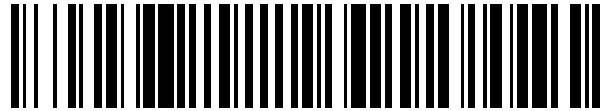


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 546**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2001 E 01950768 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1297135**

54 Título: **Moléculas PD-L2: nuevos ligandos de PD-1 y usos de Iso mismos**

30 Prioridad:

**28.06.2000 US 214563 P**

**23.02.2001 US 270822 P**

**23.02.2001 US 271114 P**

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

**06.05.2013**

73 Titular/es:

**GENETICS INSTITUTE, LLC (50.0%)  
87 CAMBRIDGE PARK DRIVE  
CAMBRIDGE, MA 02140, US y  
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**FREEMAN, GORDON;  
CHERNOVA, IRENE;  
CHERNOVA, TATYANA;  
MALENKOVICH, NELLY y  
WOOD, CLIVE**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 402 546 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

Moléculas PD-L2: nuevos ligandos de PD-1 y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

Con el fin de que las células T respondan a los polipéptidos foráneos, las células presentadoras de antígenos (APC) deben proporcionar dos señales a los linfocitos T en reposo (Jenkins M. y Schwartz R., J. Exp. Med. 165:302-319, 1987; Mueller D.L. *et al.*, J. Immunol. 144:3701-3709, 1990). La primera señal, que proporciona especificidad a la respuesta inmunológica, se transduce mediante el receptor de células T (RCT) tras el reconocimiento del péptido antigénico foráneo presentado en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La segunda señal, denominada coestimulación, induce las células T a proliferar y convertirse en funcionales (Lenschow *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 14:233, 1996). La coestimulación no es ni específica de antígeno ni restringida al CMH, y se cree que es proporcionada por una o más moléculas de superficie celular distintas expresadas por las APC (Jenkins M.K. *et al.*, J. Immunol. 140:3324-3330, 1988; Linsley P.S. *et al.*, J. Exp. Med. 173:721-730, 1991; Gimmi C.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579, 1991; Young J.W. *et al.*, J. Clin. Invest. 90:229-237, 1992; Koulova L. *et al.*, J. Exp. Med. 173:759-762, 1991; Reiser, H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:271-275, 1992; van-Seventer G.A. *et al.*, J. Immunol. 144:4579-4586, 1990; LaSalle J.M. *et al.*, J. Immunol. 147:774-80, 1991; Dustin M.I. *et al.*, J. Exp. Med. 169:503, 1989; Armitage R.J. *et al.*, Nature 357:80-82, 1992; Liu Y. *et al.*, J. Exp. Med. 175:437-445, 1992).

Las proteínas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), expresadas sobre las APC, son moléculas coestimuladoras críticas (Freeman *et al.*, J. Exp. Med. 174:625, 1991; Freeman *et al.*, J. Immunol. 143:2714, 1989; Azuma *et al.*, Nature 366:76, 1993; Freeman *et al.*, Science 262:909, 1993). B7-2 aparentemente desempeña un papel predominante durante las respuestas inmunológicas primarias, mientras que B7-1, que se encuentra regulada positivamente más tarde durante el curso de una respuesta inmunológica, podría resultar importante en la prolongación de las respuestas primarias de células T o en la coestimulación de las respuestas secundarias de células T (Bluestone, Immunity 2:555, 1995).

Un ligando al que se unen B7-1 y B7-2, CD28, se expresa constitutivamente sobre las células T en reposo, incrementándose su expresión tras la activación. Tras la señalización a través del receptor de células T, la ligación de CD28 y la transducción de una señal coestimuladora induce las células T a proliferar y secretar IL-2 (Linsley P.S. *et al.*, J. Exp. Med. 173:721-730, 1991; Gimmi C.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579, 1991; June, C.H. *et al.*, Immunol. Today 11:211-6; Harding, F.A. *et al.*, Nature 356:607-609, 1992). Un segundo ligando, denominado CTLA4 (CD152) es homólogo de CD28 pero no se expresa sobre las células T en reposo y aparece tras la activación de las células T (Brunet J.F. *et al.*, Nature 328:267-270, 1987). CTL4 aparentemente resulta crítico en la regulación negativa de las respuestas de células T (Waterhouse *et al.*, Science 270:985, 1995). Se ha encontrado que el bloqueo de CTLA4 elimina las señales de inhibición, mientras que la agregación de CTLA4 se ha encontrado que proporciona señales de inhibición que regulan negativamente las respuestas de células T (Allison y Krummel, Science 270:932, 1995). Las moléculas de B7 presentan una afinidad más elevada para CTLA4 que para CD28 (Linsley P.S. *et al.*, J. Exp. Med. 174:561-569, 1991), y se ha encontrado que GB7-1 y B7-2 se unen a regiones diferentes de la molécula de CTLA4 y que presentan diferentes cinéticas de unión a CTLA4 (Linsley *et al.*, Immunity 1:793, 1994). Se ha identificado una nueva molécula relacionada con CD28 y CTLA4, ICOS (Hutloff *et al.*, Nature 397:263, 1999; solicitud de patente WO n° 98/38216), al igual que su ligando, que es un nuevo miembro de la familia de B7 (Aicher A. *et al.*, J. Immunol. 164:4689-96, 2000; Mages H.W. *et al.*, Eur. J. Immunol. 30:1040-7, 2000; Brodie D. *et al.*, Curr. Biol. 10:333-6, 2000; Ling V. *et al.*, J. Immunol. 164:1653-7, 2000; Yoshinaga S.K. *et al.*, Nature 402:827-32, 1999). En el caso de que las células T sean estimuladas únicamente a través del receptor de células T, sin recibir ninguna señal coestimuladora adicional, se vuelven no sensibles, anérgicas, o mueren, resultando en la modulación negativa de la respuesta inmunológica.

Las células inmunológicas presentan receptores que transmiten señales de activación. Por ejemplo, las células T presentan receptores de células T y el complejo CD3; las células B presentan receptores de células B, y las células mieloides presentan receptores Fc. Además, las células inmunológicas portan receptores que transmiten señales que proporcionan señales coestimuladoras o receptores que transmiten señales que inhiben la señalización mediada por receptores. Por ejemplo, CD28 transmite una señal coestimuladora a las células T. Tras la ligación del receptor de células T, la ligación de CD28 resulta en una señal coestimuladora caracterizada por, por ejemplo, la regulación positiva de los receptores de IL-2 $\alpha$ , IL-2 $\beta$  e IL-2 $\gamma$ , la transcripción incrementada de ARN mensajero de IL-2 y la expresión incrementada de genes de citoquina (entre ellos IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF y TNF- $\alpha$ ). La transmisión de una señal coestimuladora permite que la célula avance en el ciclo celular y, de esta manera, se incrementa la proliferación de células T (Greenfield *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 18:389, 1998). La unión de un receptor sobre una célula T que transmite una señal coestimuladora a la célula (por ejemplo la ligación de un receptor coestimulador que conduce a la secreción y/o proliferación de citoquinas de la célula T) por un ligando coestimulador resulta en la coestimulación. De esta manera, la inhibición de una interacción entre un ligando coestimulador y un receptor que transmite una señal coestimuladora a células inmunológicas resulta en una modulación negativa de la respuesta inmunológica y/o en falta de sensibilidad específica, denominada anergia de células inmunológicas. La inhibición de

esta interacción puede conseguirse utilizando, por ejemplo, fragmentos Fab anti-CD28, anticuerpos contra moléculas de la familia de B7, o mediante la utilización de una forma soluble de un receptor al que pueda unirse un miembro de la familia de B7 a modo de inhibidor competitivo (por ejemplo CTLA4Ig).

5 Los receptores de inhibición que se unen a moléculas coestimuladoras también han sido identificados sobre las células inmunológicas. La activación de CTLA4, por ejemplo, transmite una señal negativa a una célula T. La unión de CTLA4 inhibe la producción de IL-2 y puede inducir la detención del ciclo celular (Krummel y Allison, J. Exp. Med. 183:2533, 1996). Además, los ratones que no presentan CTLA4 desarrollan enfermedad linfoproliferativa (Tivol *et al.*, Immunity 3:541, 1995; Waterhouse *et al.*, Science 270:985, 1995). El bloqueo de CTLA4 con anticuerpos puede  
10 eliminar una señal de inhibición, mientras que la agregación de CTLA4 con anticuerpos transmite una señal de inhibición. Por lo tanto, dependiendo del receptor al que se una una molécula coestimuladora (es decir, un receptor coestimulador tal como CD28 ó un receptor de inhibición tal como CTLA4), las moléculas de B7, entre ellas B7-4, pueden estimular la coestimulación o la inhibición de las células T.

15 PD-1 es un miembro de la familia de moléculas de inmunoglobulina (Ishida *et al.*, EMBO J. 11:3887, 1992; Shinohara *et al.*, Genomics 23:704, 1994). PD-1 ha sido identificado previamente utilizando un enfoque basado en la clonación por sustracción diseñada para identificar moduladores de muerte celular programada (Ishida *et al.*, EMBO J. 11:3887-95, 1992; Woronicz *et al.*, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 200:137, 1995). Se cree que PD-1 desempeña un papel en la regulación de la supervivencia de los linfocitos, por ejemplo durante la selección clonal (Honjo, Science 258:591, 1992; Agata *et al.*, Int. Immunology 8:765, 1996; Nishimura *et al.*, Int. Immunology 8:773, 1996). PD-1 presenta una región extracelular que contiene un dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas, un dominio transmembranal y una región intracelular que incluye un motivo inhibidor de inmunorreceptor con tirosina  
20 quinasa (ITIM) (Ishida *et al.*, *supra*, 1992; Shinohara *et al.*, *supra*, 1994; patente US nº 5.698.520). Esta característica también define una familia de mayor tamaño de moléculas, denominada de receptores inmunoinhibidores, que también incluye gp49B, PIR-B y los receptores inhibidores asesinos (KIR) (Vivier y Daeron, Immunology Today 18:286, 1997). Con frecuencia se supone que el motivo ITIM fosforilado en tirosinas de estos receptores interactúa con fosfatasa que contienen dominio SH2, lo que conduce a señales de inhibición. Un subconjunto de dichos receptores inmunoinhibidores se une a las moléculas de MHC, por ejemplo los KIR, y CTLA4 se une a B7-1 y B7-2. Se ha propuesto que existe una relación filogenética entre los genes MHC y B7 (Henry *et al.*,  
25 Immunology Today 20:285-288, 1999).

PD-1 también ha sido implicado como regulador de las respuestas de células B (Nishimura, Int. Immunology 10:1563, 1996). Al contrario que CTLA4, que se encuentra únicamente en las células T, PD-1 también se encuentra sobre las células B (en anti-IgM de respuesta) y sobre un subconjunto de timocitos y células mieloides (Agata *et al.*,  
30 *supra*, 1996; Nishimura *et al.*, Int. Immunology 8:773, 1996).

Se ha demostrado la importancia de la ruta coestimuladora de B7:CD28/CTLA4 *in vitro* y en varios sistemas modelo *in vivo*. El bloqueo de esta ruta coestimuladora resulta en el desarrollo de tolerancia específica de antígeno en sistemas murinos y humanos (Harding F.A. *et al.*, Nature 356:607-609, 1992; Lenschow D.J. *et al.*, Science 257:789-792, 1992; Turka L.A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11102-11105, 1992; Gimmi C.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6586-6590; Boussiotis V. *et al.*, J. Exp. Med. 178:1753-1763, 1993). A la inversa, la expresión de B7 por células tumorales murinas negativas en B7 induce inmunidad específica mediada por células T acompañada del rechazo tumoral y una protección de larga duración frente al reto tumoral (Chen L. *et al.*, Cell 71:1093-1102, 1992; Townsend S.E. y Allison J.P., Science 259:368-370, 1993; Baskar S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5687-5690, 1993). Por lo tanto, la manipulación de las rutas de coestimulación ofrece un gran potencial de estimulación o supresión de las respuestas inmunológicas en el ser humano.  
40  
45

### **Descripción resumida**

50 La invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de nuevas moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos codificados por dichas moléculas de ácidos nucleicos, denominadas en la presente memoria moléculas de ácidos nucleicos y de polipéptido PD-L2, las cuales son miembros de la familia de B7 y ligandos de PD-1. La interacción de PD-L2 con PD-1 transmite una señal negativa a las células inmunológicas, regulando negativamente las respuestas inmunológicas. Las moléculas PD-L2 preferentes se expresan sobre la superficie de células presentadoras de antígeno profesionales (por ejemplo linfocitos B, monocitos, células dendríticas y células de Langerhans) y otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos), regulan negativamente la activación de los linfocitos y/o se unen a anticuerpos que reconocen moléculas de PD-L2. Las moléculas PD-L2 de ácidos nucleicos y polipéptidos resultan útiles, por ejemplo, para modular la respuesta  
55 inmunológica. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un aspecto, la presente invención describe moléculas de ácidos nucleicos aisladas codificantes de polipéptidos PD-L2, así como fragmentos de ácidos nucleicos adecuados como cebadores o sondas de hibridación para la detección de ácidos nucleicos codificantes de PD-L2.  
60

Por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos PD-L2 de la invención es por lo menos aproximadamente 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de nucleótidos (por ejemplo a la longitud completa de la secuencia de nucleótidos) mostrada en SEQ ID NO: 1 ó nº 3, o a un complemento de la misma.

5 La molécula de ácidos nucleicos aislada puede incluir la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ó nº 3, o un complemento de la misma. La molécula de ácidos nucleicos puede incluir la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 3 y los nucleótidos 1 a 273 de SEQ ID NO: 1. La molécula de ácidos nucleicos puede incluir la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO: 3 y los nucleótidos 1096 a 1223 de SEQ ID NO: 1. La molécula de ácidos nucleicos puede consistir de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ó nº 3.

10 Una molécula de ácidos nucleicos PD-L2 puede incluir una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos suficientemente idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Una molécula de ácidos nucleicos PD-L2 puede incluir una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

15 Una molécula de ácidos nucleicos aislada puede codificar la secuencia de aminoácidos del PD-L2 humano. La molécula de ácidos nucleicos puede incluir una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2. La molécula de ácidos nucleicos puede presentar una longitud de por lo menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 ó más nucleótidos. La molécula de ácidos nucleicos puede presentar una longitud de por lo menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 ó más nucleótidos y codifica un polipéptido que presenta una actividad de PD-L2 (tal como se indica en la presente memoria).

20 La invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos, preferentemente moléculas de ácidos nucleicos PD-L2, que detectan específicamente moléculas de ácidos nucleicos PD-L2, frente a las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos no PD-L2. Por ejemplo, dicha molécula de ácidos nucleicos presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 880, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 ó más nucleótidos y se hibrida bajo condiciones restrictivas a una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, o a un complemento de la misma. En otro ejemplo, dicha molécula de ácidos nucleicos presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300 ó más nucleótidos y se hibrida bajo condiciones restrictivas a una molécula de ácidos nucleicos que comprende los nucleótidos 1 a 358 de SEQ ID NO: 1, o a un complemento de la misma. En un ejemplo adicional, dicha molécula de ácidos nucleicos presenta una longitud de por lo menos 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 ó más nucleótidos, incluye por lo menos 15 nucleótidos (es decir, 15 nucleótidos contiguos) de la secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 358 de SEQ ID NO: 1, o un complemento de la misma, y se hibrida bajo condiciones restrictivas a una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, o un complemento de la misma.

25 Las moléculas de ácidos nucleicos pueden presentar una longitud aproximada de 880 nucleótidos e hibridarse bajo condiciones restrictivas a la molécula de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 1 (es decir, a 880 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1) o a un complemento de la misma. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden presentar una longitud por lo menos de 15 nucleótidos e hibridarse bajo condiciones restrictivas a los nucleótidos 1 a 358 de la molécula de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 1 (es decir, a 15 nucleótidos contiguos de entre los nucleótidos 1 a 358 de SEQ ID NO: 1) o a un complemento de la misma. Las moléculas de ácidos nucleicos pueden presentar una longitud aproximada de 15 nucleótidos e incluyen por lo menos 15 nucleótidos (es decir, 15 nucleótidos contiguos) de la secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 358 de SEQ ID NO: 1 ó un complemento de la misma e hibridarse bajo condiciones restrictivas a una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ó a un complemento de la misma.

30 La molécula de ácidos nucleicos puede codificar una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, en la que la molécula de ácidos nucleicos se hibrida con un complemento de una molécula de ácidos nucleicos que comprende SEQ ID NO: 1 ó nº 3, o con un complemento de la misma, bajo condiciones restrictivas.

35 La invención describe una molécula de ácidos nucleicos aislada que es antisentido respecto a una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2, por ejemplo es antisentido respecto a la cadena codificante de una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2 tal como la mostrada en SEQ ID NO: 1 ó nº 3.

40 La invención describe un vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2. El vector puede ser un vector de expresión recombinante. La invención describe una célula huésped que contiene un vector de la invención. La invención describe una célula huésped que contiene una molécula de ácidos nucleicos. La invención describe además un método para producir un polipéptido, preferentemente un polipéptido PD-L2, mediante el cultivo en un

medio adecuado de una célula huésped, por ejemplo una célula huésped de mamífero, tal como una célula de mamífero no humano, que contiene un vector de expresión recombinante, de manera que se produce el polipéptido.

5 Otro aspecto de la presente invención proporciona polipéptidos PD-L2 aislados o recombinantes (por ejemplo proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos o partes de los mismos). Un polipéptido PD-L2 aislado puede incluir por lo menos uno o más de los dominios siguientes: un dominio de péptido de señal, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático.

10 Un polipéptido PD-L2 aislado puede incluir por lo menos uno o más de los dominios siguientes: un dominio de péptido de señal, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, y presenta una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Un polipéptido PD-L2 puede incluir por lo menos uno o más de los dominios siguientes: un dominio de péptido de señal, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, y presenta una actividad de PD-L2 (tal como se indica en la presente memoria).

20 Un polipéptido PD-L2 aislado puede incluir por lo menos uno o más de los dominios siguientes: un dominio de péptido de señal, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, y se encuentra codificado por una molécula de ácidos nucleicos que presenta una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones restrictivas de hibridación con un complemento de una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 ó nº 3.

25 La invención proporciona fragmentos o partes del polipéptido que presentan la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, en la que el fragmento comprende por lo menos 15 aminoácidos (es decir, aminoácidos contiguos) de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2. Un polipéptido PD-L2 puede comprender o consiste de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

30 La invención proporciona un polipéptido PD-L2 que se encuentra codificado por una molécula de ácidos nucleicos que consiste de una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior respecto a una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 ó nº 3, o a un complemento de la misma. La presente invención proporciona además un polipéptido PD-L2 codificado por una molécula de ácidos nucleicos que consiste de una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones restrictivas de hibridación con un complemento de una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 ó nº 3.

40 Los polipéptidos de la presente invención o partes de los mismos, por ejemplo partes biológicamente activas de los mismos, pueden ligarse operativamente a un polipéptido no PD-L2 (por ejemplo secuencias de aminoácidos heterólogas) para formar polipéptidos de fusión. La invención proporciona además anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales, que se unen específicamente a polipéptidos de la invención, preferentemente a polipéptidos PD-L2. Además, los polipéptidos PD-L2 (o partes biológicamente activas de los mismos) o moduladores de las moléculas PD-L2 pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas, que incluyen opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables.

45 En otro aspecto, la presente invención describe un método para detectar la presencia de una molécula de ácidos nucleicos, proteína o polipéptido de PD-L2 en una muestra biológica mediante la puesta en contacto de la misma con un agente capaz de detectar una molécula de ácidos nucleicos, proteína o polipéptido de PD-L2, de manera que la presencia de una molécula de ácidos nucleicos, proteína o polipéptido de PD-L2 se detecta en la muestra biológica.

50 En otro aspecto, la presente invención describe un método para detectar la presencia de actividad de PD-L2 en una muestra biológica mediante la puesta en contacto de la misma con un agente capaz de detectar un indicador de actividad de PD-L2, de manera que se detecta la presencia de actividad de PD-L2 en la muestra biológica.

55 En otro aspecto, la invención describe un método para modular la actividad de PD-L2, que comprende poner en contacto una célula capaz de expresar PD-L2, con un agente que modula la actividad de PD-L2, de manera que se modula la actividad de PD-L2 en la célula. Por ejemplo, el agente inhibe la actividad de PD-L2. En otro ejemplo, el agente puede estimular la actividad de PD-L2. El agente puede interferir o potenciar la interacción entre un polipéptido PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales; la pareja de unión es PD-1. El agente es una combinación de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido PD-L2 y un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido PD-L1. El agente incluye un péptido, peptidomimético u otra molécula pequeña que se une a un polipéptido PD-L2. El agente incluye otro ligando PD-1 que puede modular la interacción entre PD-L2 y PD-1. El agente puede modular la expresión de PD-L2 mediante la modulación de la transcripción de un gen PD-L2, la traducción de un ARNm de PD-L2 ó la modificación post-traducciona de un polipéptido PD-L2. El agente es una

molécula de ácidos nucleicos que presenta una secuencia de nucleótidos en orientación antisentido respecto a la cadena codificante de un ARNm de PD-L2 ó de un gen de PD-L2.

5 Los métodos de la presente invención se utilizan para tratar un sujeto que presenta un trastorno o condición caracterizado por la expresión o actividad aberrante, insuficiente o no deseada de polipéptido o ácido nucleico de PD-L2, mediante la administración de un agente que es un modulador de PD-L2 en el sujeto. El modulador de PD-L2 puede ser un polipéptido PD-L2. El modulador de PD-L2 puede ser una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2. El modulador de PD-L2 puede ser un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido PD-L2. El modulador de PD-L2 puede ser una combinación de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido PD-L2 y un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido PD-L1. El modulador de PD-L2 puede ser un péptido, peptidomimético u otra molécula pequeña. El trastorno o condición caracterizado por la expresión o actividad aberrante, insuficiente o no deseada de polipéptido o ácido nucleico de PD-L2 puede ser un trastorno o condición de la respuesta inmunológico que se beneficiaría de la modulación de la actividad de PD-L2. La invención describe además el tratamiento del sujeto con un agente adicional que modula una respuesta inmunológica.

15 La invención describe una vacuna que comprende un antígeno y un agente que reduce o inhibe la actividad de PD-L2. La vacuna inhibe la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales; la pareja de unión es PD-1.

20 La presente invención describe además ensayos diagnósticos para identificar la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por, como mínimo, uno de entre: (i) la modificación aberrante o mutación de un gen codificante de un polipéptido PD-L2, (ii) la regulación incorrecta del gen, e (iii) la modificación post-traduccionnal aberrante de un polipéptido PD-L2, en la que una forma de tipo salvaje del gen codifica un polipéptido con una actividad de PD-L2.

25 En otro aspecto, la invención describe métodos para identificar un compuesto que se une a un polipéptido PD-L2 ó que modula la actividad del mismo, al proporcionar una composición indicadora que comprende un polipéptido PD-L2 que presenta actividad de PD-L2, poner en contacto la composición indicadora con un compuesto de ensayo, y determinar el efecto del compuesto de ensayo sobre la actividad de PD-L2 en la composición indicadora, con el fin de identificar un compuesto que module la actividad de un polipéptido PD-L2.

30 Otro aspecto es un método para modular una respuesta inmunológica mediante la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L2.

35 En un aspecto, la realización proporciona un método para modular la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales sobre una célula inmunológica, que comprende poner en contacto una célula presentadora de antígeno que expresa PD-L2, con un agente seleccionado de entre el grupo que consiste de: una forma de PD-L2, una forma de PD-1, o un agente que modula la interacción de PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales, de manera que se modula la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales sobre una célula inmunológica. Un agente que modula la interacción de PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales (PD-1) puede ser una combinación de un anticuerpo que se une específicamente a PD-L2 y un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.

40 Por ejemplo, la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales se encuentra regulada positivamente. La interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales también puede encontrarse regulada negativamente.

45 Por ejemplo, el método comprende además poner en contacto la célula inmunológica o la célula presentadora de antígeno con un agente adicional que modula una respuesta inmunológica.

50 La etapa de puesta en contacto también puede llevarse a cabo *in vivo*.

La célula inmunológica puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: una célula T, una célula B y una célula mieloide.

55 En una realización, la pareja de unión de PD-L2 es PD-1.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inhibir la activación en una célula inmunológica mediante un mecanismo no apoptótico que comprende incrementar la actividad o la expresión de PD-L2 en una célula de manera que se inhibe la activación de la célula inmunológica.

60 En todavía otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna que comprende un antígeno y un agente que inhibe la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales.

En todavía otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna que comprende un antígeno y un agente que estimula

la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales.

En una realización, la pareja de unión de PD-L2 es PD-1.

5 Otro aspecto se refiere a un método para tratar un sujeto que presenta una condición que se beneficiaría de la regulación positiva de una respuesta inmunológica, que comprende administrar un agente que inhibe la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales sobre células del sujeto, de manera que se trata una condición que se beneficiaría de la regulación positiva de una respuesta inmunológica.

10 El agente puede comprender una combinación de un anticuerpo que se une específicamente a PD-L2 y un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.

El método puede comprender además la administración de un segundo agente que regula positivamente una respuesta inmunológica en el sujeto.

15 La condición puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: un tumor, una infección patogénica o una enfermedad inmunosupresora.

En otra realización, la pareja de unión de PD-L2 es PD-1.

20 En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar un sujeto que presenta una condición que se beneficiaría de la regulación negativa de una respuesta inmunológica, que comprende administrar un agente que estimula la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales sobre células del sujeto, de manera que se trata una condición que se beneficiaría de la regulación negativa de una respuesta inmunológica.

25 Por ejemplo, el agente comprende un anticuerpo o una molécula pequeña que estimula la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales.

