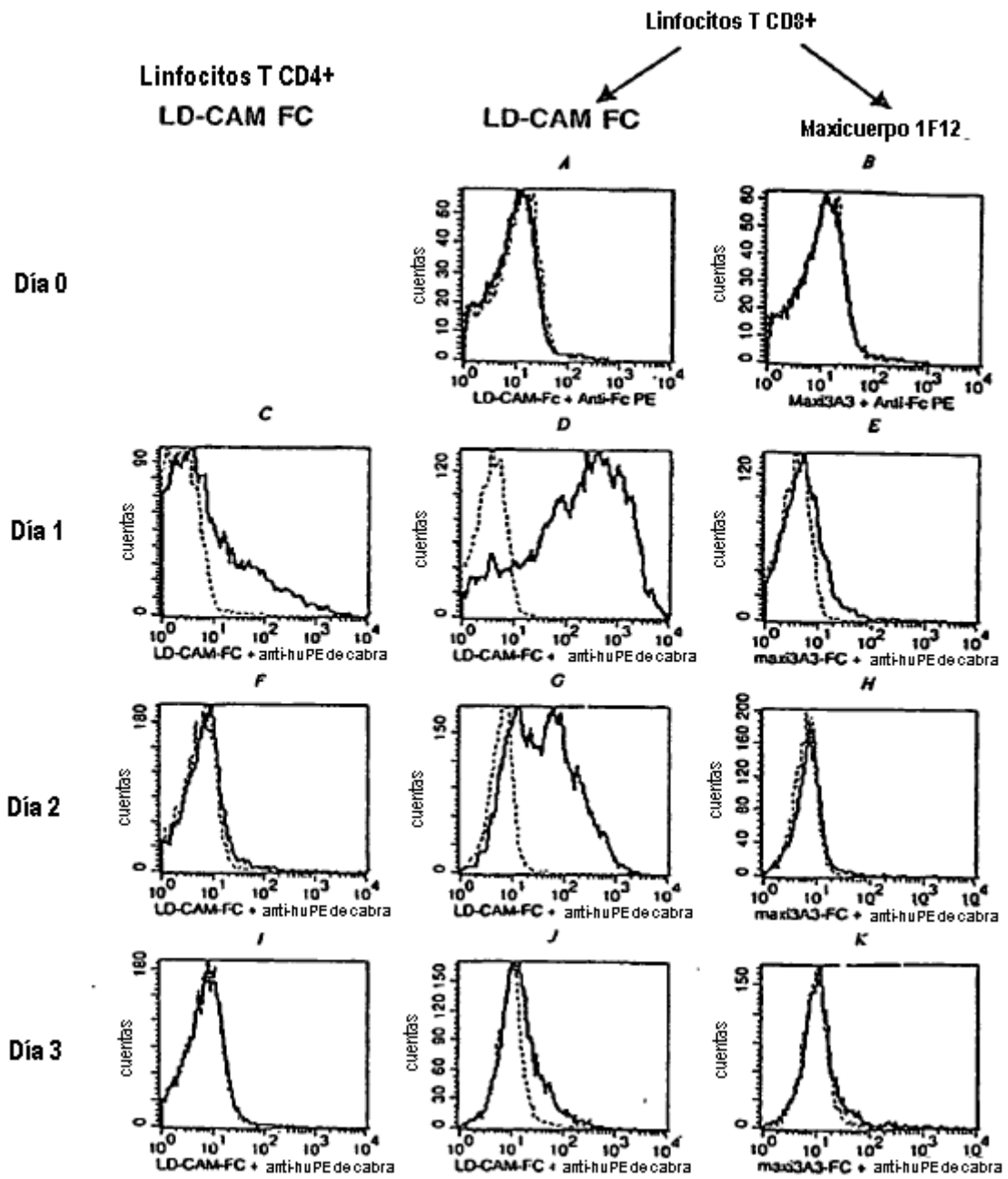
FIGURA 8



FIGURAS 9A-H



FIGURAS 10A-F



FIGURAS 12A-K