30 El método puede comprender además la administración de un segundo agente que regula negativamente una respuesta inmunológica en el sujeto.

La condición puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: un trasplante, una alergia y un trastorno autoinmunológico.

35 En una realización, la pareja de unión de PD-L2 es PD-1.

En otro aspecto, la invención se refiere a un ensayo basado en células para el cribado de compuestos que modulan la actividad de PD-L2, que comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula diana PD-L2 con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de la molécula diana PD-L2.

40 En todavía otro aspecto, la invención se refiere a un ensayo sin células para el cribado de compuestos que modulan la unión de PD-L2 a una molécula diana, que comprende poner en contacto un polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de unirse al polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo.

45 La invención se refiere a un método para identificar un compuesto que modula la activación de las células T a una primera y a una segunda concentraciones de antígeno, que comprende poner en contacto una célula T que expresa una molécula diana PD-L2 con un compuesto diana a una primera concentración de antígeno, determinar la capacidad del compuesto de ensayo de modular la proliferación de células T o la producción de citoquinas a la primera concentración de antígeno, poner en contacto una célula T que expresa una molécula diana PD-L2 con el compuesto de ensayo a una segunda concentración de antígeno, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de modular la proliferación de las células T o la producción de citoquinas a la segunda concentración de antígeno, identificando de esta manera un compuesto que modula la activación de las células T a una primera y a una segunda concentraciones de antígeno.

En una realización, la molécula diana PD-L2 es PD-1.

#### **Breve descripción de los dibujos**

60 La figura 1 muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos predicha del PD-L2 humano. La secuencia de nucleótidos corresponde a los ácidos nucleicos 1 a 1.223 de SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos corresponde a los aminoácidos 1 a 273 de SEQ ID NO: 2. La región codificante sin las regiones 5' ó 3' no traducidas del gen PD-L2 humano se muestra en SEQ ID NO: 3.

La figura 2 muestra la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos del PD-L2 de ratón. La secuencia de nucleótidos corresponde a los ácidos nucleicos 1 a 1.655 de SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos corresponde a los aminoácidos 1 a 247 de SEQ ID NO: 5. La región codificante sin la región 5' ó 3' no traducida del gen PD-L2 humano se muestra en SEQ ID NO: 6.

5 La figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos PD-L2 humanos y de ratón (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5, respectivamente) e ilustra los dominios de péptido de señal, IgV, IgC, extracelular, transmembranal y citoplasmático. La figura 4 ilustra los resultados del análisis de FACS de la unión de IgG2a (Ig de control), ICOS-IgG y PD-1-Ig de control a células COS transfectadas con PD-L2 de ratón o con un ligando PD-1 de ratón de control.

10 La figura 5 ilustra una alineación de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos PD-L2 de ratón y humano (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 2, respectivamente). Se ilustran aminoácidos idénticos en las dos secuencias. La figura 6 ilustra una alineación de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos PD-L2 (SEQ ID NO: 5), PD-L2 humano (SEQ ID NO: 2), PD-L1 de ratón (SEQ ID NO: 11) y PD-L1 humano (SEQ ID NO: 12).

15 La figura 7 ilustra la unión de PD-1 a PD-L2. Las células CHO que expresan I-A<sup>d</sup> solo o I-A<sup>d</sup> y B7-2 no se transfectaron o se transfectaron establemente con PD-L2 de ratón. Las células se tiñeron con hPD-1-Ig y se tiñeron con anticuerpo de cabra anti-IgG2a de ratón-PE (línea gruesa). Las células CHO se tiñeron separadamente utilizando PE-anti-I-A<sup>d</sup> o PE-anti-B7-2 (línea gruesa). Las líneas delgadas indican tinción con anticuerpo monoclonal de control de isotipo. Se analizaron diez mil sucesos.

20 La figura 8 ilustra la inhibición de las respuestas mediadas por TCR mediante la interacción PD-L2-PD-1. Se estimularon células T purificadas procedentes de nódulos linfáticos de BALB/c a una proporción de perlas:células de 2:1 con perlas con tosilo recubiertas con Ig anti-CD3 + de control o anti-CD3 + mPD-L2-Ig. Se midió la proliferación tras 72 horas. Estos datos son representativos de más de ocho experimentos independientes.

25 La figura 9 ilustra la inhibición de las respuestas mediadas por TCR mediante la interacción PD-L2-PD-1. Se activaron esplenocitos de ratones transgénicos DO11.10 con péptido OVA (1 mg/ml). Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> y se dejaron en reposo durante la noche. Las células T previamente activadas (10<sup>5</sup>) se estimularon nuevamente con péptido (1 ó 0,1 mg/ml) presentado por células CHO-1-A<sup>d</sup> o CHO-I-A<sup>d</sup>-PD-L2 durante 48 horas. Se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina por triplicado. Se recogieron alícuotas de sobrenadantes 36 horas después del inicio de los cultivos y se midieron las citoquinas mediante ELISA. Estos datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

30 La figura 10 ilustra la inhibición de las respuestas mediadas por TCR y CD28 mediante la interacción PD-L2-PD-1. Se activaron esplenocitos de ratones transgénicos DO11.10 con péptido OVA (1 mg/ml) durante 4 días. Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> y se dejaron en reposo durante la noche. Las células T previamente activadas (10<sup>5</sup>) se estimularon nuevamente con concentraciones variables de péptido con los transfectantes de CHO indicados durante 48 horas. Se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina por triplicado. Estos datos son representativos de seis experimentos independientes.

35 La figura 11 ilustra la inhibición de las respuestas mediadas por TCR y CD28 mediante la interacción PD-L2-PD-1. Las células T previamente activadas (10<sup>5</sup>) se cultivaron con 0,01 mg/ml de péptido OVA presentado por los transfectantes de CHO. Se recogieron alícuotas de sobrenadantes 36 horas después del inicio de los cultivos y se midieron las citoquinas mediante ELISA. La línea discontinua indica la sensibilidad del ELISA.

40 La figura 12 ilustra la inhibición de las respuestas mediadas por TCR y CD28 mediante la interacción PD-L2-PD-1. Las células T previamente activadas (10<sup>5</sup>) se cultivaron con 0,1 mg/ml de péptido OVA presentado por los transfectantes de CHO. Se recogieron alícuotas de sobrenadantes 36 horas después del inicio de los cultivos y se midieron las citoquinas mediante ELISA. La línea discontinua indica la sensibilidad del ELISA.

45 La figura 13 ilustra la detención del ciclo celular y la apoptosis como resultado de la activación de la ruta de PD-L2-PD-1. Las células T previamente activadas se estimularon nuevamente con péptido OVA (1 mg/ml) y los transfectantes de CHO indicados. Las células se recogieron tras 36 horas de cultivo, se tiñeron con anti-CD4 y se fijaron en etanol al 70%. Las células se resuspendieron en solución de yoduro de propidio. Los perfiles de FACS son de tinción con yoduro de propidio de la población CD4<sup>+</sup>. Se indican las poblaciones subdiploides, diploides y superdiploides. Se recogieron diez mil sucesos y se analizaron a un caudal constante. Estos datos son representativos de tres experimentos independientes.

50 La figura 14 ilustra la detención del ciclo celular y la apoptosis como resultado de la activación de la ruta de PD-L2-PD-1. Las células T previamente activadas se estimularon nuevamente con péptido OVA (0,01 mg/ml) y los transfectantes de CHO indicados. Las células se recogieron tras 36 horas de cultivo, se tiñeron con anti-CD4 y se fijaron en etanol al 70%. Las células se resuspendieron en solución de yoduro de propidio. Los perfiles de FACS son de tinción con yoduro de propidio de la población CD4<sup>+</sup>. Se indican las poblaciones subdiploides, diploides y superdiploides. Se recogieron diez mil sucesos y se analizaron a un caudal constante. Estos datos son representativos de tres experimentos independientes.



La figura 15 ilustra el incremento de la proliferación de las células T en presencia de anticuerpo anti-PD-L1 ó anti-PD-L2. Se estimularon células T CD4<sup>+</sup> alogénicas en una reacción mixta de linfocitos con células dendríticas tratadas con IL-10.

5 La figura 16 ilustra el incremento de la proliferación de las células T en presencia de anticuerpos anti-PD-L1, anti-PD-L2 ó una combinación de anticuerpos anti-PD-L1 y anti-PD-L2. Se estimularon células T CD4<sup>+</sup> alogénicas en una reacción mixta de linfocitos con células dendríticas tratadas con IL-10.

### **Descripción detallada**

10 La invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6. Además de los antígenos de activación de linfocitos B previamente caracterizados, por ejemplo B7-1 y B7-2, existen otros antígenos sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (por ejemplo células B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos) que modulan la activación de las células B, las células T y otras células inmunológicas. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de nuevas moléculas, denominadas polipéptidos PD-L2 en la presente memoria, que se unen al receptor PD-1 y regulan negativamente la activación de dichas células inmunológicas y/o regulan negativamente las respuestas inmunológicas. Estas nuevas moléculas desempeñan un papel en la modulación de la respuesta inmunológica.

20 El descubrimiento de la presente invención de que PD-L2 se une a PD-1 sitúa a PD-L2 en una familia de ligandos inhibidores, y el análisis de secuencias sitúa a PD-L2 en la familia de B7. Aunque la unión de un "receptor coestimulante" resulta en una señal de coestimulación en una célula inmunológica, la unión de un receptor inhibidor, por ejemplo CTLA4 ó PD-1 (por ejemplo mediante entrecruzamiento o mediante agregación), conduce a la transmisión de una señal de inhibición en una célula inmunológica, resultando en la modulación negativa de las respuestas de células inmunológicas y/o en la anergia de las células inmunológicas. Aunque la transmisión de una señal de inhibición conduce a la modulación negativa de las respuestas de células inmunológicas (y una modulación negativa resultante de la respuesta inmunológica global), la prevención de una señal de inhibición (por ejemplo mediante la utilización de un anticuerpo no activador contra PD-1) en las células inmunológicas resulta en la modulación positiva de las respuestas de las células inmunológicas (y en la modulación positiva resultante de la respuesta inmunológica).

30 PD-L2 presenta homología con PD-L1, un ligando anteriormente descrito de PD-1 (ver la patente US copendiente nº 6.936.704, solicitud publicada de patente WO nº 01/14557; Dong H. *et al.*, Nat. Med. 5:1365-1369, 1999; y Freeman, G.J. *et al.*, J. Exp. Med. 192:1027-1034, 2000).

35 La solicitud de patente WO nº 01/14556 da a conocer un método para modular la respuesta inmunológica, que comprende administrar un anticuerpo que se une a un polipéptido B7-4 en un sujeto, de manera que se modula la respuesta inmunológica del sujeto.

40 La solicitud de patente WO nº 2001/039722 da a conocer un método para identificar un compuesto que inhibe una respuesta inmunológica, comprendiendo el método: (a) proporcionar un compuesto de ensayo, (b) cultivar, conjuntamente, el compuesto, el polipéptido B7-H1, una célula T y un estímulo activador de células T, y (c) determinar si el compuesto de ensayo inhibe la respuesta de la célula T a un estímulo, a modo de indicación de que el compuesto de ensayo inhibe una respuesta inmunológica.

45 La presente invención describe los agentes disponibles que resultan útiles para modular la actividad y/o la expresión de PD-L2; los agentes para modular la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales (por ejemplo PD-1) y los agentes para modular la respuesta inmunológica mediante modulación de la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales (por ejemplo PD-1). Los agentes moduladores ejemplares para la utilización en dichos métodos se describen en mayor detalle posteriormente.

### **Definiciones**

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula inmunológica" incluye las células que son de origen hematopoyético y que desempeñan un papel en la respuesta inmunológica. Entre las células inmunológicas se incluyen linfocitos tales como las células B y las células T, las células asesinas naturales y las células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula T" incluye las células T CD4<sup>+</sup> y las células T CD8<sup>+</sup>. La expresión "célula T" incluye además tanto células T ayudantes de tipo 1 como de tipo 2. La expresión "célula presentadora de antígeno" incluye las células presentadoras de antígeno profesionales (por ejemplo linfocitos B, monocitos, células dendríticas y células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "respuesta inmunológica" incluye respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o mediadas por células B que se ven influidas por la modulación de la coestimulación de las células T. Entre las respuestas inmunológicas ejemplares se incluyen las respuestas de células B (por ejemplo la producción de anticuerpos), las respuestas de células T (por ejemplo la producción de citoquinas y la citotoxicidad celular) y la activación de las células sensibles a citoquinas, por ejemplo macrófagos. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "modulación negativa" en referencia a las respuestas inmunológicas incluye una disminución de una o más respuestas inmunológicas cualesquiera, mientras que el término "modulación positiva" en referencia a las respuestas inmunológicas incluye un incremento de una o más respuestas inmunológicas cualesquiera. Se entenderá que la modulación positiva de un tipo de respuesta inmunológica puede conducir a una modulación negativa correspondiente de otro tipo de respuesta inmunológica. Por ejemplo, la modulación positiva de la producción de determinadas citoquinas (por ejemplo IL-10) puede conducir a la modulación negativa de las respuestas inmunológicas celulares.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "receptor de coestimulación" incluye receptores que transmiten una señal de coestimulación a una célula inmunológica, por ejemplo CD28 ó ICOS. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "receptor inhibidores" incluye receptores que transmiten una señal negativa a una célula inmunológica (por ejemplo CTLA4 ó PD-1).

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "coestimula" en referencia a células inmunológicas activadas incluye la capacidad de una molécula de coestimulación de proporcionar una segunda señal no activadora mediada por receptores (una "señal de coestimulación") que induce la proliferación o la función efectora. Por ejemplo, una señal de coestimulación puede resultar en la secreción de citoquinas, por ejemplo en una célula T que ha recibido una señal mediada por receptores de células T. Las células inmunológicas que han recibido una señal mediada por receptores celulares, por ejemplo mediante un receptor activador, se denominan en la presente memoria "células inmunológicas activadas".

30 Una señal de inhibición tal como resulta transducida por un receptor inhibidor puede producirse incluso en el caso de que no se encuentre presente un receptor de coestimulación (tal como CD28 ó ICOS) sobre la célula inmunológica y, de esta manera, no es simplemente una función de la competición entre los receptores inhibidores y los receptores de coestimulación para la unión a moléculas de coestimulación (Fallarino *et al.*, J. Exp. Med. 188: 205, 1998). La transmisión de una señal de inhibición a una célula inmunológica puede resultar en la falta de sensibilidad, la anergia o la muerte celular programada en la célula inmunológica. Preferentemente, la transmisión de una señal de inhibición opera mediante un mecanismo que no implica apoptosis. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "apoptosis" incluye la muerte celular programada, que puede caracterizarse utilizando técnicas que son conocidas de la técnica. La muerte celular apoptótica puede caracterizarse, por ejemplo, por el encogimiento celular, las evaginaciones esféricas de la membrana y la condensación de la cromatina, culminando en la fragmentación celular. Las células que experimentan apoptosis también muestran un patrón característico de corte del ADN internucleosómico.

40 Dependiendo de la forma de la molécula de PD-L2 que se une a un receptor, una señal puede transmitirse (por ejemplo por una forma multivalente de una molécula de PD-L2 que resulta en el entrecruzamiento del receptor o por una forma soluble de PD-L2 que se une a receptores Fc sobre las células presentadoras de antígeno) o inhibirse (por ejemplo por una forma monovalente soluble de una molécula de PD-L2 ó por una forma soluble de PD-L2 que se altera utilizando métodos conocidos de la técnica de manera que no se una a receptores Fc sobre las células presentadoras de antígeno), por ejemplo mediante la competición con formas activadoras de las moléculas de PD-L2 para la unión al receptor. Sin embargo, existen casos en los que una molécula soluble puede ser estimuladora. Los efectos de los diversos agentes moduladores pueden demostrarse fácilmente utilizando ensayos de cribado rutinarios tal como se describe en la presente memoria.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "receptor activador" incluye receptores de células inmunológicas que se unen a antígeno, antígeno acomplejado (por ejemplo en el contexto de moléculas del MHC) o anticuerpos. Entre dichos receptores activadores se incluyen los receptores de células T (RCT), los receptores de células B (RCB), los receptores de citoquina, los receptores de LPS, los receptores del complemento y los receptores de Fc.

60 Por ejemplo, los receptores de células T se encuentran presentes sobre las células T y se asocian a moléculas de CD3. Los receptores de células T resultan estimulados por antígenos en el contexto de las moléculas del CMH (así como por reactivos activadores de células T policlonales). La activación de las células T mediante los RCT resulta en numerosos cambios, por ejemplo en la fosforilación de las proteínas, cambios en los lípidos membranales, flujos iónicos, alteraciones de nucleótidos cíclicos, cambios en la transcripción del ARN, cambios en la síntesis de las proteínas y cambios en el volumen celular.

La expresión "receptor de células B" (RCB) tal como se utiliza en la presente memoria incluye el complejo entre la Ig

de membrana (Igm) y otros polipéptidos transmembranales (por ejemplo Iga e Igβ) presentes sobre las células B. La función de transducción de señales de la Igm es inducida por el entrecruzamiento de las moléculas de receptor con antígenos oligoméricos o multiméricos. Las células B también pueden ser activadas por anticuerpos antiinmunoglobulina. Tras la activación de los RCB, se producen numerosos cambios en las células B, incluyendo la fosforilación de las tirosinas.

La expresión "receptor de Fc" (FcR) incluye los receptores de superficie celular de la parte Fc de las moléculas de inmunoglobulina (Ig). Los receptores de Fc se encuentran sobre muchas células que participan en las respuestas inmunológicas. Entre los FcR humanos que se han identificado hasta el momento se encuentran aquellos que reconocen la IgG (denominado FcγR), IgE (FcεR1), IgA (FcαR) e IgM/A polimerizada (FcmaR). Los FcR se encuentran en los tipos celulares siguientes: FcεRI (mastocitos), FcεRII (muchos leucocitos), FcαR (neutrófilos) y FcmaR (epitelio glandular, hepatocitos) (Hogg, N., Immunol. Today 9:185-86, 1988). Los ampliamente estudiados FcγR son cruciales en las defensas inmunitarias celulares y son responsables de estimular la liberación de mediadores de inflamación y enzimas hidrolíticas que participan en la patogénesis de las enfermedades autoinmunitarias (Unkeless J.C., Annu. Rev. Immunol. 6:251-87, 1988). Los FcγR proporcionan un enlace crucial entre las células efectoras y los linfocitos que secretan Ig, ya que los FcγR de macrófagos/monocitos, de leucocitos polimorfonucleares y de células asesinas naturales (NK) proporcionan un elemento de reconocimiento específico mediado por IgG. Los leucocitos humanos presentan por lo menos tres receptores diferentes de IgG: hFcγRI (presente sobre monocitos/macrófagos), hFcγRII (sobre monocitos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, posiblemente células B, y la línea celular K562) y FcγRIII (sobre células NK, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos).

Con respecto a las células T, la transmisión de una señal de coestimulación a una célula T implica una ruta de señalización que no resulta inhibida por la ciclosporina A. Además, una señal de coestimulación puede inducir la secreción de citoquinas (por ejemplo IL-2 y/o IL-10) en una célula T y/o puede bloquear la inducción de falta de sensibilidad a antígenos, la inducción de anergia o la inducción de muerte celular de la célula T.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "señal de inhibición" se refiere a una señal transmitida mediante una molécula de receptor inhibidor (por ejemplo CTLA4 ó PD-1) sobre una célula inmunológica. Dicha señal antagoniza una señal mediante un receptor activador (por ejemplo mediante una molécula de RCT, CD3, RCB o Fc) y puede resultar en, por ejemplo, la inhibición de: la generación de segundo mensajero; la proliferación, o la función efectora en la célula inmunológica, por ejemplo una fagocitosis reducida, la producción de anticuerpos o citotoxicidad celular, o la incapacidad de la célula inmunológica de producir mediadores (tales como citoquinas (por ejemplo IL-2) y/o mediadores de respuestas alérgicas) o el desarrollo de anergia.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "falta de sensibilidad" incluye la refractividad de las células inmunológicas a la estimulación, por ejemplo la estimulación mediante un receptor de activación o una citoquina. La falta de sensibilidad puede producirse, por ejemplo, debido a la exposición a inmunosupresores o a dosis elevadas de antígenos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anergia" o "tolerancia" incluye la refractividad frente a la estimulación mediada por un receptor de activación. Dicha refractividad es generalmente específica de antígeno y persiste tras cesar la exposición al antígeno tolerizante. Por ejemplo, la anergia de las células T (y no la falta de sensibilidad) se caracteriza por una falta de producción de citoquinas, por ejemplo de IL-2. La anergia de las células T se produce al exponerlas a un antígeno y recibir una primera señal (un receptor de células T o una señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal de coestimulación). Bajo estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (aunque la reexposición se produzca en presencia de una molécula coestimuladora) resulta en la falta de producción de citoquinas y, de esta manera, en la no proliferación. Sin embargo, las células T anérgicas montan respuestas frente a antígenos no relacionados y pueden proliferar si se cultivan con citoquinas (por ejemplo IL-2). Por ejemplo, la anergia de células T también puede observarse en la falta de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T medida mediante ELISA o mediante un ensayo de proliferación utilizando una línea celular indicadora. Alternativamente puede utilizarse un constructo de gen informador. Por ejemplo, las células T anérgicas no consiguen iniciar la transcripción del gen IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del intensificador del gen IL-2 5' ó de un multímero de la secuencia AP1 que puede encontrarse dentro del intensificador (Kang *et al.*, Science 257:1134, 1992).

La modulación de una señal de coestimulación resulta en la modulación de la función efectora de una célula inmunológica. De esta manera, la expresión "actividad de PD-L2" incluye la capacidad de un polipéptido PD-L2 de unirse a su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1; la capacidad de modular las señales de coestimulación o de inhibición de las células inmunológicas, y la capacidad de modular la respuesta inmunológica.

Con respecto a PD-1, el término "actividad" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de modular una señal de inhibición en una célula inmunológica activada, por ejemplo uniéndose a un ligando natural sobre una célula presentadora de antígeno. PD-1 transmite una señal de inhibición a una célula inmunológica de una manera similar a CTLA4. La modulación de una señal de inhibición en una célula inmunológica resulta en la modulación de la proliferación de células inmunológicas y/o de la secreción de citoquinas por parte de las mismas. PD-1 también puede modular una señal de coestimulación mediante competición con un receptor de coestimulación para la unión

de su ligando o ligandos naturales. De esta manera, la expresión "actividad de PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de unirse a su ligando o ligandos naturales, la capacidad de modular las señales de coestimulación o de inhibición de las células inmunológicas, y la capacidad de modular la respuesta inmunológica.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácidos nucleicos "natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que presenta una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza (por ejemplo que codifica una proteína natural).

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácidos nucleicos "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "de sentido" codificante de una proteína, por ejemplo complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc de doble cadena, complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la cadena codificante de un gen. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una molécula de ácidos nucleicos antisentido puede establecer enlaces de hidrógeno con una molécula de ácidos nucleicos de sentido.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región codificante" se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que comprenden codones que se traducen en residuos aminoácidos, mientras que la expresión "región no codificante" se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo regiones 5' y 3' no traducidas).

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de transportar otra molécula de ácidos nucleicos a la que ha sido unida. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico.

25 Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo vectores bacterianos que presentan un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped al introducirse en la célula huésped, y de esta manera se replican conjuntamente con el genoma del huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se encuentran

30 ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante", o simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia se encuentran en forma de plásmido. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como

35 vectores víricos (por ejemplo retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectivos en la replicación), que proporcionan funciones equivalentes.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula huésped" pretende referirse a una célula en la que se ha introducido una molécula de ácidos nucleicos, tal como un vector de expresión recombinante. Las expresiones "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se utilizan intercambiamente en la presente memoria. Debe entenderse que dichas expresiones se refieren no sólo a la célula sujeto particular, sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie podría no ser, de hecho, idéntica a la célula parental; sin embargo, todavía se encuentra incluida dentro del alcance de la expresión tal como se utiliza en la presente

45 memoria.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal transgénico" se refiere a un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que una o más de las células del animal incluyen un "transgén". El término "transgén" se refiere a ADN exógeno que se integra en el genoma de una célula a partir del que se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, por ejemplo dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del animal transgénico.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal recombinante homólogo" se refiere a un tipo de animal no humano transgénico, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que un gen endógeno ha sido alterado mediante recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida en una célula del animal, por ejemplo una célula embrionaria del animal, previamente al desarrollo del mismo.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "proteína aislada" se refiere a una proteína que se encuentra sustancialmente libre de otras proteínas, material celular y medio de cultivo al aislar a partir de células o producida mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros compuestos químicos en el caso de que se sintetice químicamente.

Una proteína "aislada" o "purificada" o parte biológicamente activa de la misma se encuentra sustancialmente libre

de material celular o de otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular de la que se ha derivado la proteína PD-L2, o se encuentra sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos en el caso de que se sintetice químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína PD-L2 en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las que se ha aislado o producido recombinantemente. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína PD-L2 que presentan menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteína no PD-L2 (también denominada en la presente memoria "proteínas contaminantes"), más preferentemente menos de aproximadamente 20% de proteína no PD-L2, todavía más preferentemente menos de aproximadamente 10% de proteína no PD-L2, y todavía más preferentemente menos de aproximadamente 5% de proteína no PD-L2. En el caso de que la proteína PD-L2 ó parte biológicamente activa de la misma se produzca recombinantemente, también preferentemente se encuentra sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferentemente menos de aproximadamente 10%, y todavía más preferentemente menos de aproximadamente 5%, del volumen de la preparación de proteína.

La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos" incluye preparaciones de proteína PD-L2 en las que la proteína se separa de los precursores químicos o de otros compuestos químicos que participan en la síntesis de la proteína. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos" incluye preparaciones de proteína PD-L2 que presentan menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2, más preferentemente menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2, todavía más preferentemente menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2, y todavía más preferentemente menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye una "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente una "parte de anticuerpo"), así como moléculas de anticuerpo completo. La expresión "parte de unión a antígeno", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo PD-L2). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1, (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), que consiste de un dominio VH, y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se encuentran codificados en genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, con un conector sintético que permite formar una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan formando moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988) y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; y Osbourn *et al.*, Nat. Biotechnol. 16:778, 1998). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que se encuentren comprendidos dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Cualesquiera secuencias de VH y de VL de scFv específicos pueden unirse a ADNc de región constante de inmunoglobulina humana o a secuencias genómicas, con el fin de generar vectores de expresión codificantes de moléculas de IgG o de otros isotipos completas. También puede utilizarse VH y VI en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de inmunoglobulinas utilizando reacciones con proteínas o tecnología de ADN recombinante. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos, también se encuentran comprendidas. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, aunque utilizando un conector que es excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (ver, por ejemplo, Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993; Poljak R.J. *et al.*, Structure 2:1121-1123, 1994).

Todavía más, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmuno adhesión de mayor tamaño forando mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra u otras proteínas o péptidos. Entre los ejemplos de dichas moléculas de inmuno adhesión se incluyen la utilización de la región núcleo de estreptavidina para generar una molécula tetramérica de scFv (Kipriyanov S.M. *et al.*, Hum. Antibodies Hybridomas 6:93-101, 1995) y la utilización de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta polihistidina C-terminal para generar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov S.M. *et al.*, Mol. Immunol. 31:1047-1058, 1994). Pueden prepararse partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>, a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o con pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, pueden obtenerse anticuerpos, partes de anticuerpos y moléculas de inmuno adhesión utilizando técnicas de ADN recombinante

estándares, tal como se indica en la presente memoria.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos o singénicos, o formas modificadas de los mismos, por ejemplo humanizados, quiméricos, etc. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen específicamente, o de manera sustancialmente específica, a moléculas de PD-L2. Las expresiones "anticuerpos monoclonales" y "composición de anticuerpos monoclonales", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contiene una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de un antígeno, mientras que la expresión "anticuerpos policlonales" y "composición de anticuerpos policlonales" se refiere a una población de moléculas de anticuerpos que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpos monoclonales típicamente muestra una única afinidad de unión para un antígeno particular con el que reacciona inmunológicamente.

La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos generados por una célula no humana que presentan regiones variables y constantes que han sido alteradas para que resulten más estrechamente similares a las generadas por una célula humana. Por ejemplo, mediante alteración de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano para incorporar aminoácidos presentes en secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la invención pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR. La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza en la presente memoria, también incluye anticuerpos en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de marco humanas.

Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a un anticuerpo que se encuentra sustancialmente libre de otros anticuerpos que presentan diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-L2 se encuentra sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de PD-L2). Además, un anticuerpo aislado puede encontrarse sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o compuestos químicos.

#### 30 Moléculas de ácidos nucleicos y polipeptídicas de PD-L2

El término "familia" en referencia a moléculas polipeptídicas y de ácidos nucleicos pretende referirse a dos o más moléculas polipeptídicas o de ácidos nucleicos que presentan un dominio o motivo estructural común y que presentan suficiente homología de secuencias de aminoácidos o nucleótidos según se define en la presente memoria. Dichos miembros de familia pueden ser de origen natural o no y pueden proceder de la misma especie o de especies diferentes. Por ejemplo, una familia puede contener un primer polipéptido de origen humano, así como otros polipéptidos diferentes de origen humano, o alternativamente, puede contener homólogos de origen no humano, por ejemplo polipéptidos de mono. Los miembros de una familia también pueden presentar características funcionales comunes.

Por ejemplo, la familia de polipéptidos PD-L2 de la presente invención preferentemente comprenden por lo menos un "dominio de péptido de señal". Tal como se utiliza en la presente memoria, una "secuencia de señal" o "péptido de señal" incluye un péptido que contiene aproximadamente 15 ó más aminoácidos presentes en el extremo N-terminal de polipéptidos secretorios y unidos a membrana y que contiene un gran número de residuos aminoácidos hidrofóbicos. Por ejemplo, una secuencia de señal contiene por lo menos aproximadamente 10 a 30 residuos aminoácidos, preferentemente 15 a 25 residuos aminoácidos aproximadamente, más preferentemente 18 a 20 residuos aminoácidos aproximadamente, y todavía más preferentemente 19 residuos aminoácidos aproximadamente, y presenta por lo menos aproximadamente 35% a 65%, preferentemente 38% a 50% aproximadamente, y más preferentemente 40% a 45% aproximadamente de residuos aminoácidos hidrofóbicos (por ejemplo valina, leucina, isoleucina o fenilalanina). Dicha "secuencia de señal" también denominada en la técnica "péptido de señal", sirve para dirigir un polipéptido que contiene dicha secuencia a una bicapa lipídica, y resulta cortado, formando polipéptidos secretados y unidos a membrana. Se ha identificado una secuencia de señal en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 humano nativo en aproximadamente los aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 2 (figura 3). También se ha identificado una secuencia de señal en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo de ratón en aproximadamente los aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 5 (figura 3).

Puede identificarse un polipéptido PD-L2 basándose en la presencia de un "dominio transmembranal". Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio transmembranal" incluye una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 15 residuos aminoácidos de longitud que abarca la membrana plasmática. Más preferentemente, un dominio transmembranal incluye aproximadamente por lo menos 20, 25, 30, 35, 40 ó 45 residuos aminoácidos y abarca la membrana plasmática. Los dominios transmembranales son ricos en residuos hidrofóbicos y típicamente presentan una estructura  $\alpha$ -helicoidal. Por ejemplo, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de los aminoácidos de un dominio transmembranal son hidrofóbicos, por ejemplo leucinas, isoleucinas, tirosinas o

- triptófano. Los dominios transmembranales se describen en, por ejemplo, Zagotta W.N. *et al.*, Annu. Rev. Neurosci. 19:235-263, 1996. Los residuos aminoácidos 220 a 243 del polipéptido PD-L2 nativo humano y los residuos aminoácidos 201 a 243 del polipéptido maduro predicho se predice que comprenden dominios transmembranales (ver la figura 3). Los residuos aminoácidos 220 a 242 del polipéptido PD-L2 nativo de ratón y los residuos aminoácidos 201 a 223 del polipéptido maduro predicho se predice que comprenden dominios transmembranales (ver la figura 3). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los polipéptidos PD-L2 que presentan una homología de por lo menos 71% a 80%, o más preferentemente de aproximadamente 80% a 90%, con un dominio transmembranal del PD-L2 humano se encuentran comprendidos dentro del alcance descrito.
- Una molécula de PD-L2 de la presente invención puede identificarse basándose en la presencia de un "dominio IgC" o de un "dominio IgV" en el polipéptido o molécula de ácidos nucleicos correspondiente. Tal como se utiliza en la presente memoria, los dominios IgV e IgC son reconocidos en la técnica como dominios miembros de la superfamilia de Ig. Estos dominios corresponden a unidades estructurales que presentan patrones de plegamiento claros denominados pliegues de Ig. Los pliegues de Ig comprenden un sándwich de dos láminas $\beta$ , consistiendo cada una de cadenas  $\beta$  antiparalelas de 5 a 10 aminoácidos con un enlace disulfuro conservado entre las dos láminas en la mayoría, aunque no en todos, los dominios. Los dominios IgC de las moléculas de Ig, RCT y CMH comparten los mismos tipos de patrón de secuencias y se denominan conjunto C1 dentro de la superfamilia de Ig. Otros dominios IgC se encuentran comprendidos dentro de otros conjuntos. Los dominios IgV también comparten patrones de secuencias y se denominan dominios de conjunto V. Los dominios IgV son más largos que los dominios C y forman una pareja adicional de cadenas  $\beta$ . Los residuos aminoácidos 20 a 120 del polipéptido PD-L2 nativo humano y los residuos aminoácidos 1 a 101 del polipéptido maduro predicho se predice que comprenden dominios IgV (ver la figura 3). Los residuos aminoácidos 20 a 120 del polipéptido PD-L2 nativo de ratón y los residuos aminoácidos 1 a 101 del polipéptido maduro predicho también se predice que comprenden dominios IgV (ver la figura 3). Los residuos aminoácidos 121 a 219 del polipéptido PD-L2 nativo humano y los residuos aminoácidos 102 a 200 del polipéptido maduro predicho se predice que comprenden dominios IgC (ver la figura 3). Los residuos aminoácidos 121 a 219 del polipéptido PD-L2 nativo de ratón y los residuos aminoácidos 102 a 200 del polipéptido maduro predicho se predice que comprenden dominios IgC (ver la figura 3). Puede interrogarse la presencia de un dominio IgV para la unión de PD-L2 a su pareja de unión natural, por ejemplo PD-1.
- También puede identificarse una molécula de PD-L2 de la presente invención basándose en la presencia de un "dominio extracelular" en el polipéptido o molécula de ácidos nucleicos correspondiente. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio extracelular" representa los aminoácidos N-terminales que se extienden como una cola desde la superficie de una célula. Un dominio extracelular de la presente invención incluye un dominio IgV y un dominio IgC, y puede incluir un dominio de péptido de señal. Los residuos aminoácidos 1 a 219 del polipéptido PD-L2 nativo humano y los residuos aminoácidos 1 a 200 del polipéptido maduro predicho se predice que comprenden dominios extracelulares (ver la figura 3). Los residuos aminoácidos 1 a 219 del polipéptido PD-L2 nativo de ratón y los residuos aminoácidos 1 a 200 del polipéptido maduro predicho también se predice que comprenden dominios extracelulares (ver la figura 3).
- También puede identificarse una molécula de PD-L2 de la presente invención basándose en la presencia de un "dominio citoplasmático" en el polipéptido o molécula de ácidos nucleicos correspondiente. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio citoplasmático" representa los aminoácidos C-terminales que se extienden como una cola desde la superficie de la célula. Los residuos aminoácidos 244 a 273 del polipéptido PD-L2 nativo humano y los residuos aminoácidos 225 a 273 del polipéptido maduro predicho se predice que comprenden dominios citoplasmáticos (ver la figura 3). Los residuos aminoácidos 243 a 247 del polipéptido PD-L2 nativo de ratón y los residuos aminoácidos 224 a 228 del polipéptido maduro predicho también se predice que comprenden dominios citoplasmáticos.
- Las moléculas de PD-L2 de la invención pueden incluir por lo menos uno o más de los dominios siguientes: un dominio de péptido de señal, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático.
- Los polipéptidos aislados, preferentemente los polipéptidos PD-L2, presentan una secuencia de aminoácidos suficientemente idéntica a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 ó se encuentran codificados por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a SEQ ID NO: 1 ó nº 3. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "suficientemente idéntica" se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene un número suficiente o mínimo de residuos aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar) a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos, de manera que la primera y segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos compartan dominios o motivos estructurales y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos que comparten dominios estructurales comunes y que presentan una homología de por lo menos 30%, 40% ó 50%, preferentemente de 60%, más preferentemente de entre 70% y 80%, y todavía más preferentemente de entre 90% y 95%, en las secuencias de aminoácidos de los dominios y que contienen por lo menos un, y preferentemente dos, dominios o motivos estructurales, se definen en la presente memoria como

suficientemente idénticas. Además, las secuencias de aminoácidos o nucleótidos que comparten una homología de por lo menos 30%, 40% ó 50%, preferentemente 60%, más preferentemente de entre 70% y 80%, o de entre 90% y 95%, y que comparten una actividad funcional común, se definen en la presente memoria como suficientemente idénticas.

5 Tal como se utilizan intercambiamente en la presente memoria, las expresiones "actividad de PD-L2", "actividad biológica de PD-L2" o "actividad funcional de PD-L2" se refieren a una actividad ejercida por una proteína, polipéptido o molécula de ácidos nucleicos de PD-L2 sobre una célula o tejido sensible a PD-L2, o sobre una pareja de unión a polipéptido PD-L2, determinada *in vivo* o *in vitro*, según técnicas estándares. En una realización, una actividad de PD-L2 es una actividad directa, tal como una asociación con una pareja de unión a PD-L2. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "molécula diana" o "pareja de unión" es una molécula con la que se une o con la que interactúa un polipéptido PD-L2 en la naturaleza, de manera que se consigue una función mediada por PD-L2. En una realización ejemplar, una molécula diana de PD-L2 es el receptor PD-1. Alternativamente, una actividad de PD-L2 es una actividad indirecta, tal como una actividad de señalización celular mediada por la interacción del polipéptido PD-L2 con su pareja de unión natural, por ejemplo PD-1. Las actividades biológicas de PD-L2 se describen en la presente memoria. Por ejemplo, los polipéptidos PD-L2 pueden presentar una o más de las actividades siguientes: 1) unirse y/o modular la actividad del receptor PD-1 o de otras parejas de unión naturales de PD-L2, 2) modular la señalización intracelular o intercelular, 3) modular la activación de las células inmunológicas, por ejemplo los linfocitos T, y 4) modular la respuesta inmunológica de un organismo, por ejemplo un organismo de ratón o humano.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la invención proporciona proteínas y polipéptidos PD-L2 aislados que presentan una actividad de PD-L2. Otros polipéptidos preferentes son los polipéptidos PD-L2 que presentan uno o más de los dominios siguientes: un dominio de péptido de señal, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, y preferentemente, una actividad de PD-L2.

Los polipéptidos PD-L2 preferentes adicionales presentan por lo menos un dominio extracelular, y uno o más de entre un dominio de péptido de señal, un dominio IgV, un dominio IgC, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, y preferentemente se encuentran codificados por una molécula de ácidos nucleicos que presenta una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones restrictivas de hibridación con una molécula de ácidos nucleicos que comprende un complemento de una secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1, n° 3, n° 4 ó n° 6.

La secuencia de nucleótidos del ADNc del PD-L2 humano aislado y la secuencia de aminoácidos predicha del polipéptido PD-L2 humano se muestran en la figura 1 y en SEQ ID NO: 1 y n° 2, respectivamente. La secuencia de nucleótidos del ADNc del PD-L2 aislado de ratón y la secuencia de aminoácidos del polipéptido PD-L2 de ratón se muestran en la figura 2 y en SEQ ID NO: 4 y n° 5, respectivamente.

El gen PD-L2 humano, que presenta una longitud aproximada de 1.223 nucleótidos, codifica un polipéptido que presenta un peso molecular de aproximadamente 30,0 kD y presenta una longitud aproximada de 273 residuos aminoácidos. El gen PD-L2 de ratón, que presenta una longitud aproximada de 1.655 nucleótidos, codifica un polipéptido que presenta un peso molecular de aproximadamente 27,2 kD y presenta una longitud aproximada de 247 residuos aminoácidos.

Diversos aspectos de la invención se describen en mayor detalle en las subsecciones siguientes:

#### 45 I. Moléculas de ácidos nucleicos aisladas

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican polipéptidos PD-L2 o partes biológicamente activas de los mismos, así como fragmentos de ácidos nucleicos suficientes para la utilización como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácidos nucleicos codificantes de PD-L2 (por ejemplo ARNm de PD-L2) y fragmentos para la utilización como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molécula de ácidos nucleicos" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo ARNm) y análogos del ADN o ARN generado utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácidos nucleicos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, pero preferentemente es de ADN de doble cadena.

La expresión "molécula de ácidos nucleicos aislada" incluye moléculas de ácidos nucleicos que se separan de otras moléculas de ácidos nucleicos que se encuentran presentes en la fuente natural de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislado" incluye moléculas de ácidos nucleicos que se separan del cromosoma con el que se encuentra naturalmente asociado el ADN genómico. Preferentemente, una molécula de ácidos nucleicos "aislada" no presenta secuencias que flanquean en su estado natural el ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremo 5' y 3' de la molécula de ácidos nucleicos) en el ADN genómico del organismo del que se ha derivado el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversos aspectos, la molécula aislada de ácidos nucleicos de PD-L2 puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ó 0,1 kb de secuencias de



nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácidos nucleicos en el ADN genómico de la célula de la que se deriva la molécula de ácidos nucleicos. Además, una molécula de ácidos nucleicos "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede encontrarse sustancialmente libre de otro material celular, o de medio de cultivo, al producirla mediante técnicas recombinante, o sustancialmente libre de precursores químicos o de otros compuestos químicos en el caso de que se sintetice químicamente.

Una molécula de ácidos nucleicos de la presente invención, por ejemplo una molécula de ácidos nucleicos que presenta la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, o una parte de la misma, puede aislarse utilizando técnicas estándares de biología molecular y la información de secuencia proporcionada en la presente memoria. Utilizando la totalidad o una parte de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 como sonda de hibridación, pueden aislarse moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2 utilizando técnicas estándares de hibridación y clonación (por ejemplo tal como se describe en Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Además, puede aislarse una molécula de ácidos nucleicos que comprenda la totalidad o una parte de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores oligonucleótidos sintéticos diseñados basándose en la secuencia de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6.

Una molécula de ácidos nucleicos de la invención puede amplificarse utilizando ADNc, ARNm o, alternativamente, ADN genómico, a modo de molde, y cebadores oligonucleótidos apropiados según las técnicas estándares de amplificación por PCR. La molécula de ácidos nucleicos amplificada de esta manera puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de secuencias de ADN. Además, pueden prepararse oligonucleótidos correspondientes a secuencias de nucleótidos de PD-L2 mediante técnicas sintéticas estándares, por ejemplo utilizando un sintetizador automático de ADN.

Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención puede comprender la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6. Este ADNc puede comprender secuencias codificantes del polipéptido PD-L2 humano (es decir, la "región codificante", entre los nucleótidos 274 y 1.092), así como secuencias 5' no traducidas (nucleótidos 1 a 273) y secuencias 3' no traducidas (nucleótidos 1.093 a 1.223) de SEQ ID NO: 1. Alternativamente, la molécula de ácidos nucleicos puede comprender únicamente la región codificante de SEQ ID NO: 1 (es decir, los nucleótidos 274 a 1.092, correspondiente a SEQ ID NO: 3). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención puede comprender SEQ ID NO: 3 y los nucleótidos 1 a 274 de SEQ ID NO: 1. La molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender SEQ ID NO: 3 y los nucleótidos 1.096 a 1.223 de SEQ ID NO: 1. La molécula de ácidos nucleicos puede consistir de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ó nº 3. La molécula de ácidos nucleicos puede comprender la región codificante de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo los nucleótidos 274 a 1.092, correspondiente a SEQ ID NO: 3), así como un codón de parada (por ejemplo los nucleótidos 1.093 a 1.095 de SEQ ID NO: 1).

Este ADNc también puede comprender secuencias codificantes del polipéptido PD-L2 de ratón (es decir, la región codificante, entre los nucleótidos 210 y 950), así como secuencias 5' no traducidas (nucleótidos 1 a 209) y secuencias 3' no traducidas (nucleótidos 951 a 1.655) de SEQ ID NO: 4. Alternativamente, la molécula de ácidos nucleicos puede comprender únicamente la región codificante de SEQ ID NO: 4 (es decir, los nucleótidos 210 a 950, correspondiente a SEQ ID NO: 6). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender SEQ ID NO: 6 y los nucleótidos 1 a 210 de SEQ ID NO: 4. La molécula de ácidos nucleicos aislada puede comprender SEQ ID NO: 6 y los nucleótidos 951 a 1.655 de SEQ ID NO: 4. La molécula de ácidos nucleicos puede consistir de la secuencia de nucleótidos indicada como SEQ ID NO: 4 ó SEQ ID NO: 6. La molécula de ácidos nucleicos puede comprender la región codificante de SEQ ID NO: 4 (por ejemplo los nucleótidos 210 a 950, correspondientes a SEQ ID NO: 4), así como un codón de parada (por ejemplo los nucleótidos 951 a 953 de SEQ ID NO: 4).

Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención puede comprender una molécula de ácidos nucleicos que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, o una parte de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos. Una molécula de ácidos nucleicos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, es una secuencia que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 para que pueda hibridarse con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, respectivamente, formando de esta manera un dúplex estable.

Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que presente una identidad de por lo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior respecto a la longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 ó una parte de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos.

Además, la molécula de ácidos nucleicos de la invención puede comprender sólo una parte de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, por ejemplo un fragmento que puede utilizarse como sonda o cebador, o un fragmento que codifique una parte de un polipéptido PD-L2, por ejemplo una parte biológicamente activa de un polipéptido PD-L2. Las secuencias de nucleótidos determinadas a partir de la clonación del gen PD-L2 humano permiten la generación de sondas y cebadores diseñados para la utilización en la identificación y/o clonación de otros miembros de la familia de PD-L2, así como de homólogos de PD-L2 de otras especies. La sonda/cebador típicamente comprende oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido típicamente comprende una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones restrictivas con por lo menos aproximadamente 12 ó 15, preferentemente 20 ó 25 aproximadamente, más preferentemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ó 75 nucleótidos consecutivos de una secuencia de sentido de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 de una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 ó de una variante o mutante alélica natural de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6.

Una molécula de ácidos nucleicos de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos de longitud superior a aproximadamente 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1150 ó más nucleótidos y que se hibrida bajo condiciones restrictivas de hibridación con una molécula de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 ó el complemento de la misma. Una molécula de ácidos nucleicos de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que presenta una longitud superior a aproximadamente 880-900, 900-950, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1150 ó más nucleótidos y que se hibrida bajo condiciones restrictivas de hibridación con una molécula de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 ó nº 3, o el complemento de la misma. Una molécula de ácidos nucleicos de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que presenta una longitud superior a aproximadamente 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300 ó más nucleótidos y que se hibrida bajo condiciones restrictivas de hibridación con una molécula de ácidos nucleicos que comprende los nucleótidos 1 a 358 de SEQ ID NO: 1 ó un complemento de la misma. Una molécula de ácidos nucleicos de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos de longitud superior a aproximadamente 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 850-900, 900-950, 950-1000-1050-1100, 1100-1150 ó más nucleótidos y que incluye por lo menos aproximadamente 15 nucleótidos (es decir, 15 nucleótidos contiguos) de la secuencia que comprende los nucleótidos 1 a 358 de SEQ ID NO: 1 ó un complemento de la misma, y que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ó un complemento de la misma.

Las sondas basadas en las secuencias de nucleótidos de PD-L2 pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas codificantes de los mismos polipéptidos o de polipéptidos homólogos. En aspectos preferentes, la sonda comprende además un grupo de marcaje unido a la misma, por ejemplo el grupo de marcaje puede ser un isótopo radioactivo, un compuesto fluorescente, un enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas pueden utilizarse como parte de un kit de ensayo diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan incorrectamente un polipéptido PD-L2, tal como mediante la medición de un nivel de un ácido nucleico codificante de PD-L2 en una muestra de células procedente de un sujeto, por ejemplo para detectar niveles de ARNm de PD-L2 ó para determinar si un gen PD-L2 genómico se ha mutado o delecionado.

Un fragmento de ácidos nucleicos codificante de una "parte biológicamente activa de un polipéptido PD-L2" puede prepararse mediante aislamiento de una parte de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 que codifica un polipéptido que presenta una actividad biológica de PD-L2 (por ejemplo la capacidad de unirse a su pareja o parejas de unión naturales (por ejemplo PD-1) y/o de modular la actividad celular inmunológica), la expresión de la parte codificada del polipéptido PD-L2 (por ejemplo mediante expresión recombinante *in vitro*) y la evaluación de la actividad de la parte codificada del polipéptido PD-L2.

La invención comprende además moléculas de ácidos nucleicos que difieren de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 debido a la degeneración del código genético y que de esta manera codifican los mismos polipéptidos PD-L2 que los codificados por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6. Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la exposición puede ser una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 ó nº 5.

Además de las secuencias de nucleótidos de PD-L2 mostradas en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, el experto en la materia apreciará que pueden existir dentro de una población (por ejemplo la población humana) polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos PD-L2. Dicho polimorfismo genético en los genes PD-L2 puede existir entre individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácidos nucleicos que incluyen un marco de lectura abierto codificante de un polipéptido PD-L2, preferentemente un polipéptido PD-L2 de mamífero y que pueden incluir además secuencias reguladoras no codificantes e intrones.

Entre las variantes alélicas de PD-L2 humano o de ratón se incluyen polipéptidos PD-L2 tanto funcionales como no funcionales. Las variantes alélicas funcionales son variantes de secuencia de aminoácidos naturales del polipéptido PD-L2 humano o de ratón que mantienen la capacidad de unirse a una o más parejas de unión a PD-L2 naturales, por ejemplo PD-1 y/o de modular la activación de los linfocitos. Las variantes alélicas funcionales típicamente contienen sólo sustituciones conservadoras de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó nº 5, o la sustitución, delección o inserción de residuos no críticos en regiones no críticas del polipéptido.

Las variantes alélicas no funcionales son variantes de secuencia de aminoácidos naturales del polipéptido PD-L2 humano o de ratón que no presentan la capacidad de unirse a parejas de unión a PD-L2 naturales, por ejemplo PD-1 y/o de modular cualquiera de las actividades de PD-L2 indicadas en la presente memoria. Las variantes alélicas no funcionales típicamente contienen una sustitución no conservadora, delección o inserción, o truncado prematuro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ó nº 5, o una sustitución, inserción o delección en residuos críticos o en regiones críticas del polipéptido, por ejemplo en un dominio IgV.

La presente invención proporciona además ortólogos no humanos no de ratón del polipéptido PD-L2 humano o de ratón. Los ortólogos del polipéptido PD-L2 humano o de ratón son polipéptidos que se aíslan a partir de organismos no humanos no de ratón y que presentan la misma actividad de unión a PD-1 y/o actividad moduladora de la activación de linfocitos que el polipéptido PD-L2. Los ortólogos del polipéptido PD-L2 humano o de ratón pueden identificarse fácilmente como comprendiendo una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a SEQ ID NO: 2 ó nº 5.