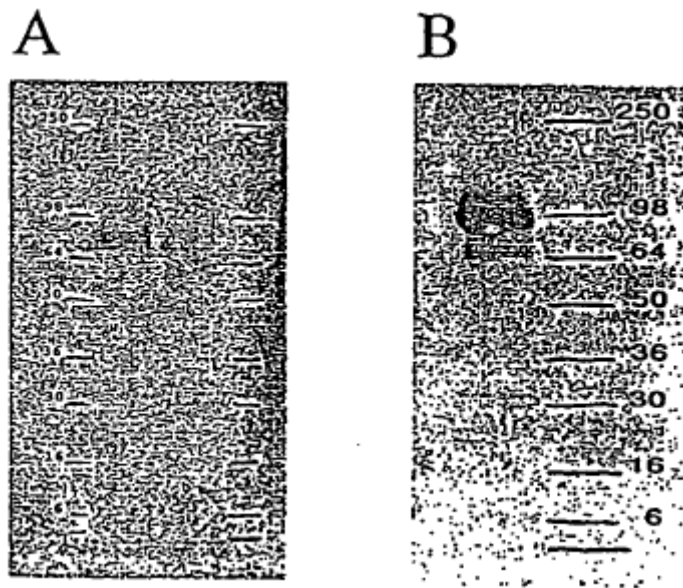


FIGURA 13

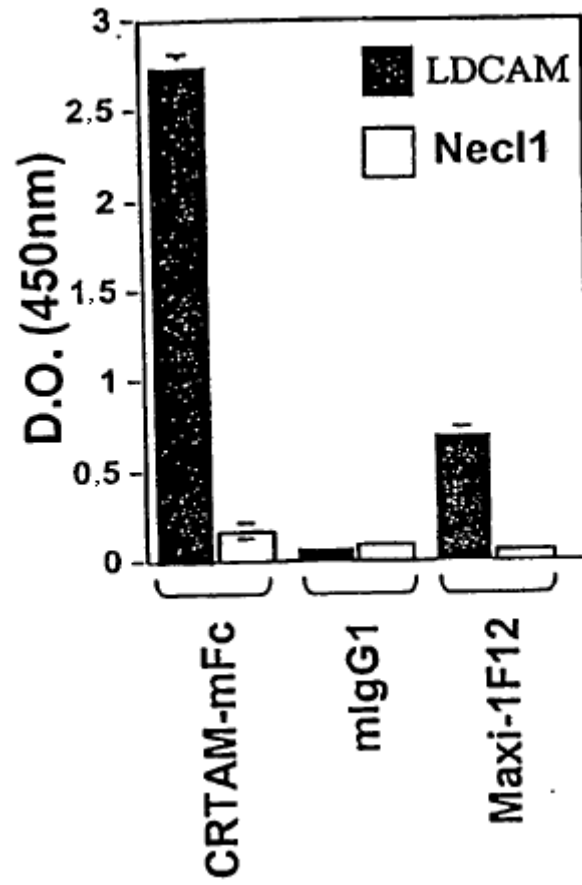
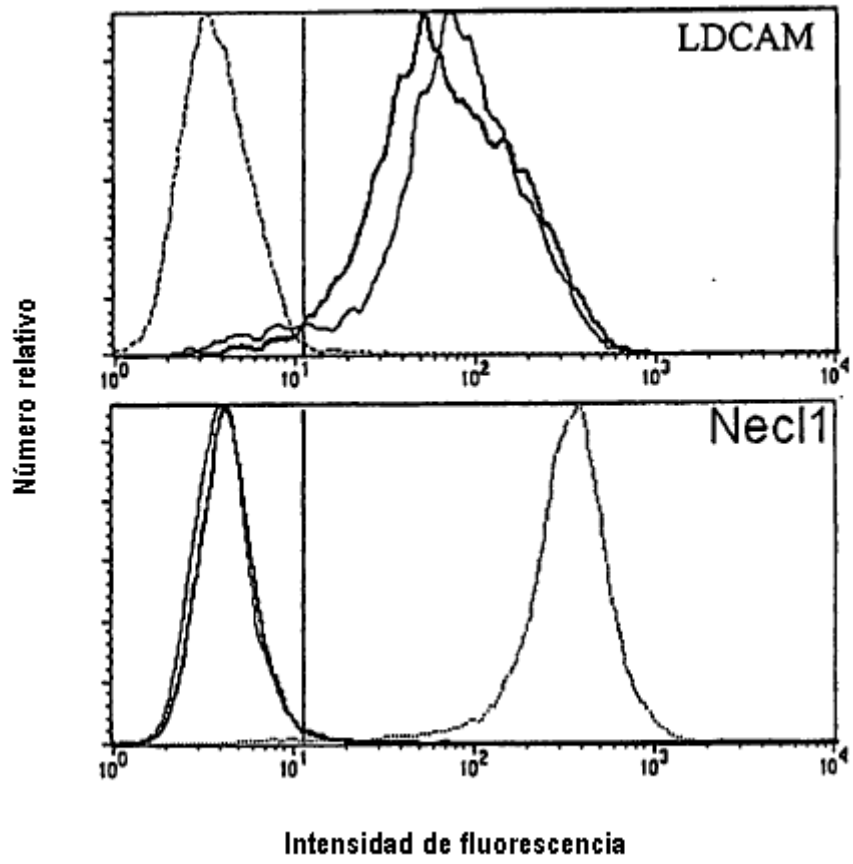