Además, las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de otros miembros de la familia de PD-L2 y, de esta manera, que presentan una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de PD-L2 de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, se pretende que se encuentren comprendidas dentro del alcance descrito. Por ejemplo, puede identificarse otro ADNc de PD-L2 basándose en la secuencia de nucleótidos del PD-L2 de ratón o humano. Además, las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos PD-L2 de especies diferentes y que, de esta manera, presentan una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de PD-L2 de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, se pretende que se encuentren comprendidas dentro del alcance descrito. Por ejemplo, puede identificarse un ADNc de PD-L2 basándose en la secuencia de nucleótidos del PD-L2 de ratón o humano.

Las moléculas de ácidos nucleicos correspondientes a variantes alélicas naturales u homólogos de los ADNc de PD-L2 pueden aislarse basándose en su homología con los ácidos nucleicos de PD-L2 dados a conocer en la presente memoria, utilizando los ADNc dados a conocer en la misma, o una parte de los mismos, a modo de sonda de hibridación según técnicas estándares de hibridación bajo condiciones restrictivas de hibridación. Las moléculas de ácidos nucleicos correspondientes a las naturales se aíslan mediante mapeado del mismo cromosoma o locus que el gen PD-L2.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una molécula de ácidos nucleicos aislada puede presentar una longitud de por lo menos 15, 20, 25, 30 ó más nucleótidos y se hibrida bajo condiciones restrictivas con la molécula de ácidos nucleicos que comprende los nucleótidos 1 a 358 de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó los nucleótidos 1 a 85 de SEQ ID NO: 3. El ácido nucleico puede presentar una longitud de por lo menos 880 a 900, 900 a 950, 950 a 1.000, 1.000 a 1.050, 1.050 a 1.100, 1.100 a 1.150 ó más nucleótidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "se hibrida bajo condiciones restrictivas" pretende describir condiciones para la hibridación y el lavado bajo las que las secuencias de nucleótidos que son significativamente idénticas u homólogas entre sí permanecen hibridadas entre sí. Preferentemente, las condiciones permiten que las secuencias que presentan una identidad de por lo menos aproximadamente 70%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 85% ó 90% entre sí permanecen hibridadas entre sí. Dichas condiciones restrictivas son conocidas por el experto en la materia y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, editores, John Wiley & Sons, Inc., 1995, secciones 2, 4 y 6. Pueden encontrarse condiciones restrictivas adicionales en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 7, 9 y 11. Un ejemplo no limitativo preferente de condiciones restrictivas de hibridación incluye la hibridación en 4X ó 6X de cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a una temperatura de entre aproximadamente 60°C y 70°C (o la hibridación en 4X SSC más formamida al 50% a una temperatura de entre aproximadamente 42°C y 50°C), seguido de uno o más lavados en 1X SSC, a una temperatura de entre aproximadamente 65°C y 70°C. Un ejemplo no limitativo preferente adicional de condiciones restrictivas de hibridación incluye la hibridación en 6X SSC a 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C. Un ejemplo no limitativo preferente de condiciones de hibridación altamente restrictivas incluye la hibridación en 1X SSC, a una temperatura de entre aproximadamente 65°C y 70°C (o la hibridación en 1X SSC más formamida al 50% a una temperatura de entre aproximadamente 42°C y 50°C), seguido de uno o más lavados en 0,3X SSC, a una temperatura de entre aproximadamente 65°C y 70°C. Un ejemplo no limitativo preferente de condiciones de hibridación menos restrictivas incluye la hibridación en 4X ó 6X SSC a una temperatura de entre aproximadamente 50°C y 60°C (o alternativamente, la hibridación en 6X SSC más formamida

al 50% a una temperatura de entre aproximadamente 40°C y 45°C), seguido de uno o más lavados en 2X SSC, a una temperatura de entre aproximadamente 50°C y 60°C. Los intervalos intermedios a los valores anteriormente indicados, por ejemplo de entre 65°C y 70°C o de entre 42°C y 50°C, también se pretende que se encuentren comprendidos en la presente invención. SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM) en los tampones de hibridación y de lavado; los lavados se llevaron a cabo durante 15 minutos cada uno tras completarse la hibridación. La temperatura de hibridación para híbridos de longitud prevista inferior a 50 pares de bases debería ser 5°C a 10°C menor a la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del híbrido, en la que T<sub>m</sub> se determina según las ecuaciones siguientes. Para híbridos de longitud inferior a 18 pares de bases, T<sub>m</sub> (°C)=2 (n° de bases A + T) + 4(n° de bases G + C) Para híbridos de longitud comprendida entre 18 y 49 pares de bases, T<sub>m</sub>(°C)=81,5 + 16,6(Log<sub>10</sub>[Na<sup>+</sup>]) + 0,41 (%G+C)-(600/N), en la que N es el número de bases en el híbrido y [Na<sup>+</sup>] es la concentración de iones sodio en el tampón de hibridación ([Na<sup>+</sup> para 1xSSC=0,165 M). El experto en la materia también reconocerá que pueden añadirse reactivos adicionales a los tampones de hibridación y/o de lavado para reducir la hibridación no específica de moléculas de ácidos nucleicos a membranas, por ejemplo membranas de nitrocelulosa o de nilón, incluyendo, aunque sin limitación, agentes de bloqueo (por ejemplo BSA o ADN portador de esperma de arenque), detergentes (por ejemplo SDS), agentes quelantes (por ejemplo EDTA), Ficoll, PVP y similares. Al utilizar membranas de nilón, en particular, un ejemplo no limitativo preferente adicional de condiciones restrictivas de hibridación es la hibridación en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 a 0,5 M, SDS al 7% a aproximadamente 65°C, seguido de uno o más lavados con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M, SDS al 1% a 65°C; ver, por ejemplo, Church y Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995, 1984 (o alternativamente 0,2X SSC, SDS al 1%).

Preferentemente, una molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la secuencia de SEQ ID NO: 1, n° 3, n° 4 ó n° 6 corresponde a una molécula natural de ácidos nucleicos. Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácidos nucleicos "natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que presenta una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza (por ejemplo que codifica un polipéptido natural).

Además de las variantes alélicas naturales de las secuencias de PD-L2 que pueden existir en la población, el experto en la materia apreciará además que pueden introducirse cambios mediante mutación en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, n° 3, n° 4 ó n° 6, conduciendo de esta manera a cambios en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos PD-L2 codificados, sin alterar la capacidad funcional de los polipéptidos PD-L2. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos que conduzcan a sustituciones de aminoácidos en residuos aminoácidos "no esenciales" en la secuencia de SEQ ID NO: 1, n° 3, n° 4 ó n° 6. Un residuo aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse respecto a la secuencia de tipo salvaje de PD-L2 (por ejemplo la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó n° 5) sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo aminoácido "esencial" resulta necesario para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos aminoácidos que se encuentran conservados entre polipéptidos PD-L2 de la presente invención, por ejemplo los presentes en un dominio extracelular, se predice que resultan particularmente susceptibles de alteración. Además, algunos residuos adicionales o ácidos conservados entre polipéptidos PD-L2 de la presente invención y otros miembros de la familia de PD-L2 son polipéptidos PD-L2 de la presente invención y otros miembros de la familia de PD-L2 que no es probable que resulten susceptibles de alteración.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos PD-L2 que contienen cambios en residuos aminoácidos que no resultan esenciales para la actividad. Dichos polipéptidos PD-L2 difieren en su secuencia de aminoácidos respecto de SEQ ID NO: 2 ó n° 5, aunque conservan actividad biológica. La molécula de ácidos nucleicos aislada comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más respecto a SEQ ID NO: 2 ó n° 5.

Una molécula de ácidos nucleicos aislada codificante de un polipéptido PD-L2 idéntica al polipéptido de SEQ ID NO: 2 ó n° 5 puede crearse mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, n° 3, n° 4 ó n° 6, de manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en el polipéptido codificado. Pueden introducirse mutaciones en SEQ ID NO: 1, n° 3, n° 4 ó n° 6 mediante técnicas estándares, tales como mutagénesis sitio-dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, se realizan sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más residuos aminoácidos no esenciales predichos. Una "sustitución conservadora de aminoácido" es una en la que se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano,

5 histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un polipéptido PD-L2 preferentemente se sustituye por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de PD-L2, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para la actividad biológica de PD-L2 con el fin de identificar los mutantes que retienen actividad. Tras la mutagénesis de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, el polipéptido codificado puede expresarse recombinantemente y puede determinarse la actividad del polipéptido.

10 Puede someterse a ensayo un polipéptido PD-L2 mutante para la capacidad de unirse y/o modular la actividad de una pareja de unión natural de PD-L2, por ejemplo PD-1, modular la señalización intracelular o intercelular, modular la activación de los linfocitos T y/o modular la respuesta inmunológica de un organismo.

15 Todavía otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas codificantes de una proteína de fusión de PD-L2. Dichas moléculas de ácidos nucleicos, que comprenden por lo menos una primera secuencia de nucleótidos codificante de una proteína PD-L2, un polipéptido o un péptido operablemente ligado a una segunda secuencia de nucleótidos codificante de una proteína, polipéptido o péptido no PD-L2, pueden prepararse mediante técnicas estándares de ADN recombinante.

20 Además de las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos PD-L2 indicados anteriormente, otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que presentan orientación antisentido respecto a las primeras. Una molécula de ácidos nucleicos "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "de sentido" codificante de un polipéptido, por ejemplo complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc de doble cadena o complementaria a una secuencia de ARNm. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un ácido nucleico antisentido puede establecer enlaces de hidrógeno con una molécula de ácidos nucleicos de orientación de sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena codificante de PD-L2 entera, o sólo a una parte de la misma. Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido respecto a una "región codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos codificante de un PD-L2. La expresión "región codificante" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en residuos aminoácidos (por ejemplo la región codificante de PD-L2 humano corresponde a SEQ ID NO: 3). Una molécula de ácido nucleico antisentido también puede ser una "región no codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos codificante de un PD-L2. La expresión "región no codificante" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traducen en aminoácidos (también denominadas regiones 5' y 3' no traducidas).

35 Dadas las secuencias de cadena codificante que codifican el PD-L2 humano o de ratón dadas a conocer en la presente memoria (por ejemplo SEQ ID NO: 3 ó nº 6, respectivamente), pueden diseñarse ácidos nucleicos antisentido de la invención según las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de ácidos nucleicos antisentido puede ser complementaria a la región codificante entera del ARNm de PD-L2, aunque más preferentemente es un oligonucleótido que es antisentido respecto a sólo una parte de la región codificante o no codificante del ARNm de PD-L2. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región circundante al sitio de inicio de traducción de ARNm de PD-L2. Un oligonucleótido antisentido puede presentar una longitud de, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos. Puede construirse una molécula de ácidos nucleicos antisentido de la invención utilizando síntesis química y reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos de la técnica. Por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos antisentido (por ejemplo un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados diversamente y diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y de sentido, por ejemplo pueden utilizarse derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Entre los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar el ácido nucleico antisentido se incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, β-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, β-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metilister de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente utilizando un vector de expresión en el que se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado presentará una orientación antisentido respecto a un ácido nucleico diana de interés, descrito adicionalmente en la subsección siguiente).

60 Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención típicamente se administran en un sujeto o se generan *in situ* de manera que se hibriden o se unan a ARNm celular y/o ADN genómico codificante de un polipéptido PD-L2 para inhibir de esta manera la expresión del polipéptido, por ejemplo mediante la inhibición de la transcripción y/o la

traducción. La hibridación puede ser mediante complementariedad convencional de nucleótidos para formar un dúplex estable o, por ejemplo en el caso de una molécula de ácidos nucleicos antisentido que se une a dúplex de ADN, mediante interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. Un ejemplo de una ruta de administración de moléculas de ácidos nucleicos antisentido incluye la inyección directa en un sitio de tejido. Alternativamente, pueden modificarse moléculas de ácidos nucleicos antisentido con diana en células seleccionadas y después administrarse sistémicamente. Por ejemplo, para la administración sistémica, pueden modificarse moléculas antisentido de manera que se unan específicamente a receptores o antígenos expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo mediante unión de las moléculas de ácidos nucleicos antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores o antígenos de superficie celular. Las moléculas de ácidos nucleicos antisentido también pueden introducirse en células utilizando los vectores descritos en la presente memoria. Para alcanzar concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, resultan preferentes constructos de vector en los que la molécula de ácidos nucleicos antisentido se sitúa bajo el control de un promotor pol II ó pol III fuerte.

La molécula de ácidos nucleicos antisentido de la invención puede ser una molécula de ácidos nucleicos  $\alpha$ -anomérica. Una molécula de ácidos nucleicos  $\alpha$ -anomérica forma híbridos específicos de doble cadena con ARN complementario en los que, al contrario que las unidades  $\beta$  habituales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier *et al.*, Nucleic Acids Res. 15:6625-6641, 1987). La molécula de ácidos nucleicos antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148, 1987) o un análogo químico de ARN-ADN (Inoue *et al.*, FEBS Lett. 215:327-330, 1987).

Un ácido nucleico antisentido de la invención puede ser un ribozima. Los ribozimas son moléculas de ARN catalítico con actividad de ribonucleasa que son capaces de cortar un ácido nucleico de cadena sencilla, tal como un ARNm, respecto al que presentan una región complementaria. De esta manera, los ribozimas (por ejemplo los ribozimas cabeza de martillo (descritos en Haseloff y Gerlach, Nature 334:585-591, 1988) pueden utilizarse para cortar catalíticamente transcritos de ARm de PD-L2 para inhibir de esta manera la traducción del ARNm de PD-L2. Un ribozima con especificidad para un ácido nucleico codificante de PD-L2 puede diseñarse basándose en la secuencia de nucleótidos de un ADNc de PD-L2 dado a conocer en la presente memoria (es decir, SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6). Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN L-19 IVS de *Tetrahymena* en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que debe cortarse en un ARNm codificante de PD-L2. Ver, por ejemplo, Cech *et al.*, patente US nº 4.987.071 y Cech *et al.*, patente US nº 5.116.742. Alternativamente, puede utilizarse el ARNm de PD-L2 para seleccionar un ARN catalítico que presente una actividad de ribonucleasa específica a partir de un grupo de moléculas de ARN. Ver, por ejemplo, Bartel D. y Szostak J.W., Science 261:1411-1418, 1993.

Alternativamente, la expresión del gen PD-L2 puede inhibirse focalizándose en las secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de PD-L2 (por ejemplo el promotor y/o los intensificadores de PD-L2; por ejemplo los nucleótidos 1 a 273 de SEQ ID NO: 1, o los nucleótidos 1 a 209 de SEQ ID NO: 4) para formar estructuras de triple hélice que eviten la transcripción del gen PD-L2 en las células diana. Ver generalmente Helene C., Anticancer Drug Des. 6(6):569-84, 1991; Helene C. *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36, 1992; y Maher L.J., Bioessays 14(12):807-15, 1992.

Las moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2 pueden modificarse en la fracción base, en la fracción sacárida o en el esqueleto de fosfatos con el fin de mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación o la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, el esqueleto de desoxirribosa fosfato de las moléculas de ácidos nucleicos puede modificarse para generar ácidos péptido nucleicos (ver Hyrup B. y Nielsen P.E., Bioorg. Med. Chem. 4(1):5-23, 1996). Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "ácidos péptido nucleicos" o "APN" se refieren a miméticos de ácidos nucleicos, por ejemplo miméticos de ADN, en los que el esqueleto de desoxirribosa fosfato se ha sustituido por un esqueleto pseudopeptídico y en los que se conservan únicamente las cuatro nucleobases naturales. El esqueleto neutro de los APN se ha demostrado que permite la hibridación específica a ADN y a ARN bajo condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de APN puede llevarse a cabo utilizando protocolos de síntesis peptídica en fase sólida estándares, tal como se describe en Hyrup y Nielsen, 1996, supra, y en Perry-O'Keefe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14670-675, 1996).

Los APN de las moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2 pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, pueden utilizarse APN como agentes antisentido o antígeno para la modulación específica de secuencia de la expresión génica mediante, por ejemplo, la inducción de la transcripción o la detención de la traducción o mediante la inhibición de la replicación. Los APN de las moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2 también pueden utilizarse en el análisis de mutaciones de un solo par de bases en un gen (por ejemplo mediante bloqueo de la PCR dirigido por APN); como enzimas de restricción artificiales utilizados en combinación con otros enzimas (por ejemplo nucleasas S1 (Hyrup y Nielsen, supra, 1996) o como sondas o cebadores para la secuencia o hibridación del ADN (Hyrup y Nielsen, supra, 1996; Perry-O'Keefe *et al.*, supra, 1996).

Los APN de PD-L2 pueden modificarse (por ejemplo para incrementar su estabilidad o incorporación celular),

mediante la unión de grupos lipofílicos u otros grupos ayudante a APN, mediante la formación de quimeras APN-ADN, o mediante la utilización de liposomas u otras técnicas de administración farmacológica conocidas de la técnica. Por ejemplo, pueden generarse quimeras de APN-ADN de moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2 que pueden combinar las propiedades ventajosas de los APN y los ADN. Dichas quimeras permiten que los enzimas de reconocimiento del ADN (por ejemplo la ARNasa H y las ADN polimerasas) interactúen con la parte de ADN, mientras que la parte de APN proporcionaría elevadas afinidad y especificidad de unión. Las quimeras APN-ADN pueden unirse mediante conectores de longitudes apropiadas seleccionadas en términos de apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases y orientación (Hyrup y Nielsen, supra, 1996). Las síntesis de quimeras de APN-ADN puede llevarse a cabo tal como se describe en Hyrup y Nielsen, supra, 1996, y en Finn P.J. *et al.*, Nucleic Acids Res. 24 (17):3357-63, 1996. Por ejemplo, puede sintetizarse una cadena de ADN sobre un soporte sólido utilizando un soporte sólido utilizando una reacción estándar de acoplamiento de fosforamidita y análogos de nucleósido modificados, por ejemplo la fosforamidita 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxitimidina, como puente entre la APN y el extremo 5' del ADN (Mag M. *et al.*, Nucleic Acids Res. 17:5973-88, 1989). A continuación, pueden acoplarse monómeros de APN escalonadamente para producir una molécula quimérica con un segmento APN en 5' y un segmento de ADN en 3' (Finn P.J. *et al.*, supra, 1996). Alternativamente, pueden sintetizarse moléculas quiméricas con un segmento de ADN en 5' y un segmento de APN en 3' (Peterser K.H. *et al.*, Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124, 1975).

El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos tales como péptidos (por ejemplo para presentar como diana receptores de células huésped *in vivo*), o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652, 1987; la solicitud de patente PCT n° de publicación WO 88/09810) o la barrera hematocefálica (ver, por ejemplo, la solicitud de patente PCT n° de publicación WO 89/10134). Además, pueden modificarse oligonucleótidos con agentes de corte inducidos por hibridación (ver, por ejemplo, Krol *et al.*, Biotechniques 6:958-976, 1988) o agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5:539-549, 1988). Con este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula (por ejemplo un péptido, un agente entrecruzante inducido por hibridación, un agente de transporte o un agente de corte inducido por hibridación).

Alternativamente, las características de expresión de un gen PD-L2 endógeno en una línea celular o microorganismo pueden modificarse mediante inserción de un elemento regulador de ADN heterólogo en el genoma de una línea celular estable o microorganismo clonado, de manera que el elemento regulador insertado se encuentre operablemente unido al gen PD-L2 endógeno. Por ejemplo, un gen PD-L2 endógeno que normalmente es "transcripcionalmente silencioso", es decir, un gen PD-L2 que no se expresa normalmente o que se expresa sólo a niveles muy bajos en una línea celular o microorganismo, puede activarse mediante inserción de un elemento regulador que sea capaz de promover la expresión de un producto génico normalmente expresado en esa línea celular o microorganismo. Alternativamente, puede activarse un gen PD-L2 endógeno transcripcionalmente silencioso mediante inserción de un elemento regulador promiscuo que funcione en todos los tipos celulares.

Puede insertarse un elemento regulador heterólogo en una línea celular estable o microorganismo clonado, de manera que se encuentre operablemente unido a un gen PD-L2 endógeno, utilizando técnicas tales como la recombinación homóloga dirigida, las cuales son bien conocidas del experto en la materia y se encuentran descritas, por ejemplo, en Chappel, patente US n° 5.272.071; solicitud de patente PCT n° de publicación WO 91/06667, publicada el 16 de mayo de 1991.

## II. Polipéptidos PD-L2 y anticuerpo anti-PD-L2 aislados

Un aspecto se refiere a polipéptidos PD-L2 aislados, y partes biológicamente aisladas de los mismos, así como fragmentos de polipéptido adecuados para la utilización como inmunógenos para generar anticuerpos anti-PD-L2. Pueden aislarse polipéptidos PD-L2 nativos a partir de fuentes de células o de tejido mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas estándares de purificación de proteínas. Pueden producirse polipéptidos PD-L2 mediante técnicas de ADN recombinante. Alternativamente a la expresión recombinante, puede sintetizarse químicamente una proteína o polipéptido PD-L2 utilizando técnicas estándares de síntesis peptídica.

Un polipéptido "aislado" o "purificado" o parte biológicamente activa del mismo se encuentra sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular de la que se ha derivado el polipéptido PD-L2, o se encuentra sustancialmente libre de precursores químicos o de otros compuestos químicos en el caso de que se sintetice químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptido PD-L2 en las que el polipéptido se separa de los componentes celulares de las células a partir de las que se ha aislado o producido recombinantemente. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptido PD-L2 que presentan menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteína no PD-L2 (también denominada en la presente memoria "proteínas contaminantes"), más preferentemente menos de aproximadamente 20% de proteína no PD-L2, todavía más preferentemente menos de aproximadamente 10% de proteína no PD-L2, y todavía más preferentemente menos de aproximadamente 5% de proteína no PD-L2. En el caso de que la proteína PD-L2 ó parte biológicamente

activa de la misma se produzca recombinantemente, también preferentemente se encuentra sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferentemente menos de aproximadamente 10%, y todavía más preferentemente menos de aproximadamente 5%, del volumen de la preparación de proteína.

La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos" incluye preparaciones de proteína PD-L2 en las que el polipéptido se separa de los precursores químicos o de otros compuestos químicos que participan en la síntesis del polipéptido. La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos o de otros compuestos químicos" incluye preparaciones de polipéptido PD-L2 que presentan menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2, más preferentemente menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2, todavía más preferentemente menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2, y todavía más preferentemente menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o compuestos químicos no PD-L2.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "parte biológicamente activa" de un polipéptido PD-L2 incluye un fragmento de un polipéptido PD-L2 que participa en una interacción entre una molécula PD-L2 y una molécula no PD-L2, por ejemplo un ligando natural de PD-L2, por ejemplo PD-1. Entre las partes biológicamente activas de un polipéptido PD-L2 se incluyen los péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos del polipéptido PD-L2 o derivadas de la misma, por ejemplo la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 ó nº 5, que incluye un número menor de aminoácidos al número en los polipéptidos PD-L2 de longitud completa, y muestra por lo menos una actividad de un polipéptido PD-L2. Típicamente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con por lo menos una actividad del polipéptido PD-L2, por ejemplo la modulación de la actividad de PD-1. Una parte biológicamente activa de un polipéptido PD-L2 puede ser un polipéptido que presente una longitud de, por ejemplo, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 ó más aminoácidos. Las partes biológicamente activas de un polipéptido PD-L2 pueden utilizarse como dianas para desarrollar agentes que modulen una actividad mediada por PD-L2, por ejemplo la activación de células inmunológicas.

Una parte biológicamente activa de un polipéptido PD-L2 puede comprender por lo menos una parte de un dominio extracelular. Debe entenderse que una parte biológicamente activa preferente de un polipéptido PD-L2 puede contener por lo menos una parte de un dominio extracelular (por ejemplo comprender un dominio IgV y/o IgC) y uno o más de los dominios siguientes: un dominio de péptido de señal, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. Además, pueden prepararse otras partes biológicamente activas en las que se han delecionado otras regiones del polipéptido, mediante técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de un polipéptido PD-L2 nativo.

El polipéptido PD-L2 puede presentar la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 ó nº 5. El polipéptido PD-L2 puede ser sustancialmente idéntico a SEQ ID NO: 2 ó nº 5, y conservar la actividad funcional del polipéptido de SEQ ID NO: 2 ó nº 5, aunque diferir en la secuencia de aminoácidos debido a variación alélica natural o mutagénesis, tal como se describe en mayor detalle en la subsección I, anteriormente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el polipéptido PD-L2 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más respecto a SEQ ID NO: 2 ó nº 5.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de entre una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima y pueden omitirse las secuencias no idénticas a efectos comparativos). La longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos puede ser por lo menos 30%, preferentemente por lo menos 40%, más preferentemente por lo menos 50%, todavía más preferentemente por lo menos 60%, y todavía más preferentemente por lo menos 70%, 80% ó 90% de la longitud de la secuencia de referencia (por ejemplo al alinear una segunda secuencia con la secuencia de aminoácidos del PD-L2 humano de SEQ ID NO: 2 que presenta 273 residuos aminoácidos, se alinean por lo menos 82, preferentemente por lo menos 109, más preferentemente por lo menos 137, todavía más preferentemente por lo menos 164, y todavía más preferentemente por lo menos 191, 218, 246 ó más residuos aminoácidos; al alinear una segunda secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de PD-L2 de ratón de SEQ ID NO: 5 que presenta 247 residuos aminoácidos, se alinean por lo menos 74, preferentemente por lo menos 99, más preferentemente por lo menos 124, todavía más preferentemente por lo menos 148, y todavía más preferentemente por lo menos 173, 198, 222 ó más residuos aminoácidos. A continuación, se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácido o de nucleótido correspondientes. En el caso de que una posición en la primera secuencia se encuentra ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se utiliza en la presente memoria, "identidad" de aminoácidos o de ácidos nucleicos es equivalente a "homología" de aminoácidos o de ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, considerando el



número de huecos y la longitud de cada hueco, que resulta necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias.

5 La comparación entre secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias puede llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970), que se ha incorporado en el programa GAP del paquete informático de GCG (disponible en Internet del Genetics Computer Group), utilizando una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse utilizando el programa GAP del paquete informático de GCG (disponible en Internet del Genetics Computer Group) utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 ó 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Meyers E. y Miller W. (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988), el cual se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0 ó 2.0U) utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

20 Las secuencias de ácidos nucleicos y de polipéptido pueden utilizarse además como "secuencia de pregunta" para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos públicas con el fin de, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden llevarse a cabo utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Pueden llevarse a cabo búsquedas de nucleótidos en BLAST con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12 con el fin de obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2. Pueden llevarse a cabo búsquedas de proteínas en BLAST con el programa XBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=3 con el fin de obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de polipéptidos PD-L2. Para obtener alineaciones con huevos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. Al utilizar los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo XBLAST y NBLAST). Ver el sitio de Internet del National Center for Biotechnology Information.

30 La invención describe además proteínas quiméricas o de fusión de PD-L2. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" de PD-L2 comprende un polipéptido PD-L2 unido operablemente a un polipéptido no PD-L2. Un "polipéptido PD-L2" se refiere a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a una molécula de PD-L2, mientras que un "polipéptido no PD-L2" se refiere a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido que no es sustancialmente homólogo respecto al polipéptido PD-L2, por ejemplo un polipéptido que es diferente del polipéptido PD-L2 y que se deriva del mismo organismo o de un organismo diferente. En una proteína de fusión de PD-L2, el polipéptido PD-L2 puede corresponder a la totalidad o a una parte de un polipéptido PD-L2. Una proteína de fusión de PD-L2 puede comprender por lo menos una parte biológicamente activa de un polipéptido PD-L2. Una proteína de fusión de PD-L2 puede comprender por lo menos dos dominios de un polipéptido PD-L2. En la proteína de fusión, la expresión "operablemente ligado" pretende indicar que el polipéptido PD-L2 y el polipéptido no PD-L2 se encuentran fusionados entre sí en el mismo marco. El polipéptido no PD-L2 puede fusionarse con el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido PD-L2 y corresponde a una fracción que altera la solubilidad, la afinidad de unión, la estabilidad o la valencia del polipéptido PD-L2.

45 Por ejemplo, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-PD-L2 en la que las secuencias de PD-L2 se encuentran fusionadas con el extremo C-terminal de las secuencias de GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación del PD-L2 recombinante.

50 En otra invención, la proteína de fusión es un polipéptido PD-L2 que contiene una secuencia de señal heteróloga en su extremo N-terminal. En determinadas células huésped (por ejemplo células huésped de mamífero), puede incrementarse la expresión y/o secreción de PD-L2 mediante la utilización de una secuencia de señal heteróloga.

55 En una invención preferente, la proteína de fusión es una proteína de fusión Ig-PD-L2 en la que las secuencias de PD-L2 se encuentran fusionadas con una parte de una molécula de Ig. La parte Ig de la proteína de fusión puede incluir una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo un dominio Cy1 ó Cy4 humano (por ejemplo las regiones CH2 y CH3 de bisagra de la IgCy1 humana o de la IgCy4 humana (ver, por ejemplo, Capon *et al.*, patente US nº 5.116.964, nº 5.580.756 y nº 5.844.095).

60 Una proteína de fusión resultante puede presentar una solubilidad, afinidad de unión, estabilidad y/o valencia de PD-L2 alteradas (es decir, el número de sitios de unión en cada molécula) y puede incrementar la eficiencia de la purificación de las proteínas.

Entre las proteínas de fusión de PD-L2 particularmente preferentes se incluyen una parte de dominio extracelular de PD-L2 acoplada con una región constante de inmunoglobulina (por ejemplo la región Fc). La región constante de

5 inmunoglobulina puede contener modificaciones genéticas que reduzcan o eliminen la actividad efectora inherente en la estructura de inmunoglobulina. Por ejemplo, el ADN codificante de una parte extracelular de un polipéptido PD-L2 puede unirse a ADN codificante de las regiones CH2 y CH3 de bisagra de IgGy1 y/o IgGy4 humanas modificadas mediante mutagénesis sitio-dirigida, por ejemplo tal como se enseña en la solicitud de patente WO n° 97/28267.

10 Las proteínas de fusión de PD-L2 de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas y administrarse en un sujeto *in vivo*. Las proteínas de fusión de PD-L2 pueden utilizarse para afectar la biodisponibilidad de una pareja de unión de PD-L2, por ejemplo PD-1. La utilización de proteínas de fusión de PD-L2 puede resultar útil terapéuticamente para el tratamiento de condiciones o trastornos que resultarían beneficiados de la modulación de la respuesta inmunológica.

15 Además, las proteínas de fusión de PD-L2 pueden utilizarse como inmunógenos para producir anticuerpos anti-PD-L2 en un sujeto, para purificar las proteínas de unión de PD-L2 y en ensayos de cribado para identificar moléculas que inhiben la interacción de PD-L2 con su pareja de unión natural, por ejemplo PD-1.

20 Preferentemente, una proteína quimérica o de fusión de PD-L2 se produce mediante técnicas estándares de ADN recombinante. Por ejemplo, se ligan entre sí en el mismo marco fragmentos de ADN codificantes de diferentes secuencias polipeptídicas, según técnicas convencionales, por ejemplo mediante la utilización de extremos romos o cohesivos para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, el relleno de los extremos cohesivos según resulte apropiado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseables y la ligación enzimática. La gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que den lugar a extremos protuberantes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y amplificarse nuevamente para generar una secuencia génica quimérica (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, editores, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión se encuentran disponibles comercialmente que ya codifican una fracción de fusión (por ejemplo un polipéptido GST). Puede clonarse un ácido nucleico codificante de PD-L2 en dicho vector de expresión de manera que la fracción de fusión se una en el mismo marco con el polipéptido PD-L2.

30 La presente invención se refiere además a variantes de los polipéptidos PD-L2 que funcionan como (miméticos de) agonistas de PD-L2 o como antagonistas de PD-L2. Las variantes de los polipéptidos PD-L2 pueden generarse mediante mutagénesis, por ejemplo mutación puntual discreta o truncado de un polipéptido PD-L2. Un agonista de los polipéptidos PD-L2 puede conservar sustancialmente las mismas actividades biológicas, o un subconjunto de ellas, de la forma natural de un polipéptido PD-L2. Un antagonista de un polipéptido PD-L2 puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural del polipéptido PD-L2 mediante la modulación competitiva, por ejemplo, de una actividad mediada por PD-L2 de un polipéptido PD-L2. De esta manera, los efectos biológicos específicos pueden inducirse mediante tratamiento con una variante de función limitada. En un aspecto, el tratamiento de un sujeto con una variante que presenta un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural del polipéptido presenta menos efectos secundarios en un sujeto respecto al tratamiento con la forma natural del polipéptido PD-L2.

45 Las variantes de un polipéptido PD-L2 que funcionan como (miméticos de) agonistas de PD-L2 o como antagonistas de PD-L2 pueden identificarse mediante el cribado de bibliotecas combinatoriales de mutantes, por ejemplo mutantes por truncado, de un polipéptido PD-L2 para actividad agonista o antagonista del polipéptido PD-L2. Una biblioteca variegada de variantes de PD-L2 se genera mediante mutagénesis combinatorial al nivel de los ácidos nucleicos y se encuentra codificada por una biblioteca génica variegada. Puede producirse una biblioteca variegada de variantes de PD-L2 mediante, por ejemplo, la ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas, de manera que un conjunto degenerado de potenciales secuencias de PD-L2 sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo para la expresión fágica) que contenga el conjunto de secuencias de PD-L2 dentro del primer conjunto. Existe una diversidad de métodos que puede utilizarse para producir bibliotecas de potenciales variantes de PD-L2 a partir de una secuencia oligonucleótida degenerada. Puede llevarse a cabo la síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador automático de ADN y seguidamente el gen sintético se liga en un vector de expresión apropiado. La utilización de un conjunto degenerado de genes permite proporcionar, en una mezcla, la totalidad de las secuencias codificantes del conjunto deseado de potenciales secuencias de PD-L2. Se conocen de la técnica métodos de síntesis de oligonucleótidos degenerados (ver, por ejemplo, Narang S.A., Tetrahedron 39:3, 1983; Itakura *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 53:323, 1984; Itakura *et al.*, Science 198:1056, 1984; Ike *et al.*, Nucleic Acids Res. 11:477, 1983).

60 Además, pueden utilizarse bibliotecas de fragmentos de una secuencia codificante de polipéptido PD-L2 para generar una población variegada de fragmentos de PD-L2 para el cribado y la posterior selección de variantes de un polipéptido PD-L2. Puede generarse una biblioteca de fragmentos de secuencia codificante mediante el tratamiento de un fragmento de doble cadena para PCR de una secuencia codificante de PD-L2 con una nucleasa bajo condiciones en las que se sólo se producen muescas aproximadamente en una ocasión en cada molécula, se

desnaturaliza el ADN de doble cadena, se renaturaliza el ADN para formar ADN de doble cadena que puede incluir parejas de sentido/antisentido de diferentes productos con muesca, se eliminan las partes de cadena sencilla de los dúplex reformados mediante tratamiento con S1 nucleasa y se ligan la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de diversos tamaños del polipéptido PD-L2.

Se conocen de la técnica diversas técnicas para el cribado de productos génicos de bibliotecas combinatoriales preparadas mediante mutación puntual o truncado, y para el cribado de bibliotecas de ADNc para productos génicos que presenten una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables al cribado rápido de las bibliotecas génicas generadas mediante la mutagénesis combinatorial de los polipéptidos PD-L2. Las técnicas utilizadas más ampliamente que permiten el análisis de alto rendimiento para el cribado de grandes bibliotecas génicas típicamente incluyen la clonación de la biblioteca génica en vectores de expresión replicable, la transformación de las células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y la expresión de los genes combinatoriales bajo condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector codificante del gen cuyo producto se ha detectado. La mutagénesis de conjunto recursiva (REM), una nueva técnica que incrementa la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de PD-L2 (Arkin y Youvan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815, 1992; Delagrave *et al.*, Protein Eng. 6(3):327-331, 1993).

Pueden explotarse ensayos basados en células para analizar una biblioteca variegada de PD-L2. Por ejemplo, puede transfectarse una biblioteca de vectores de expresión en una línea celular. A continuación, las células transfectadas se ponen en contacto con células que expresan PD-1 y puede detectarse el efecto del mutante sobre la interacción de PD-L2 de tipo salvaje con su ligando o ligandos naturales, por ejemplo PD-1. A continuación, puede recuperarse ADN plasmídico de las células que puntúan para inhibición de la señalización a través de PD-1 (conduciendo a la regulación positiva de las células T), o alternativamente, la potenciación de la señalización mediante PD-1 (conduciendo a la regulación negativa de las células T) y se caracterizan adicionalmente los clones individuales.

Además de los polipéptidos PD-L2 que consisten únicamente de aminoácidos naturales, también se proporcionan peptidomiméticos de PD-L2. Se utilizan análogos de péptidos comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido de molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos" (Fauchere J., Adv. Drug Res. 15:29, 1986; Veber y Freidinger, TINS página 392, 1985; y Evans *et al.*, J. Med. Chem. 30:1229, 1987) y habitualmente se desarrollan con la ayuda de modelaje molecular computerizado. Pueden utilizarse miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que presenta una actividad biológica o farmacológica), tal como PD-L2 humano o de ratón, pero presentan uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado de entre el grupo que consiste de:  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (cis y trans),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ , y  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , mediante métodos conocidos de la técnica y descritos en mayor detalle en las referencias siguientes: Spatola, A.F. en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins Weinstein, B., editor, Marcel Dekker, New York, página 267, 1983; Spatola A.F., Vega Data (marzo de 1983), vol. n° 1, número 3, "Peptide Backbone Modifications"; Morley J.S., Trends. Pharm. Sci., páginas 463 a 468, 1980; Hudson D. *et al.*, Int. J. Pept. Prot. Res. 14: 177-185, 1979 ( $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); Spatola A.F. *et al.*, Life. Sci. 38:1243-1249, 1986 ( $-\text{CH}_2\text{S}-$ ); Hann M.M., J. Chem. Soc. Perkin. Trans.1307-314, 1982 ( $-\text{CH}-\text{CH}-$ , cis y trans); Almquist R.G. *et al.*, J. Med. Chem. 23:1392-1398, 1980 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Jennings-White C. *et al.*, Tetrahedron Lett. 23:2533, 1982 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Szelke M. *et al.*, solicitud de patente europea n° EP 45665 A1, 1982, CA: 97:39405 ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); Holladay M.W. *et al.*, Tetrahedron. Lett. 24:4401-4404, 1983 ( $-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); y Hruby V.J., Life Sci. 31:189-199, 1982 ( $-\text{CH}_2\text{S}-$ ). Un enlace no peptídico particularmente preferente es  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ . Dichos peptidomiméticos pueden presentar ventajas significativas sobre algunos polipéptidos ejemplares, incluyendo, por ejemplo: una producción más económica, una mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (vida media, absorción, potencia, eficacia, etc.), una especificidad alterada (por ejemplo un amplio espectro de actividades biológicas), una antigenicidad reducida y otras. El marcaje de peptidomiméticos habitualmente implica la unión covalente de uno o más marcajes, directamente o mediante un espaciador (por ejemplo un grupo amida), a una o más posiciones no interfirientes en el peptidomimético predichos mediante datos cuantitativos de estructura-actividad y/o modelaje molecular. Dichas posiciones no interfirientes generalmente son posiciones que no forman contactos directos con la macromolécula o macromoléculas a las que se une el peptidomimético para producir el efecto terapéutico. La derivatización (por ejemplo el marcaje) de los peptidomiméticos no debería interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica del peptidomimético.

La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de PD-L2 con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo D-lisina en lugar de L-lisina) puede utilizarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos restringidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de PD-L2 o una variación de secuencia sustancialmente idéntica, mediante métodos conocidos de la técnica (Rizo y

Gierasch, Annu. Rev. Biochem. 61:387, 1992; por ejemplo mediante la adición de residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclicen el péptido).

5 Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos PD-L2 identificados en la presente memoria permitirá al experto en la materia producir polipéptidos correspondientes a secuencias peptídicas de PD-L2 y variantes de secuencia de las mismas. Dichos polipéptidos pueden producirse en células huésped procarióticas o eucarióticas mediante expresión de polinucleótidos codificantes de una secuencia peptídica de PD-L2, frecuentemente como parte de un polipéptido de mayor tamaño. Alternativamente, dichos péptidos pueden sintetizarse mediante métodos químicos. Los métodos para la expresión de polipéptidos heterólogos en huéspedes recombinantes, la síntesis química de polipéptidos y la traducción *in vitro* son bien conocidos de la técnica y se describen en mayor detalle en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Berger y Kimmel, Methods in Enzymology, volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987; Merrifield J., J. Am. Chem. Soc. 91:501, 1969; Chaiken I.M., CRC Crit. Rev. Biochem. 11:255, 1981; Kaiser *et al.*, Science 243:187, 1989; Merrifield B., Science 232:342, 1986; Kent S.B.H., Annu. Rev. Biochem. 57:957, 1988, y Offord R.E., Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing, 1980).

20 Pueden producirse péptidos, típicamente mediante síntesis química directa, y utilizarse, por ejemplo, como agonistas o antagonistas de una interacción PD-L2/PD-1. Pueden producirse péptidos en forma de péptidos modificados, con fracciones no peptídicas unidas mediante enlace covalente al extremo N-terminal y/o C-terminal. En determinada exposición preferente, el extremo carboxi-terminal o el extremo amino-terminal, o ambos, se modifican químicamente. Las modificaciones más comunes de los grupos amino y carboxilo terminales son la acetilación y la amidación, respectivamente. Pueden incorporarse modificaciones amino-terminales, tales como la acilación (por ejemplo la acetilación) o la alquilación (por ejemplo la metilación), y modificaciones carboxi-terminales, tales como la amidación, así como otras modificaciones terminales, incluyendo la ciclización. Determinadas modificaciones amino-terminales y/o carboxi-terminales y/o extensiones peptídicas de la secuencia nuclear pueden proporcionar propiedades físicas, químicas, bioquímicas y farmacológicas ventajosas, tales como: una estabilidad incrementada, una potencia y/o eficacia incrementadas, resistencia a las proteasas séricas, propiedades farmacocinéticas deseables, y otras. Los péptidos pueden utilizarse terapéuticamente para tratar enfermedades, por ejemplo mediante la alteración de la coestimulación en un paciente.

30 Un polipéptido PD-L2 aislado, o una parte o fragmento del mismo, puede utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a PD-L2, utilizando técnicas estándares de preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede utilizarse un polipéptido PD-L2 de longitud completa o, alternativamente, la invención proporciona fragmentos peptídicos antigénicos de PD-L2 para la utilización como inmunógenos. Un péptido antigénico de PD-L2 puede comprender por lo menos 8 residuos aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 ó nº 5, y comprende un epítipo de PD-L2, de manera que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunológico específico con el polipéptido PD-L2. Preferentemente, el péptido antigénico comprende por lo menos 10 residuos aminoácidos, más preferentemente por lo menos 15 residuos aminoácidos, todavía más preferentemente por lo menos 20 residuos aminoácidos, y todavía más preferentemente por lo menos 30 residuos aminoácidos.

45 Los epitopos preferentes comprendidos por el péptido antigénico son regiones de PD-L2 que se encuentran situadas en el dominio extracelular del polipéptido, por ejemplo regiones hidrofílicas, así como regiones de elevada antigenicidad.

50 Un inmunógeno PD-L2 típicamente se utiliza para preparar anticuerpos mediante inmunización de un sujeto adecuado (por ejemplo un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, polipéptido PD-L2 expresado recombinantemente o un polipéptido PD-L2 sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunostimulador similar. La inmunización de un sujeto adecuado con una preparación inmunogénica de PD-L2 induce una respuesta de anticuerpos policlonales anti-PD-L2.

55 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, otro aspecto se refiere a anticuerpos anti-PD-L2. El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) a un antígeno, tal como un PD-L2. Entre los ejemplos de partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina se incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>, que pueden generarse mediante tratamiento del anticuerpo con un enzima tal como la pepsina. La exposición describe anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a moléculas de PD-L2. La expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene únicamente una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de PD-L2. De esta manera, una composición de anticuerpos monoclonales típicamente muestra una única afinidad de unión para un polipéptido PD-L2 particular con el que

inmunorreacciona.

Los anticuerpos policlonales anti-PD-L2 pueden prepararse tal como se ha indicado anteriormente, mediante inmunización de un sujeto adecuado con un inmunógeno PD-L2. El título de anticuerpos anti-PD-L2 en el sujeto inmunizado puede seguirse en el tiempo mediante técnicas estándares, tales como el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) utilizando PD-L2 inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra PD-L2 pueden aislarse del mamífero (por ejemplo de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como la cromatografía con proteína A, con el fin de obtener la fracción IgG. En un tiempo apropiado después de la inmunización, por ejemplo cuando los títulos de anticuerpo anti-PD-L2 son máximos, pueden obtenerse células productoras de anticuerpos del sujeto y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándares, tales como la técnica del hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975 (ver también Brown *et al.*, *J. Immunol.* 127:539-46, 1981; Brown *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255:4980-83, 1980; Yeh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31, 1976; y Yeh *et al.*, *Int. J. Cancer* 29:269-75, 1982), la técnica de hibridoma de células B humanas más reciente (Kozbor *et al.*, *Immunol. Today* 4:72, 1983), la técnica del hibridoma del VEB (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96, 1985) o técnicas del trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales es bien conocida (ver generalmente Kenneth R.H., en: *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York, 1980; Lerner E.A., *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402, 1981; Geffer M.L. *et al.*, *Somatic Cell Genet.* 3:231-36, 1977). Brevemente, se fusiona una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) con linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno PD-L2 tal como se ha indicado anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células del hibridoma resultante se criban para identificar un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal que se una a PD-L2.

Cualquiera de los muchos y bien conocidos protocolos utilizados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas puede aplicarse con el propósito de generar un anticuerpo monoclonal anti-PD-L2 (ver, por ejemplo, Galfre G. *et al.*, *Nature* 266:55052, 1977; Geffer *et al.*, *supra*, 1977; Lerner, *supra*, 1981, y Kenneth, *supra*, 1980). Además, el experto ordinario en la materia apreciará que existen muchas variaciones de dichos métodos que también resultarían útiles. Típicamente se deriva la línea celular inmortal (por ejemplo una línea celular de mieloma) de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas murinos mediante la fusión de linfocitos procedentes de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica, con una línea celular inmortalizada de ratón. Las líneas celulares inmortales preferentes son las líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Puede utilizarse cualquiera de entre varias líneas celulares de mieloma como pareja de fusión según técnicas estándares, por ejemplo las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 ó Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma se encuentran disponibles de la ATCC. Típicamente, se fusionan células de mieloma de ratón sensibles a HAT con esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión seguidamente se seleccionan utilizando medio HAT, que elimina las células de mieloma no fusionadas y fusionadas no productivamente (los esplenocitos no fusionados mueren tras varios días debido a que no se han transformado). Las células de hibridoma productoras de un anticuerpo monoclonal se detectan mediante cribado de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para anticuerpos que se unen a PD-L2, por ejemplo utilizando ensayo ELISA estándar.

En los Ejemplos 4 y 5 se describen métodos adicionales para producir anticuerpos que se unan a PD-L2.

Alternativamente a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, puede identificarse y aislarse un anticuerpo monoclonal anti-PD-L2 mediante cribado de una biblioteca combinatoria recombinante de inmunoglobulinas (por ejemplo una biblioteca de expresión fágica de anticuerpos) con PD-L2, aislando de esta manera miembros de biblioteca de inmunoglobulinas que se unen a PD-L2. Los kits para generar y cribar bibliotecas de expresión fágica se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo el sistema fágico de anticuerpos recombinantes *Recombinant Phage Antibody System*, de Pharmacia, nº de catálogo 27-9400-0 1; y el kit de expresión fágica *SurfZAP™ Phage Display Kit*, de Stratagene, nº de catálogo 240612. Además, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles de utilizarse para generar y cribar bibliotecas de expresión de anticuerpos en, por ejemplo, Ladner *et al.*, patente US nº 5.223.409; Kang *et al.*, solicitud de patente internacional PCT nº WO 92/18619; Dower *et al.*, solicitud de patente internacional PCT nº WO 91/17271; Winter *et al.*, solicitud de patente internacional PCT nº de publicación WO 92/20791; Markland *et al.*, solicitud de patente PCT nº de publicación WO 92/15679; Breitling *et al.*, solicitud de patente internacional PCT nº de publicación WO 93/01288; McCafferty *et al.*, solicitud de patente internacional PCT nº de publicación WO 92/01047; Garrard *et al.*, solicitud de patente internacional PCT nº de publicación WO 92/09690; Ladner *et al.*, solicitud de patente internacional PCT nº de publicación WO 90/02809; Fuchs *et al.*, *Biotechnology (NY)* 9:1369-1372, 1991; Hay *et al.*, *Hum. Antibody Hybridomas* 3:81-85, 1992; Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281, 1989) y Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734, 1993; Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896, 1992; Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628, 1991; Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580, 1992; Garrard *et al.*, *Biotechnology (NY)* 9:1373-1377, 1991; Hoogenboom *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137, 1991; Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982, 1991; y McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554, 1990).

Además, los anticuerpos recombinantes anti-PD-L2, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden partes tanto humanas como no humanas, los cuales pueden prepararse utilizando técnicas de ADN recombinante estándares, se encuentran comprendidos dentro del alcance descrito. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas de la técnica, por ejemplo utilizando métodos descritos en Robinson *et al.*, solicitud de patente WO n° 1987/000071; Akira *et al.*, solicitud de patente europea n° 184.187; Taniguchi M., solicitud de patente europea n° 171.496 A2; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea n° 173.494 A1; Neuberger *et al.*, solicitud de patente internacional PCT n° de publicación WO 86/01533; Cabilly *et al.*, patente US n° 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea n° 125.023 A2; Better *et al.*, Science 240:1041-1043, 1988); Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443, 1987; Liu *et al.*, J. Immunol. 139:3521-3526, 1987; Sun *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218, 1987; Nishimura *et al.*, Cancer Res. 47:999-1005, 1987; Wood *et al.*, Nature 314:446-449, 1985; Shaw *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559, 1988; Morrison S.L., Science 229:1202-1207, 1985; Oi *et al.*, Biotechniques 4:214, 1986; Winter, patente US n° 5.225.539; Jones *et al.*, Nature 321:552-525, 1986; Verhoeven *et al.*, Science 239:1534, 1988; y Beidler *et al.*, J. Immunol. 141:4053-4060, 1988).

Puede utilizarse un anticuerpo anti-PD-L2 (por ejemplo un anticuerpo monoclonal) para aislar PD-L2 mediante técnicas estándares, tales como la cromatografía de afinidad o la inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-PD-L2 puede facilitar la purificación del PD-L2 natural a partir de células y de PD-L2 producido recombinantemente, expresado en células huésped. Además, puede utilizarse un anticuerpo anti-PD-L2 para detectar el polipéptido PD-L2 (por ejemplo en un lisado celular o en un sobrenadante celular) con el fin de evaluar la abundancia y patrón de expresión del polipéptido PD-L2. Pueden utilizarse anticuerpos anti-PD-L2 con fines diagnósticos, para realizar un seguimiento de los niveles de polipéptido en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Puede facilitarse la detección mediante acoplamiento (es decir, la unión física) del anticuerpo con una sustancia detectable. Entre los ejemplos de sustancias detectables se incluyen diversos enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuados se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalinaβ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos de grupo prostético adecuado se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; entre los ejemplos de materiales bioluminiscentes se incluyen luciferasa, luciferina y acuorina, y entre los ejemplos de materiales radioactivos adecuados se incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S o <sup>3</sup>H.