FIGURA 14



FIGURAS 15 A y 15B

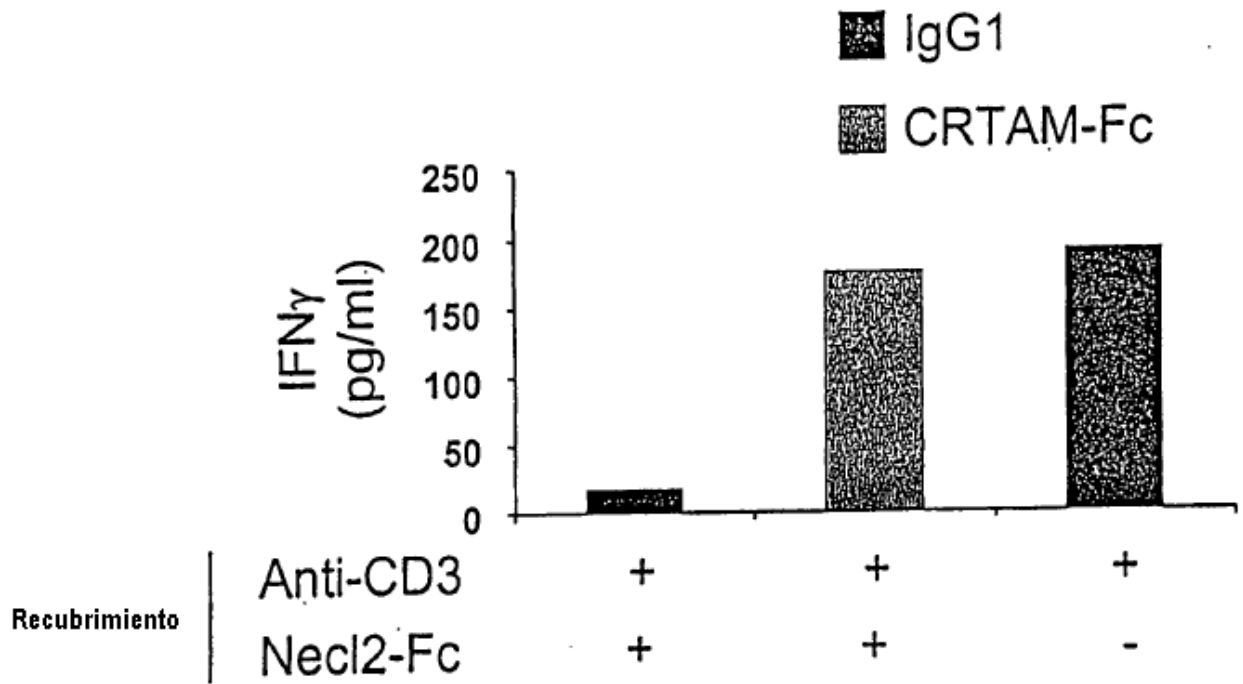