### III. Vectores de expresión recombinante y células huésped

Otro aspecto se refiere a vectores, preferentemente vectores de expresión, que contienen una molécula de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido PD-L2 (o una parte del mismo). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo vectores bacterianos que presentan un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped al introducirse en la célula huésped, y de esta manera se replican conjuntamente con el genoma del huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se encuentran ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia se encuentran en forma de plásmido. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiablemente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectivos en la replicación), que proporcionan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes comprenden un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que implica que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped que deben utilizarse para la expresión, que se ligan operablemente a la secuencia de ácidos nucleicos que debe expresarse. Dentro de un vector de expresión recombinante, la expresión "operablemente ligado" pretende referirse a que la secuencia de nucleótidos de interés se une a la secuencia o secuencias reguladoras de manera que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo en un sistema *in vitro* de transcripción/traducción o en una célula huésped en el caso de que el vector se introduzca en la célula huésped). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Methods Enzymol. 185:3-7, 1990. Entre las

5 secuencias reguladoras se incluyen aquéllas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquéllas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en determinadas células huésped (por ejemplo secuencias reguladoras específicas de tejidos). El experto en la materia apreciará que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de célula huésped que debe transformarse, el nivel de expresión de proteína deseado, y similares. Los vectores de expresión pueden introducirse en células huésped para producir de esta manera proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos tal como se describe en la presente memoria (por ejemplo polipéptido PD-L2, formas mutantes de polipéptidos PD-L2, proteínas de fusión y similares).

10 Los vectores de expresión recombinante pueden diseñarse para la expresión de polipéptidos PD-L2 en células procariontes o eucariontes. Por ejemplo, pueden expresarse polipéptidos PD-L2 en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (utilizando vectores de expresión baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Las células huésped adecuadas se comentan en mayor detalle en Goeddel, supra, 1990. Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras promotoras de T7 y polimerasa de T7.

20 La expresión de polipéptidos en procariontes con frecuencia se lleva a cabo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a un polipéptido codificado en dichos vectores, habitualmente hasta el extremo amino-terminal del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión típicamente presentan tres propósitos: 1) incrementar la expresión del polipéptido recombinante, 2) incrementar la solubilidad del polipéptido recombinante, y 3) ayudar a purificar el polipéptido recombinante al actuar como ligando en la purificación por afinidad. Con frecuencia en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de corte proteolítico en la unión entre la fracción de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante respecto de la fracción de fusión, posteriormente a la purificación de la proteína de fusión. Dichos enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa. Entre los vectores de expresión de fusión típicos se incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc., Smith D.B. y Johnson K.S., Gene 67:31-40, 1988), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, al polipéptido recombinante diana.

30 Las proteínas de fusión purificadas pueden utilizarse en ensayos de actividad de PD-L2 (por ejemplo ensayos directos o ensayos competitivos descritos en detalle posteriormente) o para generar anticuerpos específicos para polipéptidos PD-L2, por ejemplo. Una proteína de fusión de PD-L2 que puede expresarse en un vector de expresión retroviral puede utilizarse para infectar células de médula ósea que posteriormente se trasplantan en recipiente irradiados. A continuación, se examina la patología del sujeto receptor tras transcurrir un tiempo suficiente (por ejemplo seis semanas).

40 Entre los ejemplos de vectores de expresión *E. coli* no de fusión inducibles adecuados se incluyen pTrc (Amann *et al.*, Gene 69:301-315, 1988) y pET 11d (Studier *et al.*, Methods Enzymol. 185:60-89, 1990). La expresión del gen diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción por la ARN polimerasa del huésped desde un promotor de fusión *trp-lac* híbrido. La expresión del gen diana a partir del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión *gn10-lac* de T7 mediada por una ARN polimerasa vírica coexpresada (*gn1* de T7). Esta polimerasa vírica es suministrada por las cepas huésped BL2 1 (DE3) o HMS174 (DE3) de un profago residente que porta un gen *gnl* de T7 bajo el control transcripcional del promotor *lacUV.5*.

45 Una estrategia para maximizar la expresión de polipéptidos recombinantes en *E. coli* es expresar el polipéptido en una bacteria huésped con una capacidad alterada de cortar proteolíticamente el polipéptido recombinante (Gottesman S., Methods Enzymol. 185:119-128, 1990). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico que debe insertarse en un vector de expresión de manera que los codones individuales de cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada *et al.*, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118, 1992). Dicha alteración de secuencias de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo mediante técnicas estándares de síntesis de ADN.

50 El vector de expresión de PD-L2 puede ser un vector de expresión de levadura. Entre los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* se incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.*, EMBO J. 6:229-234, 1987), pMFa (Kurjan y Herskowitz, Cell 30:933-943, 1982), pJRY88 (Schultz *et al.*, Gene 54:113-123, 1987), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).

60 Alternativamente, pueden expresarse polipéptidos PD-L2 en células de insecto utilizando vectores de expresión baculovíricos. Los vectores baculovirus disponibles para la expresión de polipéptidos en células de insecto en cultivo (por ejemplo células Sf9) incluyen la serie pAc (Smith *et al.*, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165, 1983) y la serie pVL (Lucklow y Summers, Virology 170:31-39, 1989).

Puede expresarse un ácido nucleico en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Entre

los ejemplos de vectores de expresión de mamífero se incluyen pCDM8 (Seed B., Nature 329:840, 1987), y pMT2PC (Kaufman *et al.*, EMBO J. 6:187-195, 1987). Utilizado en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión con frecuencia son proporcionadas por los elementos reguladores del virus. Por ejemplo, los promotores utilizados comúnmente se derivan del poliovirus, del adenovirus 2, del citomegalovirus y del virus 40 del simio. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procarióticas como eucarióticas, ver los capítulos 16 y 17 de Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

En otra realización, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo celular particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos de la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido adecuados se incluyen el promotor albúmina (específica del hígado; Pinkert *et al.*, Genes Dev. 1:268-277, 1987), los promotores específicos linfoides (Calame y Eaton, Adv. Immunol. 43:235-275, 1988), promotores particulares de receptores de células T (Winoto y Baltimore, EMBO J. 8:729-733, 1989) e inmunoglobulinas (Banerji *et al.*, Cell 33:729-740, 1983; Queen y Baltimore, Cell 33:741-748, 1983), promotores específicos de neuronas (por ejemplo el promotor de neurofilamento; Byrne y Ruddle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477, 1989), promotores específicos de páncreas (Edlund *et al.*, Science 230:912-916, 1985) y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo el promotor del suero lácteo; patente US nº 4.873.316 y solicitud de patente europea nº de publicación 264.166). Los promotores regulados por el desarrollo también se encuentran comprendidos, por ejemplo los promotores *hox* murinos (Kessel y Gruss, Science 249:374-379, 1990) y el promotor de  $\alpha$ -fetoproteína (Campes y Tilghman, Genes Dev. 3:537-546, 1989).

La invención proporciona además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN se encuentra operablemente ligada a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (mediante transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN de orientación antisentido respecto al ARNm de PD-L2. Pueden seleccionarse secuencias reguladoras operablemente ligadas a una molécula de ácidos nucleicos clonada en la orientación antisentido que dirigen la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una diversidad de tipos celulares, por ejemplo promotores y/o intensificadores víricos, o pueden seleccionarse secuencias reguladoras que dirigen la expresión constitutiva específica de tejido o de tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede encontrarse en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, la actividad del cual puede estar determinada por el tipo celular en el que se ha introducido el vector. Para un comentario de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido, ver Weintraub H. *et al.*, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews -Trends in Genetics 1(1), 1986.

Otro aspecto de la invención se refiere a células huésped en las que se introduce una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2, por ejemplo una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2 dentro de un vector de expresión recombinante o una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2 que contiene secuencias que le permiten recombinarse homológamente en un sitio específico del genoma de la célula huésped. Las expresiones "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se utilizan intercambiamente en la presente memoria. Debe entenderse que dichas expresiones se refieren no sólo a la célula sujeto particular, sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie podría no ser, de hecho, idéntica a la célula parental; sin embargo, todavía se encuentra incluida dentro del alcance de la expresión tal como se utiliza en la presente memoria.

Una célula huésped puede ser una célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, puede expresarse un polipéptido PD-L2 en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levadura o de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). El experto en la materia conocerá otras células huésped adecuadas.

Puede introducirse ADN de vector en células procarióticas o eucarióticas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una diversidad de procedimientos reconocidos de la técnica para la introducción de ácidos nucleicos foráneos (por ejemplo ADN) en una célula huésped, incluyendo la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección o la electroporación. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de las células de mamífero, es conocido que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, sólo una fracción pequeña de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un



marcador seleccionable (por ejemplo de resistencia a antibióticos) en las células huésped conjuntamente con el gen de interés. Entre los marcadores seleccionables preferentes se incluyen aquellos que proporcionan resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Pueden introducirse ácidos nucleicos codificantes de un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el codificante de un polipéptido PD-L2 ó pueden introducirse en vectores separados. Las células establemente transfectadas con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante la selección con un fármaco (por ejemplo, las células que hayan incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las demás células morirán).

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariótica o eucariótica en cultivo, puede utilizarse para producir (es decir, expresar) un polipéptido PD-L2. También se dan a conocer métodos para producir un polipéptido PD-L2 utilizando las células huésped descritas en la presente memoria. En un aspecto, el método comprende cultivar la célula huésped (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante codificante de un polipéptido PD-L2) en un medio adecuado, de manera que se produzca un polipéptido PD-L2. En otro aspecto, el método comprende además aislar un polipéptido PD-L2 a partir del medio o de la célula huésped.

Las células huésped también pueden utilizarse para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, una célula huésped es un oocito fertilizado o una célula madre embrionaria en la que se han introducido secuencias codificantes de PD-L2. Dichas células huésped pueden utilizarse para crear animales transgénicos no humanos en los que se han introducido secuencias de PD-L2 exógenas en su genoma o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado secuencias de PD-L2 endógenas. Dichos animales resultan útiles para estudiar la función y/o actividad de PD-L2 y para identificar y/o evaluar los moduladores de la actividad de PD-L2. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal transgénico" es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un roedor, tal como una rata o un ratón, en el que una o más de las células del animal incluyen un transgén. Entre otros ejemplos de animales transgénicos se incluyen primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios y similares. Un transgén es ADN exógeno que se integra en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo de esta manera la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del animal transgénico. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal recombinante homólogo" se refiere a un tipo de animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que un gen de PD-L2 endógeno ha sido alterado mediante recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida en una célula del animal, por ejemplo una célula embrionaria del animal, previamente al desarrollo del mismo.

Puede crearse un animal transgénico mediante la introducción de un ácido nucleico codificante de PD-L2 en los pronúcleos masculinos de un oocito fertilizado, por ejemplo mediante microinyección o infección retroviral, y permitir que el oocito se desarrolle en un animal hembra nodriza pseudogestante. Puede introducirse la secuencia de ADNc de PD-L2 de SEQ ID NO: 1 ó nº 4 en forma de transgén en el genoma de un animal no humano. Alternativamente, puede utilizarse como transgén un homólogo no humano de un gen PD-L2 humano, tal como un gen PD-L2 de ratón o de rata. Alternativamente, puede aislarse un homólogo del gen PD-L2, tal como otro miembro de la familia de PD-L2, basándose en la hibridación con las secuencias de ADNc de PD-L2 de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6 (descritas adicionalmente en la subsección I, anteriormente) y utilizarse como transgén. También pueden incluirse secuencias intrónicas y señales de poliadenilación en el transgén para incrementar la eficiencia de la expresión del transgén. Puede ligarse operablemente una o más secuencias reguladoras específicas de tejido a un transgén PD-L2 para dirigir la expresión de un polipéptido PD-L2 a células particulares. Los métodos para generar animales transgénicos mediante manipulación y microinyección embrionarias, particularmente animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 4.736.866 y nº 4.870.009, ambos de Leder *et al.*, patente US nº 4.873.191, de Wagner *et al.* y en Hogan B., *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Se utilizan métodos similares para la producción de otros animales transgénicos. Puede identificarse un animal fundador transgénico basándose en la presencia de un transgén PD-L2 en su genoma y/o en la expresión de ARNm de PD-L2 en tejidos o células de los animales. A continuación, puede utilizarse un animal fundador transgénico para generar animales adicionales que porten el transgén. Además, los animales transgénicos que portan un transgén codificante de un polipéptido PD-L2 pueden cruzarse adicionalmente con otros animales transgénicos que porten otros transgenes.

Para crear un animal recombinante homólogo, se prepara un vector que contenga por lo menos una parte de un gen PD-L2 en el que se ha introducido una delección, una adición o una sustitución para alterar, por ejemplo para interrumpir funcionalmente, de esta manera el gen PD-L2. El gen PD-L2 puede ser un gen humano (por ejemplo el ADNc de SEQ ID NO: 1 ó nº 3), aunque más preferentemente, es un homólogo no humano de un gen PD-L2 humano (por ejemplo un ADNc aislado mediante hibridación restrictiva con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6). Por ejemplo, puede utilizarse un gen PD-L2 de ratón (por ejemplo el ADNc de SEQ ID NO: 3 ó nº 6) para construir una molécula de ácidos nucleicos de recombinación homóloga, por ejemplo un vector, adecuado para alterar un gen PD-L2 endógeno en el genoma del ratón. La molécula de ácidos nucleicos de recombinación homóloga puede diseñarse de manera que, con la recombinación homóloga, el gen PD-L2 endógeno resulte funcionalmente interrumpido (es decir, ya no codifique un polipéptido funcional; también denominado vector "inactivado"). Alternativamente, la molécula de ácidos nucleicos de recombinación homóloga puede diseñarse de

manera que, con la recombinación homóloga, el gen PD-L2 endógeno se mute, o se altere de otra manera, pero siga codificando el polipéptido funcional (por ejemplo la región reguladora situada cadena arriba puede alterarse para que altere de esta manera la expresión del polipéptido PD-L2 endógeno). En la molécula de ácidos nucleicos de recombinación homóloga, la parte alterada del gen PD-L2 se encuentra flanqueada en sus extremos 5' y 3' por una secuencia adicional de ácidos nucleicos del gen PD-L2 que permite que se produzca la recombinación homóloga entre el gen PD-L2 exógeno que porta la molécula de ácidos nucleicos de recombinación homóloga y un gen PD-L2 endógeno en una célula, por ejemplo una célula madre embrionaria. La secuencia de ácidos nucleicos de PD-L2 flanqueante adicional es de longitud suficiente para la recombinación homóloga con éxito con el gen endógeno. Típicamente se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante (en los extremos tanto 5' como 3') en la molécula de ácidos nucleicos de recombinación homóloga (ver, por ejemplo, Thomas K.R. y Capecchi M.R., *Cell* 51:503, 1987, para una descripción de los vectores de recombinación homóloga). La molécula de ácidos nucleicos de recombinación homóloga se introduce en una célula, por ejemplo en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el gen PD-L2 introducido se ha recombinado homológamente con el gen PD-L2 endógeno (ver, por ejemplo, Li E. *et al.*, *Cell* 69:915, 1992). A continuación, las células seleccionadas pueden inyectarse en un blastocito de un animal (por ejemplo un ratón) para formar quimeras de agregación (ver, por ejemplo, Bradley A., en: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, E.J., editor (IRL, Oxford, 1987) páginas 113 a 152). Seguidamente puede implantarse un embrión quimérico en un animal nodriza hembra pseudogestante adecuado y llevarse a término el embrión. La progenie que porta el ADN recombinado homológamente en sus células germinales puede utilizarse para generar animales en los que la totalidad de las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente mediante transmisión del transgén por la línea germinal. Los métodos para construir moléculas de ácidos nucleicos de recombinación homóloga, por ejemplo vectores o animales de recombinación homóloga, se describen en mayor detalle en Bradley A., *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829, 1991, y en las solicitudes de patente internacional PCT nº de publicación WO 90/11354, de Le Mouellec *et al.*; en las solicitudes de patente nº WO 91/01140, de Smithies *et al.*; nº WO 92/0968, de Zijlstra *et al.*, y nº WO 93/04169, de Berns *et al.*

Pueden producirse animales no humanos transgénicos que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de dicho sistema es el sistema de recombinasa cre/loxP del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema de recombinasa cre/loxP, ver, por ejemplo, Lakso *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236, 1992. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *S. cerevisiae* (O'Gorman *et al.*, *Science* 251:1351-1355, 1991. En el caso de que se utilice un sistema de recombinasa cre/loxP para regular la expresión del transgén, resultan necesarios animales que contengan transgenes codificantes tanto de la recombinasa Cre como de un polipéptido seleccionado. Dichos animales pueden proporcionarse mediante la construcción de animales "doblemente" transgénicos, por ejemplo cruzando dos animales transgénicos, uno que contenga un transgén codificante de un polipéptido seleccionado, y conteniendo el otro un transgén codificante de una recombinasa.

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos en la presente memoria también pueden producirse según los métodos descritos en Wilmut I. *et al.*, *Nature* 385:810-813, 1997, y en las solicitudes de patente internacional PCT nº de publicación WO 97/07668 y nº WO 97/07669. Brevemente, puede aislarse una célula, por ejemplo una célula somática, del animal transgénico, e inducirse su salida del ciclo de crecimiento y su entrada en la etapa G<sub>0</sub>. A continuación, la célula quiescente puede fusionarse, por ejemplo mediante la utilización de pulsos eléctricos, con un oocito enucleado procedente de un animal de la misma especie de la que se ha aislado la célula quiescente. Seguidamente, el oocito reconstruido se cultiva de manera que se desarrolle hasta el estadio de mórulo o de blastocito y después se transfiere a un animal hembra nodriza pseudogestante. La progenie de este animal hembra nodriza será un clon del animal a partir del que se ha aislado la célula, por ejemplo una célula somática.

#### IV. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de PD-L2, por ejemplo las moléculas de ácidos nucleicos de PD-L2, los fragmentos de polipéptidos PD-L2 y los anticuerpos anti-PD-L2 (también denominados en la presente memoria "compuestos activos" o "agentes moduladores") de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones típicamente comprenden la molécula de ácidos nucleicos, el polipéptido o el anticuerpo y un portador, por ejemplo un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida de la técnica. Excepto en la medida en que cualesquiera medios o agentes convencionales sean incompatibles con el compuesto activo, la utilización de los mismos en las composiciones se encuentra contemplada. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que resulte compatible con su vía de administración prevista. Entre los ejemplos de vías de administración se incluyen la parenteral, por ejemplo intravenosa,

intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo mediante inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenes; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido hidrocórico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis realizados en vidrio o plástico.

Entre las composiciones farmacéuticas adecuadas para la utilización inyectable se incluyen soluciones acuosas estériles (en caso de ser solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, entre los portadores adecuados se incluyen la solución salina fisiológica, el agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que se mantenga una fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenes, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante incorporación del compuesto activo (por ejemplo agentes moduladores, tales como una molécula de ácidos nucleicos de PD-L2, un fragmento de un polipéptido PD-L2, un anticuerpo anti-PD-L2 ó una combinación de un anticuerpo anti-PD-L2 y un anticuerpo anti-PD-L1) en la cantidad necesaria en un solvente apropiado con uno de los ingredientes indicados anteriormente o con una combinación de los mismos, según resulte necesario, seguido de la esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de entre los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación con el secado al vacío y la liofilización, la cual rinde unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente esterilizada mediante filtración.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de tabletas, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un portador líquido para la utilización como lavado bucal, en las que el compuesto en el portador líquido se aplica oralmente y se enjuaga en la boca y se expectora o se traga. Pueden incluirse como parte de la composición agentes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de naturaleza similar: un ligante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un glidante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como hierbabuena, salicilato de metilo o saborizante naranja.

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

La administración sistémica también puede realizarse por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados a la barrera que debe permearse. Dichos penetrantes son generalmente conocidos de la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal puede llevarse a cabo mediante la utilización de sprays nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, tal como es generalmente conocido de la técnica.

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

5 Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegen el compuesto frente a la rápida eliminación del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas microencapsulados de administración. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones resultarán evidentes para el experto en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y de Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden utilizarse 10 suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas utilizando anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 4.522.811.

15 Resulta especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para una fácil administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que debe tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitaria de la invención está dictada, y es directamente dependiente, de las características únicas del 20 compuesto activo y del efecto terapéutico particular que debe conseguirse, y de las limitaciones inherentes en la técnica a la formación de un compuesto con dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

25 La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo para determinar la LD50 (la dosis letal para 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Los compuestos que muestran índices terapéuticos elevados resultan preferentes. Aunque pueden utilizarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe procurarse diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar los daños potenciales a 30 las células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de los estudios animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosis para la utilización en el ser humano. La dosificación de dichos compuestos se encuentra comprendida preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED50 con poca o 35 ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de dicho intervalo dependiendo de la forma de dosificación y vía de administración utilizadas. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que alcanza la mitad de la inhibición máxima de los 40 síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en el ser humano. Pueden medirse los niveles en plasma, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

45 Tal como se define en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína o polipéptido (es decir, una dosis efectiva) se encuentra comprendida entre 0,001 y 30 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,01 y 25 mg/kg de peso corporal, más preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg, entre 2 y 9 mg/kg, entre 3 y 8 mg/kg, entre 4 y 7 mg/kg o entre 5 y 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir sobre la dosis requerida para tratar con efectividad un sujeto, incluyendo, 50 aunque sin limitarse a ellos, la severidad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, el estado general de salud y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína, polipéptido o anticuerpo puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

55 En un ejemplo preferente, un sujeto se trata con anticuerpo, proteína o polipéptido en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente durante 2 a 8 semanas, más preferentemente durante aproximadamente 3 a 7 semanas, y todavía más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. También se apreciará que la dosis efectiva de anticuerpo, proteína o polipéptido utilizada para el tratamiento puede incrementarse o reducirse durante 60 el curso de un tratamiento particular. Pueden resultar cambios de la dosis y ponerse de manifiesto en los resultados de los ensayos diagnósticos descritos en la presente memoria.

La presente invención comprende agentes que modulan la expresión o la actividad de PD-L2. Un agente puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña. Por ejemplo, entre dichas moléculas pequeñas se incluyen, aunque sin

limitarse a ellas, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) con un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos con un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos con un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos con un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos. Se entiende que las dosis apropiadas de agentes de molécula pequeña dependen de varios factores comprendidos dentro del alcance de los conocimientos del médico, veterinario o investigador ordinario. La dosis o las dosis de la molécula pequeña variarán, por ejemplo, dependiendo de la identidad, tamaño y condición del sujeto o muestra bajo tratamiento, dependiendo además de la vía por la que debe administrarse la composición, en su caso, y el efecto que el médico desee que presente la molécula pequeña sobre el ácido nucleico o polipéptido.

Entre las dosis ejemplares se incluyen cantidades de miligramos o microgramos de la molécula pequeña por cada kilogramo de peso de sujeto o de muestra (por ejemplo entre 1 microgramo por kilogramo y aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, entre aproximadamente 100 microgramos por kilogramo y aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o entre aproximadamente 1 microgramo por kilogramo y aproximadamente 50 microgramos por kilogramo). Se entiende además que las dosis apropiadas de una molécula pequeña dependen de la potencia de la molécula pequeña con respecto a la expresión o actividad que debe modularse. Dichas dosis apropiadas pueden determinarse utilizando los ensayos descritos en la presente memoria. En el caso de que deba administrar una o más de dichas moléculas pequeñas en un animal (por ejemplo un ser humano) para modular la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico, un médico, veterinario o investigador puede, por ejemplo, prescribir una dosis relativamente baja inicialmente, incrementando posteriormente la dosis hasta obtener una respuesta apropiada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal particular dependerá de una diversidad de factores, entre ellos la actividad del compuesto específico utilizado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad que debe modularse.

Además, puede conjugarse un anticuerpo (o fragmento del mismo) con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion de metal radioactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que resulte perjudicial para las células. Entre los ejemplos se incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Entre los agentes terapéuticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-decarbazona), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa-clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), cicfosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada; la fracción fármaco no debe interpretarse como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción fármaco puede ser una proteína o polipéptido que presenta una actividad biológica deseada. Entre dichos polipéptidos pueden incluirse, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral,  $\alpha$ -interferón,  $\beta$ -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina 1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleuquina 6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas; ver, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en: *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (editores), páginas 243 a 256 (Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en: *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson *et al.*, (editores), páginas 623 a 653 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en: *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.*, (editores), páginas 475 a 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en: *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.*, (editores), páginas 303 a 316 (Academic Press, 1985); y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58, 1982. Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos, tal como describe Segal en la patente US nº 4.676.980.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden insertarse en vectores y utilizarse como vectores de terapia génica. Los

5 vectores de terapia génica pueden administrarse en un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (ver la patente US nº 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (ver, por ejemplo, Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057, 1994). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incluye el vehículo de administración génica. Alternativamente, en el caso de que el vector de administración génica completo pueda producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador conjuntamente con instrucciones para la administración.

#### V. Usos y métodos de la invención

15 Las moléculas de PD-L2, por ejemplo las moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos, homólogos de polipéptidos y anticuerpos de PD-L2 indicados en la presente memoria pueden utilizarse en uno o más de los métodos siguientes: a) ensayos de cribado, b) medicina predictiva (por ejemplo ensayos diagnósticos, ensayos pronósticos y seguimiento de pruebas clínicas), y c) métodos de tratamiento (por ejemplo terapéuticos y profilácticos, por ejemplo la modulación positiva o negativa de la respuesta inmunológica). Tal como se indica en la presente memoria, un polipéptido PD-L2 de la invención presenta una o más de las actividades siguientes: 1) unirse y/o modular la actividad de su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, 2) modular la señalización intracelular o intercelular, 3) modular la activación de los linfocitos T, 4) modular la respuesta inmunológica de un organismo, por ejemplo un organismo de mamífero tal como un ratón o ser humano.

25 Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, para expresar el polipéptido PD-L2 (por ejemplo mediante un vector de expresión recombinante en una célula huésped en aplicaciones de terapia génica), para detectar el ARNm de PD-L2 (por ejemplo en una muestra biológica) o una alteración genética en un gen PD-L2, y para modular la actividad de PD-L2, tal como se describe en mayor detalle posteriormente. Los polipéptidos PD-L2 pueden utilizarse para tratar condiciones o trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de un polipéptido PD-L2 o la producción de inhibidores de PD-L2. Además, los polipéptidos PD-L2 pueden utilizarse para cribar para una o más parejas de unión de PD-L2 naturales (además de PD-1), para cribar para fármacos o compuestos que modulan la actividad de PD-L2, así como para tratar condiciones o trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva del polipéptido PD-L2 o la producción de formas de polipéptido PD-L2 que presentan una actividad reducida, aberrante o no deseada en comparación con el polipéptido PD-L2 de tipo salvaje (por ejemplo trastornos del sistema inmunológico tales como inmunodeficiencia combinada severa, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo I, síndrome linfoproliferativo, enfermedad intestinal inflamatoria, alergias, asma, enfermedad del injerto contra el huésped y rechazo del trasplante; respuestas inmunológicas a patógenos infecciosos tales como bacterias y virus, y cánceres del sistema inmunológico tales como linfomas y leucemias). Además, los anticuerpos anti-PD-L2 pueden utilizarse para detectar y aislar polipéptidos PD-L2, regular la biodisponibilidad de polipéptidos PD-L2 y modular la actividad de PD-L2, por ejemplo mediante la modulación de la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales (por ejemplo PD-1).

#### A. Ensayos de cribado:

45 La memoria describe un método (también denominado en la presente memoria "ensayo de cribado") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes de ensayo o candidatos (por ejemplo péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen a polipéptidos PD-L2, presentan un efecto estimulador o inhibidor de, por ejemplo, la expresión o actividad de PD-L2, o presentan un efecto estimulador o inhibidor de la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1.

50 La memoria describe ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a la proteína o polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo, por ejemplo que modulan la capacidad del polipéptido PD-L2 de interactuar con su pareja o parejas de unión naturales. En un aspecto preferente, la pareja de unión es PD-1. En otro aspecto, la invención describe ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que se unen o modulan la actividad de una proteína o polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo (por ejemplo análogos de cofactor o coenzima, o moléculas inhibitoras).

60 La invención describe ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que presentan un efecto estimulador o inhibidor de la interacción entre PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales. En un aspecto ejemplar, la pareja de unión es PD-1. Los compuestos de ensayo de la presente invención pueden obtenerse utilizando cualquiera de los numerosos enfoques de los métodos de biblioteca combinaria conocidos de la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas, bibliotecas paralelas en fase sólida o en solución espacialmente direccionables, métodos de biblioteca sintéticos que requieren deconvolución, el método de la biblioteca de "una perla un compuesto", y los métodos de biblioteca sintéticos que utilizan la selección mediante cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica

se encuentra limitado a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos de péptidos, de oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas (Lam K.S., *Anticancer Drug Des.* 12:145, 1987).

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

10 Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo Houghten, *Biotechniques* 13:412-421, 1992) o sobre perlas (Lam, *Nature* 354:82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364:555-556, 1993), bacterias (Ladner, patente US nº 5.223.409), esporas (Ladner, patente US nº 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869, 1992) o fagos (Scott y Smith, *Science* 249:386-390, 1990; Devlin, *Science* 249:404-406, 1990; Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222:301-310, 1991; Ladner, *supra*).

15 Un ensayo puede ser un ensayo de tipo celular en el que una célula que expresa un polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo se pone en contacto con un compuesto de ensayo, y se determina la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de PD-L2. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de PD-L2 puede realizarse mediante seguimiento, por ejemplo, de la capacidad de PD-L2 de unirse a su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, y de modular la actividad de las células inmunológicas. La célula inmunológica puede ser, por ejemplo, una célula T, una célula B o una célula mieloide. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la unión de PD-L2 a PD-1 puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante acoplamiento de PD-1 con un isótopo radioactivo o marcaje enzimático, de manera que la unión de PD-1 a PD-L2 puede determinarse mediante detección de PD-1 marcado en un complejo. Alternativamente, PD-L2 podría acoplarse con un isótopo radioactivo o un marcaje enzimática para realizar un seguimiento de la capacidad de un compuesto de ensayo de modular la unión de PD-L2 a PD-1 en un complejo. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de unirse a PD-L2 puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante acoplamiento del compuesto con un isótopo radioactivo o marcaje enzimático, de manera que la unión del compuesto a PD-L2 puede determinarse mediante detección del compuesto PD-L2 marcado en un complejo. Por ejemplo, pueden marcarse compuestos (por ejemplo PD-1) con <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>3</sup>H, directa o indirectamente, y detectarse el isótopo radioactivo mediante recuento directo de la radioemisión o mediante recuento de centelleo. Alternativamente, los compuestos pueden marcarse enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcaje enzimático detectarse mediante determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

20 También se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención determinar la capacidad de un compuesto (por ejemplo PD-1) de interactuar con PD-L2 sin el marcaje de ninguno de las especies interactuantes. Por ejemplo, puede utilizarse un microfisiómetro para detectar la interacción de un compuesto con PD-L2 sin el marcaje del compuesto o de PD-L2 (McConnell H.M. *et al.*, *Science* 257:1906-1912, 1992). Tal como se utiliza en la presente memoria, un "microfisiómetro" (por ejemplo Cytosensor) es un instrumento analítico que mide la tasa a la que una célula acidifica su ambiente utilizando un sensor potenciométrico direccionable con luz (LAPS). Los cambios de dicha tasa de acidificación pueden utilizarse como indicadores de la interacción entre un compuesto y PD-L2.

25 Un ensayo puede ser un ensayo basado en células que comprenda poner en contacto una célula que expresa una pareja de unión de PD-L2 con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de modular (por ejemplo de estimular o inhibir) la actividad de la pareja de unión de PD-L2. En un aspecto preferente, la pareja de unión es PD-1. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de una pareja de unión de PD-L2 puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad del polipéptido PD-L2 de unirse o interactuar con la pareja de unión de PD-L2.

30 La determinación de la capacidad del polipéptido PD-L2, o de un fragmento biológicamente activo del mismo, de unirse o de interactuar con una pareja de unión de PD-L2, por ejemplo PD-1, puede llevarse a cabo mediante uno de los métodos indicados anteriormente para la determinación de la unión directa. La determinación de la capacidad del polipéptido PD-L2 de unirse o de interactuar con una pareja de unión de PD-L2 puede llevarse a cabo determinando la actividad de la pareja de unión. Por ejemplo, la actividad de la pareja de unión puede determinarse mediante la detección de la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo la actividad de tirosina quinasa o de fosfatasa), la detección de actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, la detección de la inducción de un gen informador (que comprende un elemento regulador sensible a la diana operablemente ligado a un ácido nucleico codificante de un marcador detectable, por ejemplo luciferasa), o detectar una respuesta celular regulada por la diana. Por ejemplo, la determinación de la capacidad del polipéptido PD-L2 de unirse o de interactuar con una pareja de unión de PD-L2 natural, por ejemplo PD-1, puede llevarse a cabo mediante la medición de la capacidad de un compuesto de modular la coestimulación o inhibición de las células inmunológicas en un ensayo de proliferación, o mediante interferencia con la capacidad de un polipéptido PD-L2 de unirse a anticuerpos que reconocen una parte

del polipéptido PD-L2. Los compuestos que modulan la activación de las células T pueden identificarse mediante la determinación de la capacidad de un compuesto de modular la proliferación de las células T o la producción de citoquinas. Los compuestos que modulan la activación de las células T pueden identificarse mediante la determinación de la capacidad de un compuesto de modular la proliferación de las células T o la producción de citoquinas a más de una concentración de antígeno.

Un ensayo de la presente invención es un ensayo sin células en el que un polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo se pone en contacto con un compuesto de ensayo, y se determina la capacidad del compuesto de unirse al polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activo del mismo. Las partes biológicamente activas preferentes de los polipéptidos PD-L2 destinados a la utilización en ensayos de la presente invención incluyen fragmentos que participan en interacciones con moléculas no PD-L2, por ejemplo por lo menos una parte de un dominio extracelular que se une a una pareja de unión de PD-L2. En un aspecto preferente adicional, la pareja de unión es PD-1. La unión del compuesto de ensayo al polipéptido PD-L2 puede determinarse directa o indirectamente tal como se ha indicado anteriormente. El ensayo incluye poner en contacto el polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo con un compuesto conocido que se une a PD-L2 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de interactuar con un polipéptido PD-L2, en el que la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de interactuar con un polipéptido PD-L2 comprende determinar la capacidad del compuesto de ensayo de unirse preferentemente a PD-L2 ó a una parte biológicamente activa del mismo en comparación con el compuesto conocido.

Un ensayo puede ser un ensayo sin células en el que un polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activa del mismo se pone en contacto con un compuesto de ensayo, y se determina la capacidad del compuesto de ensayo de modular (por ejemplo de estimular o inhibir) la actividad del polipéptido PD-L2 ó parte biológicamente activo del mismo. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de un polipéptido PD-L2 puede llevarse a cabo, por ejemplo, determinando la capacidad del polipéptido PD-L2 de unirse a una pareja de unión de PD-L2 mediante uno de los métodos indicados anteriormente para la determinación de la unión directa. En un aspecto preferente, la pareja de unión es PD-1. La determinación de la capacidad del polipéptido PD-L2 de unirse a una pareja de unión de PD-L2 también puede llevarse a cabo utilizando una tecnología, tal como el análisis de interacción biomolecular (BIA) en tiempo real (Sjolander S. y Urbaniczky C., Anal. Chem. 63:2338-2345, 1991; Szabo *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705, 1995). Tal como se utiliza en la presente memoria, "BIA" es una tecnología para estudiar las interacciones bioespecíficas en tiempo real sin marcaje de ninguno de las especies interactuantes (por ejemplo BIAcore). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia del plasmón superficial (SPR) pueden utilizarse como indicación de las reacciones en tiempo real entre las moléculas biológicas.

La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de un polipéptido PD-L2 puede llevarse a cabo determinando la capacidad del polipéptido PD-L2 de modular adicionalmente la actividad de un efector cadena abajo de una pareja de unión de PD-L2 (por ejemplo un efecto cadena abajo de PD-1). Por ejemplo, puede determinarse la actividad de la molécula efectora sobre una diana apropiada o puede determinarse la unión del efecto a una diana apropiada tal como se ha indicado anteriormente.

Los ensayos sin células de la presente invención permiten la utilización de formas solubles y/o unidas a membranas de polipéptidos (por ejemplo polipéptidos PD-L2 ó partes biológicamente activas de los mismos, o parejas de unión a la que se une PD-L2, por ejemplo PD-1). En el caso de ensayos sin células en los que se utilice una forma unida a membrana de un polipéptido (por ejemplo PD-L2 de superficie celular), puede resultar deseable utilizar un agente solubilizador de manera que la forma unida a membrana del polipéptido se mantenga en solución. Entre los ejemplos de dichos agentes solubilizadores se incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton<sup>®</sup> X-100, Triton<sup>®</sup> X-114, Thesit<sup>®</sup>, isotridecipoli(éter de etilenglicol)<sub>n</sub>, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO) o sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano.

En más de uno de los métodos de ensayo anteriormente indicados de la presente invención, puede resultar deseable inmovilizar PD-L2 ó su pareja de unión con el fin de facilitar la separación de formas acomplejadas de las no completadas de uno de los polipéptidos o ambos, así como para permitir la automatización del ensayo. En un aspecto preferente, la pareja de unión es PD-1. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido PD-L2, o la interacción de un polipéptido PD-L2 con su pareja de unión en presencia o en ausencia de un compuesto candidato, puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Entre los ejemplos de dichos recipientes se incluyen las placas de microtitulación, las probetas y los tubos de microcentrífuga. Puede proporcionarse una proteína de fusión que añada un dominio que permita que uno de los polipéptidos o ambos se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/PD-L2 o las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/pareja de unión pueden adsorberse sobre perlas de glutatión-sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que seguidamente se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo más el polipéptido pareja de unión no adsorbido o el polipéptido



PD-L2, y la mezcla se incuba bajo condiciones que permitan la formación de complejo (por ejemplo bajo condiciones fisiológicas salinas y de pH). Tras la incubación, las perlas o pocillos de placa de microtitulación se lavan para eliminar cualesquier componentes no unidos, la matriz se inmoviliza en el caso de las perlas y se determina la formación de complejo directa o indirectamente, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente.

5 Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz y determinarse el nivel de unión o actividad de PD-L2 utilizando técnicas estándares.

También pueden utilizarse otras técnicas para inmovilizar polipéptidos sobre matrices en los ensayos de cribado de la invención. Por ejemplo, puede inmovilizarse un polipéptido PD-L2 ó una pareja de unión de PD-L2 utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. En una realización preferente, la pareja de unión es PD-1. Puede prepararse polipéptido PD-L2 biotinilado o parejas de unión, a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) utilizando técnicas conocidas de la técnica (por ejemplo kit de biotinilación de Pierce Chemicals, Rockford, IL) e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos que reaccionan con el polipéptido PD-L2 ó sus parejas de unión pero que no interfieren con la unión del polipéptido PD-L2 con su pareja de unión pueden derivatizarse con los pocillos de la placa y la pareja de unión o el polipéptido PD-L2 no unidos resultan atrapados en los pocillos mediante conjugación con el anticuerpo. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los indicados anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con el polipéptido PD-L2 ó pareja de unión, así como ensayos ligados a enzima que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada al polipéptido PD-L2 ó pareja de unión.

La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de un polipéptido PD-L2 puede llevarse a cabo determinando la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de una molécula que actúa cadena abajo de PD-L2, por ejemplo mediante la interacción con el dominio citoplasmático de una pareja de unión de PD-L2, por ejemplo PD-1. Por ejemplo, los niveles de segundos mensajeros, la actividad de la molécula interactuante sobre una diana apropiada, o la unión de la especie interactuante a una diana apropiada pueden determinarse tal como se ha indicado anteriormente.

Los moduladores de la expresión de PD-L2 se identifican en un método en el que se pone en contacto una célula con un compuesto candidato y se determina la expresión de ARNm o polipéptido de PD-2 en la célula. El nivel de expresión de ARNm o polipéptido de PD-L2 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de ARNm o polipéptido de PD-L2 en ausencia del compuesto candidato. A continuación, el compuesto candidato puede identificarse como modulador de la expresión de PD-L2 basándose en dicha comparación. Por ejemplo, en el caso de que la expresión de ARNm o polipéptido de PD-L2 sea mayor (mayor en grado estadísticamente significativo) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, se identifica el compuesto candidato como estimulador de la expresión de ARNm o polipéptido de PD-L2. Alternativamente, en el caso de que la expresión de ARNm o polipéptido de PD-L2 sea inferior (inferior en grado estadísticamente significativo) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, se identifica el compuesto candidato como inhibidor de la expresión de ARNm o polipéptido de PD-L2. El nivel de expresión de ARNm o polipéptido de PD-L2 en las células puede determinarse mediante métodos descritos en la presente memoria para la detección de ARN o polipéptido de PD-L2.

En todavía otro aspecto de la invención, los polipéptidos PD-L2 pueden utilizarse como "proteínas cebo" en un ensayo de dos híbridos o en un ensayo de tres híbridos (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.283.317; Zervos *et al.*, Cell 72:223-232, 1993; Madura *et al.*, J. Biol. Chem. 268:12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, Biotechniques 14:920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, Oncogene 8:1693-1696, 1993; y Brent, solicitud de patente WO nº 94/10300), con el fin de identificar otros polipéptidos que se unen o interactúan con PD-L2 ("proteínas de unión a PD-L2", "parejas de unión de PD-L2" o "PD-L2-bp") y participan en la actividad de PD-L2. Un ejemplo de dicha proteína de unión es PD-1. Dichas proteínas de unión a PD-L2 también participan probablemente en la propagación de señales por parte de los polipéptidos PD-L2 o dianas PD-L2 tales como, por ejemplo, elementos cadena abajo de una ruta de señalización mediada por PD-L2. Alternativamente, dichos polipéptidos de unión a PD-L2 pueden ser inhibidores de PD-L2.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de factores de transcripción, que consiste de dominios de unión a ADN y de activación separables. Brevemente, el ensayo utiliza dos constructos de ADN diferentes. En un constructo, el gen que codifica un polipéptido PD-L2 se fusiona con un gen codificante del dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN, procedente de una biblioteca de secuencias de ADN, que codifica un polipéptido no identificado ("presa" o "muestra") se fusiona con un gen que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. En el caso de que resulte posible la interacción de los polipéptidos "cebo" y "presa", *in vivo*, formando un complejo dependiente de PD-L2, los dominios de unión a ADN y de activación del factor de transcripción se sitúan en estrecha proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen informador (por ejemplo LacZ) que se encuentra operablemente ligado a un sitio regulador de la transcripción sensible al factor de transcripción. La expresión del gen informador puede detectarse y las colonias celulares que contienen el factor de transcripción funcional pueden aislarse y utilizarse para obtener el gen clonado que codifica el polipéptido que interactúa con el polipéptido PD-L2.

En otro aspecto, la invención se refiere a una combinación de dos o más de los ensayos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede identificarse un agente modulador utilizando un ensayo basado en células o sin células, y la capacidad del agente de modular la actividad de un polipéptido PD-L2 puede confirmarse *in vivo*, por ejemplo en un animal tal como un modelo animal de transformación celular y/o tumorigénesis.

La presente invención se refiere además a nuevos agentes identificados mediante los ensayos de cribado anteriormente descritos. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención la utilización adicional de un agente identificado tal como se describe en la presente memoria en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un agente identificado tal como se indica en la presente memoria (por ejemplo un agente modulador de PD-L2, una molécula de ácidos nucleicos antisentido de PD-L2, un anticuerpo específico de PD-L2 ó una pareja de unión de PD-L2) puede utilizarse en un modelo animal para determinar la eficacia, la toxicidad o los efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, puede utilizarse un agente identificado tal como se indica en la presente memoria en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, la presente invención se refiere a usos de nuevos agentes identificados mediante los ensayos de cribado anteriormente indicados para tratamientos tales como los indicados en la presente memoria.

## B. Ensayos de detección

Pueden utilizarse partes o fragmentos de las secuencias de ADNc identificadas en la presente memoria (y las secuencias génicas completas correspondientes) de numerosas maneras a modo de reactivos polinucleótidos. Por ejemplo, dichas secuencias pueden utilizarse para:

(i) localizar sus genes respectivos en un cromosoma y, de esta manera, localizar las regiones génicas asociadas a una enfermedad genética; (ii) identificar un individuo a partir de una muestra biológica mínima (tipado de tejido), e (iii) ayudar en la identificación forense de una muestra biológica. Estas aplicaciones se describen en las subsecciones, posteriormente.

### 1. Mapeado de cromosomas

Tras aislar la secuencia (o una parte de la secuencia) de un gen, esta secuencia puede utilizarse para mapear la localización del gen en un cromosoma. Este procedimiento se denomina mapeado de cromosomas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, pueden utilizarse partes o fragmentos de las secuencias de nucleótidos de PD-L2, descritas en la presente memoria, para mapear la localización de los genes de PD-L2 en un cromosoma. El mapeado de las secuencias de PD-L2 en cromosomas es una importante primera etapa en la correlación de estas secuencias con los genes asociadas a una enfermedad.

Brevemente, los genes de PD-L2 pueden localizarse en cromosomas mediante la preparación de cebadores de PCR (preferentemente de 15 a 25 pb de longitud) a partir de las secuencias de nucleótidos de PD-L2. Puede utilizarse el análisis informático de las secuencias de PD-L2 para predecir los cebadores que no comprenden más de un exón en el ADN genómico, complicando de esta manera el procedimiento de amplificación. Estos cebadores pueden utilizarse seguidamente para el cribado de PCR de los híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Sólo aquellos híbridos que contengan el gen humano correspondiente a las secuencias de PD-L2 rendirán un fragmento amplificado.

Los híbridos de células somáticas se preparan mediante fusión de las células somáticas de diferentes mamíferos (por ejemplo células humanas y de ratón). A medida que los híbridos de células humanas y de ratón crecen y se dividen, gradualmente pierden cromosomas humanos en orden aleatorio, pero retienen los cromosomas de ratón. Mediante la utilización de un medio en el que no puedan crecer las células de ratón, ya que no presentan un enzima particular, pero en el que pueden crecer las células humanas, el único cromosoma humano que contiene el gen codificante del enzima necesario resultará retenido. Mediante la utilización de diversos medios, pueden establecerse paneles de líneas celulares híbridas. Cada línea celular en un panel contiene un único cromosoma humano o un número reducido de cromosomas humanos, y un juego completo de cromosomas de ratón, permitiendo la fácil localización de genes individuales en cromosomas humanos específicos (D'Eustachio P. *et al.*, Science 220:919-924, 1983). Los híbridos de células somáticas que contienen sólo fragmentos de cromosomas humanos también pueden producirse mediante la utilización de cromosomas humanos con traslocaciones y deleciones.

El mapeado de PCR de híbridos de células somáticas es un procedimiento rápido para asignar una secuencia particular a un cromosoma particular. Pueden asignarse tres o más secuencias al día utilizando un único ciclador térmico. Mediante la utilización de secuencias de nucleótidos de PD-L2 para diseñar cebadores oligonucleótidos, puede conseguirse la sublocalización con paneles de fragmentos de cromosomas específicos. Entre otras estrategias de mapeado que de manera similar pueden utilizarse para localizar una secuencia de PD-L2 en su cromosoma se incluyen la hibridación *in situ* (descrita en Fan Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6223-27, 1990), el precribado con cromosomas marcados separados mediante citometría de flujo y la preselección mediante

hibridación con bibliotecas de ADNc específicas de cromosoma.

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de una secuencia de ADN con una extensión cromosómica en metafase puede utilizarse además para proporcionar una localización cromosómica exacta en una etapa. Las extensiones cromosómicas pueden prepararse utilizando células cuya división ha sido bloqueada en metafase con un compuesto químico tal como la colcemida, que altera el huso mitótico. Los cromosomas pueden tratarse brevemente con tripsina y después teñirse con Giemsa. Se desarrolla un patrón de bandas claras y oscuras en cada cromosoma, de manera que pueden identificarse los cromosomas individualmente. La técnica FISH puede utilizarse con una secuencia de ADN de tan sólo 500 ó 600 bases. Sin embargo, los clones de más de 1.000 bases presentan una probabilidad más alta de unión a una única localización cromosómica con una intensidad de señal suficiente para la detección simple. Preferentemente resultan suficientes 1.000 bases, y más preferentemente 2.000 bases, para obtener buenos resultados en un tiempo razonable. Para una revisión de esta técnica, ver Verma *et al.*, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988).

Los reactivos para el mapeado de cromosomas pueden utilizarse individualmente para marcar un único cromosoma o un único sitio en ese cromosoma, o pueden utilizarse paneles de reactivos para marcar múltiples sitios y/o múltiples cromosomas. Los reactivos correspondientes a regiones no codificantes de los genes de hecho resultan preferentes con fines de mapeado. Resulta más probable que las secuencias codificantes se encuentren conservadas dentro de las familias génicas, incrementando de esta manera la probabilidad de hibridación cruzada durante el mapeado de cromosomas.

Tras localizar una secuencia en una localización cromosómica exacta, puede correlacionarse la posición física de la secuencia en el cromosoma con datos de un mapa genético (estos datos se encuentran en, por ejemplo, McKusick V., Mendelian Inheritance in Man, disponible en Internet a través de la biblioteca médica Welch de la Johns Hopkins University) La relación entre un gen y una enfermedad, localizada en la misma región cromosómica, seguidamente puede identificarse mediante análisis de ligamientos (coherencia de genes físicamente contiguos), descrito en, por ejemplo, Egeland J. *et al.*, Nature 325: 783-787, 1987.

Además, pueden determinarse las diferencias en las secuencias de ADN entre individuos afectados y no afectados por una enfermedad asociada al gen PD-L2. En el caso de que se observe una mutación en algunos o todos los individuos afectados, pero no en ninguno de los individuos no afectados, la mutación probablemente es el agente causativo de la enfermedad particular. La comparación entre los individuos afectados y no afectados generalmente implica en primer lugar la búsqueda de alteraciones estructurales en los cromosomas, tales como deleciones o traslocaciones que resulten visibles en extensiones cromosómicas o detectables utilizando una PCR basada en esa secuencia de ADN. Finalmente puede llevarse a cabo la secuenciación completa de los genes de varios individuos con el fin de confirmar la presencia de una mutación y distinguir mutaciones de polimorfismos.

## 2. Tipado de tejidos

Las secuencias de PD-L2 también pueden utilizarse para identificar individuos a partir de muestras biológicas mínimas. Las fuerzas armadas de los Estados Unidos, por ejemplo, están considerando utilizar polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, se digiere el ADN genómico de un individuo con uno o más enzimas de restricción y se sondea en una transferencia southern, rindiendo bandas únicas para la identificación. Este método no adolece de las limitaciones actuales de las placas de identificación, que pueden perderse, intercambiarse o ser robadas, dificultando la identificación positiva. Las secuencias resultan útiles como marcadores de ADN adicionales para el RFLP (descrito en la patente US nº 5.272.057).