FIGURA 16

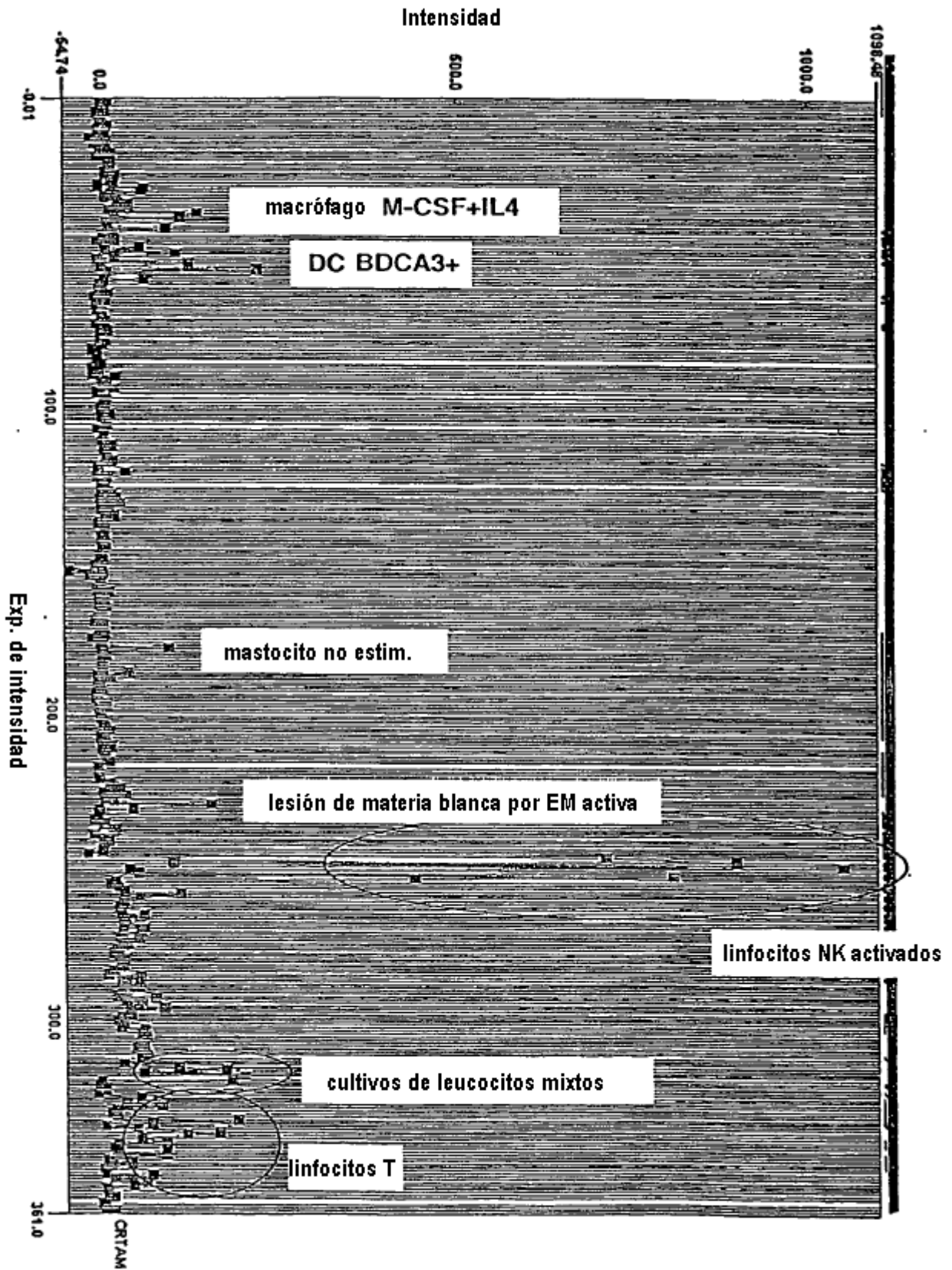


FIGURA 17