Además, las secuencias pueden utilizarse para proporcionar una técnica alternativa que determine la secuencia real de ADN base por base de partes seleccionadas del genoma de un individuo. De esta manera, las secuencias de nucleótidos de PD-L2 indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para preparar dos cebadores de PCR de extremo 5' a extremo 3' de las secuencias. Estos cebadores seguidamente pueden utilizarse para amplificar el ADN de individuo y posteriormente secuenciarlo.

Los paneles de secuencias de ADN correspondientes de individuos, preparados de esta manera, pueden proporcionar identificaciones individuales únicas, ya que cada individuo presentará un juego único de dichas secuencias de ADN debido a diferencias alélicas. Las secuencias pueden utilizarse para obtener dichas secuencias de identificación de individuos y de tejido. El nucleótido de PD-L2 únicamente representa partes del genoma humano. Se observa variación alélica en cierto grado en las regiones codificantes de dichas secuencias, y en mayor grado en las regiones no codificantes. Se estima que la variación alélica entre seres humanos individuales presenta una frecuencia de aproximadamente una vez por cada 500 bases. Cada una de las secuencias indicadas en la presente memoria puede, en cierto grado, utilizarse como estándar frente al que puede compararse el ADN de un individuo con fines de identificación. Debido a que se observa un número mayor de polimorfismos en las regiones codificantes, resultan necesarias menos secuencias para diferenciar entre individuos. Las secuencias no

codificantes de SEQ ID NO: 1 ó nº 4 pueden proporcionar cómodamente una identificación individual positiva con un panel de quizá 10 a 1.000 cebadores, cada uno de los cuales rinde una secuencia amplificada no codificante de 100 bases. En el caso de que se utilicen secuencias codificantes predichas, tales como las de SEQ ID NO: 3 ó nº 6, un número más apropiado de cebadores para la identificación individual positiva sería de entre 500 y 2.000.

En el caso de que se utilice un panel de reactivos de secuencias de nucleótidos de PD-L2 para generar una base de datos de identificación única para un individuo, esos mismos reactivos pueden utilizarse posteriormente para identificar tejido de ese individuo. Utilizando la base de datos de identificación única, puede realizarse una identificación positiva del individuo, vivo o muerto, a partir de muestras de tejido extremadamente pequeñas.

### 3. Utilización de secuencias de PD-L2 en biología forense

También pueden utilizarse técnicas de identificación basadas en ADN en la biología forense. La biología forense es un campo científico que utiliza el tipado genético de muestras biológicas encontradas en la escena de un crimen como medios para identificar positivamente, por ejemplo, el autor de un delito. Para llevar a cabo dicha identificación, puede utilizarse tecnología de PCR para amplificar secuencias de ADN obtenidas de muestras biológicas muy pequeñas, tales como tejidos, por ejemplo pelo o piel, o líquidos corporales, por ejemplo sangre, saliva o semen encontrados en la escena de un crimen. La secuencia amplificada seguidamente puede compararse con un estándar, permitiendo de esta manera la identificación del origen de la muestra biológica.

Las secuencias de la presente invención pueden utilizarse para proporcionar reactivos polinucleótidos, por ejemplo cebadores de PCR, dirigidos a loci específicos del genoma humano, que pueden incrementar la fiabilidad de las identificaciones forenses basadas en ADN al proporcionar, por ejemplo, otro "marcador de identificación" (es decir, otra secuencia de ADN que es única de un individuo particular). Tal como se ha indicado anteriormente, puede utilizarse información real de secuencias de bases para la identificación como alternativa exacta a los patrones formados por fragmentos generados por enzimas de restricción. Las secuencias dirigidas a regiones no codificantes de SEQ ID NO: 1 ó nº 4 resultan particularmente apropiadas para este uso, ya que existe un número mayor de polimorfismos en las regiones no codificantes, facilitando la diferenciación de individuos utilizando dicha técnica. Entre los ejemplos de reactivos polinucleótidos se incluyen las secuencias de nucleótidos de PD-L2 ó partes de las mismas, por ejemplo fragmentos derivados de las regiones no codificantes de SEQ ID NO: 1 ó nº 4 con una longitud de por lo menos 20 bases, preferentemente de por lo menos 30 bases.

Las secuencias de nucleótidos de PD-L2 indicadas en la presente memoria pueden utilizarse además para proporcionar reactivos polinucleótidos, por ejemplo sondas marcadas o marcables que pueden utilizarse en, por ejemplo, una técnica de hibridación *in situ* para identificar un tejido específico, por ejemplo linfocitos. Esto puede resultar muy útil en casos en los que se le presenta a un patólogo forense un tejido de origen desconocido. Pueden utilizarse paneles de dichas sondas de PD-L2 para identificar tejidos según especie y/o tipo de órgano.

De manera similar, dichos reactivos, por ejemplo cebadores o sondas de PD-L2, pueden utilizarse para cribar cultivos de tejidos para contaminación (es decir, cribar para la presencia de una mezcla de diferentes tipos de células en un cultivo).

#### C. Medicina predictiva:

La presente invención se refiere además al campo de la medicina predictiva, en la que se utilizan ensayos diagnósticos, ensayos pronósticos y el seguimiento de ensayos clínicos con fines pronósticos (predictivos), para tratar de esta manera un individuo de manera profiláctica. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un aspecto de la presente invención se refiere a ensayos diagnósticos para determinar la expresión de polipéptido PD-L2 y/o de ácidos nucleicos, así como la actividad de PD-L2, en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo sangre, suero, células o tejido), a fin de determinar de esta manera si un individuo presenta una enfermedad o trastorno, o presenta un riesgo de desarrollar un trastorno, asociado con la expresión o actividad aberrante o no deseada de PD-L2. La invención describe además ensayos pronósticos (o predictivos) para determinar si un individuo presenta un riesgo de desarrollo un trastorno asociado a la expresión o actividad de los ácidos nucleicos del polipéptido PD-L2. Por ejemplo, pueden someterse a ensayo mutaciones en un gen PD-L2 en una muestra biológica. Dichos ensayos pueden utilizarse con fines pronósticos o predictivos, para tratar profilácticamente de esta manera un individuo previamente a la aparición de un trastorno caracterizado o asociado a la expresión o actividad de ácidos nucleicos del polipéptido PD-L2.

Otro aspecto de la invención se refiere al seguimiento de la influencia de agentes (por ejemplo fármacos, compuestos) sobre la expresión o actividad de PD-L2 en ensayos clínicos.

Dichos agentes y otros se describen en mayor detalle en las secciones siguientes.

#### 1. Ensayos diagnósticos

Un método ejemplar para detectar la presencia o ausencia del polipéptido o ácidos nucleicos de PD-L2 en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o con un agente capaz de detectar el polipéptido o ácido nucleico de PD-L2 (por ejemplo ARNm o ADN genómico) que codifica el polipéptido PD-L2, de manera que se detecta la presencia de polipéptido o ácido nucleico de PD-L2 en la muestra biológica. Un agente preferente para detectar el ARNm o ADN genómico de PD-L2 es una sonda de ácidos nucleicos marcada capaz de hibridarse con ARNm o ADN genómico de PD-L2. La sonda de ácidos nucleicos puede ser, por ejemplo, el ácido nucleico de PD-L2 indicado en SEQ ID NO: 1, nº 3, nº 4 ó nº 6, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de por lo menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente bajo condiciones restrictivas con ARNm o ADN genómico de PD-L2. En la presente memoria se describen otras sondas adecuadas para la utilización en los ensayos diagnóstico de la invención.

Un agente preferente para detectar el polipéptido PD-L2 es un anticuerpo capaz de unirse al polipéptido PD-L2, preferentemente un anticuerpo con un marcaje detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferentemente, monoclonales. Puede utilizarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo Fab o F(ab')<sub>2</sub>). El término "marcaje", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende comprender el marcaje directo de la sonda o anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable con la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que se encuentra marcado directamente. Entre los ejemplos de marcaje indirecto se incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el marcaje final de una sonda de ADN con biotina, de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente. La expresión "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y líquidos presentes en un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede utilizarse para detectar ARNm, polipéptido o ADN genómico de PD-L2 en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm de PD-L2 incluyen las transferencias northern y las hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección del polipéptido PD-L2 incluye ensayos de inmunosorción ligados a enzima (ELISA), transferencias western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico de PD-L2 incluyen hibridaciones southern. Además, entre las técnicas *in vivo* para la detección del polipéptido PD-L2 se incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo anti-PD-L2 marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radioactivo cuya presencia y localización en un sujeto pueda detectarse mediante técnicas estándares de obtención de imágenes.

La muestra biológica puede contener moléculas de polipéptido procedentes del sujeto de ensayo. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de ensayo o moléculas de ADN genómico del sujeto de ensayo. Una muestra biológica preferente es una muestra de suero aislada por medios convencionales de un sujeto.

Los métodos implican además obtener una muestra biológica de control de un sujeto de control, poner en contacto la muestra de control con un compuesto o agente capaz de detectar el polipéptido, ARNm o ADN genómico de PD-L2, de manera que la presencia de polipéptido, ARNm o ADN genómico de PD-L2 se detecta en la muestra biológica, y comparar la presencia de polipéptido, ARNm o ADN genómico de PD-L2 en la muestra de control con la presencia de polipéptido, ARNm o ADN genómico de PD-L2 en la muestra de ensayo.

La invención comprende además kits para detectar la presencia de PD-L2 en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o agente marcado capaz de detectar el polipéptido o ARNm de PD-L2 en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de PD-L2 en la muestra, y medios para comparar la cantidad de PD-L2 en la muestra con un estándar. El compuesto o agente puede empaquetarse en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para utilizar el kit para detectar el polipéptido o ácido nucleico de PD-L2.

## 2. Ensayos pronósticos

Los métodos diagnósticos descritos en la presente memoria pueden utilizarse además para identificar sujetos que presentan, o en riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante o no deseada de PD-L2. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aberrante" incluye una expresión o actividad de PD-L2 que se aparta de la expresión o actividad de PD-L2 de tipo salvaje. La expresión o actividad aberrante incluye una expresión o actividad incrementada o reducida, así como una expresión o actividad que no sigue el patrón de expresión durante el desarrollo de tipo salvaje o el patrón subcelular de expresión. Por ejemplo, la expresión o actividad aberrante de PD-L2 pretende incluir los casos en los que una mutación en el gen PD-L2 provoca que el gen PD-L2 se infraexpresa o se sobreexpresa, y situaciones en las que dichas mutaciones resultan en un polipéptido PD-L2 no funcional o en un polipéptido que no funciona como el de tipo salvaje, por ejemplo un polipéptido que no interactúa con una pareja de unión de PD-L2 (por ejemplo PD-1), o uno que interactúa con una pareja de unión no de PD-L2. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "no deseado" incluye un

fenómeno no deseado participante en una respuesta biológica, tal como la activación de las células inmunológicas. Por ejemplo, la expresión no deseada incluye una expresión o actividad de PD-L2 que resulte no deseable en un sujeto.

5 Los ensayos descritos en la presente memoria, tales como los ensayos diagnósticos anteriores o los ensayos descritos posteriormente, pueden utilizarse para identificar un sujeto que presenta, o que se encuentra en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado a la regulación incorrecta de la actividad polipeptídica o expresión de ácidos nucleicos de PD-L2, tal como un trastorno autoinmunitario, un trastorno de inmunodeficiencia, un cáncer del sistema inmunológico o una tendencia a presentar abortos espontáneos. Alternativamente, los ensayos pronósticos  
10 pueden utilizarse para identificar un sujeto que presenta, o que se encuentra en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado a la regulación incorrecta de la actividad polipeptídica o expresión de ácidos nucleicos de PD-L2, tal como un trastorno autoinmunitario, un trastorno de inmunodeficiencia, un cáncer del sistema inmunológico o una tendencia a presentar abortos espontáneos. De esta manera, en la presente memoria se describe un método para identificar una enfermedad o trastorno asociado a una expresión o actividad de PD-L2 aberrante o no deseada, en el que se obtiene una muestra de ensayo y se detecta un polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo ARNm o ADN genómico) de PD-L2, en el que la presencia del polipéptido o ácido nucleico de PD-L2 es diagnóstico de que el sujeto presente, o se encuentre en riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad de PD-L2 aberrante o no deseada. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "muestra de ensayo" se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un líquido biológico (por ejemplo líquido cerebroespinal o suero), una muestra celular o tejido.

Además, los ensayos pronósticos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para determinar si puede administrarse un agente (por ejemplo un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato) en un sujeto con el fin de tratar una enfermedad o trastorno  
25 asociado a la expresión o actividad de PD-L2 aberrante o no deseada. Por ejemplo, dichos métodos pueden utilizarse para determinar si un sujeto puede ser tratado eficazmente con un agente para un trastorno autoinmunitario, trastorno de inmunodeficiencia, cáncer del sistema inmunológico, o tendencia a presentar abortos espontáneos. De esta manera, la presente invención describe métodos para determinar si un sujeto puede ser tratado eficazmente con un agente para un trastorno asociado con la expresión o actividad de PD-L2 aberrante o no deseada, en el que se obtiene una muestra de ensayo y se detecta la expresión o actividad polipeptídica o de ácidos nucleicos de PD-L2 (por ejemplo en el que la abundancia del polipéptido o expresión o actividad de ácidos nucleicos de PD-L2 es diagnóstica de que puede administrarse en un sujeto el agente para tratar un trastorno asociado a la expresión o actividad de PD-L2 aberrante o no deseada).

35 Los métodos de la invención también pueden utilizarse para detectar alteraciones genéticas en un gen PD-L2, determinando de esta manera si un sujeto con el gen alterado se encuentra en riesgo de presentar un trastorno caracterizado por la regulación incorrecta de la expresión polipeptídica o de ácidos nucleicos de PD-L2, tal como un trastorno autoinmunitario, un trastorno de inmunodeficiencia, un cáncer del sistema inmunológico o una tendencia a presentar abortos espontáneos. Entre los métodos se incluyen detectar, en una muestra de células del sujeto, la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por, como mínimo, una alteración que afecta a la integridad de un gen codificante de un polipéptido PD-L2, o la expresión incorrecta del gen PD-L2. Por ejemplo, dichas alteraciones genéticas pueden detectarse mediante la determinación de la existencia de por lo menos uno de entre: 1) una delección de uno o más nucleótidos de un gen PD-L2, 2) una adición de uno o más nucleótidos a un gen PD-L2, 3) una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen PD-L2, 4) una reorganización cromosómica de un gen PD-L2, 5) una alteración del nivel de un transcrito de ARN mensajero de un gen PD-L2, 6) la modificación aberrante de un gen PD-L2, tal como el patrón de metilación del ADN genómico, 7) la presencia de un patrón de procesamiento no de tipo salvaje de un transcrito de ARN mensajero de un gen PD-L2, 8) un nivel no de tipo salvaje de un polipéptido PD-L2, 9) la pérdida alélica de un gen PD-L2, y 10) la modificación post-traducciona inapropiada de un polipéptido PD-L2. Tal como se indica en la presente memoria, existe un gran número de ensayos conocidos de la técnica que pueden utilizarse para detectar alteraciones en un gen PD-L2. Una muestra biológica preferente es una muestra de tejido o de suero aislada por medios convencionales de un sujeto.

La detección de la alteración implica la utilización de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.683.195 y nº 4.683.202), tal como la amplificación rápida de extremos del ADNc ("anchor PCR") o PCR RACE, o, alternativamente, en una reacción en cadena de ligación (LCR) (ver, por ejemplo, Landegran *et al.*, Science 241:1077-1080, 1988) y Nakazawa *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364), resultando ésta última particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en un gen PD-L2 (ver Abravaya *et al.*, Nucleic Acids Res. 23:675-682, 1995). Este método puede incluir las etapas de recoger una muestra de células de un sujeto, aislar ácidos nucleicos (por ejemplo genómicos, ARNm o ambos) a partir de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácidos nucleicos con uno o más cebadores que se hibridan específicamente con un gen PD-L2 bajo condiciones en la que se produce la hibridación y amplificación del gen PD-L2 (en caso de encontrarse presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra de control. Se anticipa que la PCR y/o LCR puedan resultar de utilización deseable como etapa preliminar de amplificación conjuntamente con

cualquiera de las técnicas utilizadas para detectar mutaciones descritas en la presente memoria.

Entre los métodos de amplificación alternativos se incluyen: la replicación autosostenida de secuencias (Guatelli J.C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990), el sistema de amplificación transcripcional (Kwoh D.Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989), replicasa Q-beta (Lizardi P.M. *et al.*, Bio-Technology 6:1197, 1988) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Estos esquemas de detección resultan especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos en el caso de que dichas moléculas se encuentren presentes en un número muy reducido.

Las mutaciones en el gen PD-L2 de una célula de la muestra pueden identificarse a partir de alteraciones en los patrones de corte de los enzimas de restricción. Por ejemplo, se aísla ADN de muestra y de control, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción y se determinan las longitudes de los fragmentos mediante electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias de longitud de los fragmentos en ADN de muestra y de control indican mutaciones en el ADN de muestra. Además, la utilización de ribozimas específicos de secuencia (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.498.531) pueden utilizarse para puntuar para la presencia de mutaciones específicas por desarrollo o pérdida de un sitio de corte de ribozima.

Las mutaciones genéticas genéricas en PD-L2 pueden identificarse hibridando ácidos nucleicos de muestra y de control, por ejemplo ADN o ARN, con matrices de alta densidad que contengan cientos o miles de sondas oligonucleótidas (Cronin M.T. *et al.*, Hum. Mutat. 7:244-255, 1996; Kozal M.J. *et al.*, Nat. Med. 2:753-759, 1996). Por ejemplo, pueden identificarse mutaciones genéticas en PD-L2 en matrices bidimensionales que contenga sondas de ADN fotogeneradas, tal como se describe en Cronin *et al.*, supra, 1996). Brevemente, puede utilizarse una primera matriz de hibridación de sondas para rastrear tramos largos de ADN en muestra y control para identificar los cambios de bases entre las secuencias a partir de series lineales de sondas solapantes secuenciales. Esta etapa permite la identificación de mutaciones puntuales. Tras esta etapa, una segunda matriz de hibridación permite la caracterización de mutaciones específicas mediante la utilización de matrices de sondas especializadas más pequeñas que son complementarias de todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutaciones está compuesta de juegos de sondas paralelos, uno complementario al gen de tipo salvaje y otro complementario al gen mutante.

Puede utilizarse cualquiera de entre una diversidad de reacciones de secuenciación conocidas de la técnica para secuencia directamente el gen PD-L2 y detectar mutaciones mediante comparación de la secuencia de la PD-L2 de la muestra con la secuencia de tipo salvaje (de control) correspondiente. Entre los ejemplos de reacciones de secuenciación se incluyen aquellas basadas en técnicas desarrolladas por Maxam y Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560, 1977, o por Sanger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463, 1977. También se encuentra contemplado que pueda utilizarse cualquiera de entre una diversidad de procedimientos automáticos de secuenciación al llevar a cabo los ensayos diagnósticos (Naeve C.W., Biotechniques 19:448-53, 1995), incluyendo la secuenciación mediante espectrometría de masas (ver, por ejemplo, la publicación de patente internacional PCT nº WO 94/16101; Cohen *et al.*, Adv. Chromatogr. 36:127-162, 1996; y Griffin *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159, 1993).

Entre otros métodos para detectar mutaciones en el gen PD-L2 se incluyen métodos en los que se utiliza la protección frente a agentes de corte para detectar bases mal apareadas en dúplex ARN/ARN o heterodúplex ARN/ADN (Myers *et al.*, Science 230: 1242, 1985). En general, el procedimiento de la técnica de "corte de desapareamientos" se inicia proporcionando heterodúplex formados mediante hibridación de ARN o ADN (marcado) que contiene la secuencia de PD-L2 de tipo salvaje con ARN o ADN potencialmente mutante obtenido de una muestra de tejido. Los dúplex de doble cadena se tratan con un agente que corta regiones de cadena sencilla del dúplex, tales como los que se encontrarán debido a apareamientos incorrectos de pares de bases entre las cadenas de control y de muestra. Por ejemplo, pueden tratarse dúplex de ARN/ADN con ARNasa y los híbridos ADN/ADN tratarse con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones mal apareadas. En otras realizaciones, pueden tratarse dúplex de ADN/ADN o de ARN/ADN con hidroxilamina o con tetraóxido de osmio y con piperidina con el fin de digerir las regiones mal apareadas. Tras la digestión de las regiones mal apareadas, el material resultante seguidamente se separa según tamaño en geles de poliácridamida desnaturizantes para determinar el sitio de la mutación. Ver, por ejemplo, Cotton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397, 1988; y Saleeba *et al.*, Methods Enzymol. 217:286-295, 1992. El ADN o ARN de control puede marcarse para la detección.

La reacción de corte de apareamientos incorrectos puede utilizar una o más proteínas que reconozcan los pares de bases incorrectamente apareados en ADN de doble cadena (los enzimas denominados de "reparación de apareamientos incorrectos de ADN") en sistemas definidos para la detección y mapeado de mutaciones puntuales en ADNc de PD-L2 obtenidos de muestras de células. Por ejemplo, el enzima mut Y de *E. coli* corta la A en los apareamientos incorrectos G/A y la timidina ADN glucosilada de las células HeLa corta la T en los apareamientos incorrectos G/T (Hsu *et al.*, Carcinogenesis 15:1657-1662, 1994). Una sonda basada en una secuencia de PD-L2, por ejemplo una secuencia de PD-L2 de tipo salvaje, puede hibridarse con un ADNc o con otro producto de ADN procedente de una o más células de ensayo. El dúplex se trata con un enzima de reparación de apareamientos

incorrectos de ADN, y los productos de corte, en caso de encontrarse presente alguno, pueden detectarse mediante protocolos de electroforesis o similares. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.459.039.

5 Las alteraciones de la movilidad electroforética pueden utilizarse para identificar mutaciones en los genes PD-L2. Por ejemplo, pueden utilizarse el polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) para detectar diferencias de movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo salvaje (Orita *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766, 1989; ver también Cotton, Mutat. Res. 285:125-144, 1993, y Hayashi, Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79, 1992). Los fragmentos de ADN de cadena sencilla de ácidos nucleicos de PD-L2 de muestra y de control se desnaturalizan y se dejan renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos de cadena sencilla varía  
10 según la secuencia; la alteración resultante de movilidad electroforética permite la detección de incluso el cambio de una sola base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede incrementarse mediante la utilización de ARN (no ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a un cambio de secuencia. El método de la invención preferentemente utiliza el análisis de heterodúplex para separar moléculas heterodúplex de doble cadena basándose en los cambios de movilidad electroforética (Keen  
15 *et al.*, Trends Genet. 7:5, 1991).

El movimiento de los fragmentos mutantes o de tipo salvaje en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturalizante puede someterse a ensayo utilizando una electroforesis en gradiente de gel desnaturalizante (DGGE) (Myers *et al.*, Nature 313:495, 1985). Al utilizar la DGGE como método de análisis, el ADN se modifica para garantizar que no se desnaturaliza por completo, por ejemplo mediante la adición de una cola de bases GC ("GC clamp") de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alto punto de fusión, mediante PCR. Puede utilizarse un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturalizante para identificar diferencias de movilidad del ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner, Biophys. Chem. 265:12753, 1987).

25 Entre los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la hibridación selectiva de oligonucleótidos, la amplificación selectiva o la extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, pueden prepararse cebadores oligonucleótidos en los que la mutación conocida se encuentra situada centralmente y después hibridarse con ADN diana bajo condiciones que permitan la hibridación únicamente en el caso de que se encuentre una correspondencia perfecta (Saiki *et al.*, Nature 324:163, 1986; Saiki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230, 1989). Dichos oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con ADN diana amplificado por PCR o varias mutaciones diferentes en el caso de que los oligonucleótidos se unan a la membrana hibridante y se hibriden con el ADN diana marcado.

35 Alternativamente, puede utilizarse tecnología de amplificación específica de alelo que dependa de la amplificación selectiva por PCR. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden portar la mutación de interés en el centro de la molécula (de manera que la amplificación dependa de la hibridación diferencial) (Gibbs *et al.*, Nucleic Acids Res. 17: 2437-2448, 1989) o en el extremo 3' de un cebador en el que, bajo condiciones apropiadas, el apareamiento incorrecto puede evitar o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner, Tibtech 11:238, 1993). Además puede resultar deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear una detección basada en el corte (Gasparini *et al.*, Mol. Cell Probes 6:1, 1992). Se anticipa que en determinadas realizaciones la amplificación también pueda llevarse a cabo utilizando Taq ligasa para la amplificación (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189, 1991). En dichos casos, la ligación se producirá únicamente en el caso de que exista una correspondencia perfecta en el extremo 3' de la secuencia 5', permitiendo detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico a partir de la presencia o ausencia de  
45 amplificación.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de kits diagnósticos preempaquetados que comprendan por lo menos un reactivo sonda ácido nucleico o anticuerpo indicado en la presente memoria, que puede utilizarse convenientemente, por ejemplo en contextos clínicos para diagnosticar pacientes que muestren síntomas o una historia familiar de una enfermedad o condición que implique un gen PD-L2.

Además, puede utilizarse cualquier tipo celular o tejido en el que se exprese PD-L2 en los ensayos pronósticos descritos en la presente memoria.

### 55 3. Seguimiento de los efectos durante los ensayos clínicos

El seguimiento de la influencia de agentes (por ejemplo fármacos) sobre la expresión o actividad de un polipéptido PD-L2 (por ejemplo la modulación de la proliferación y/o migración celulares) puede aplicarse no sólo en el cribado farmacológico básico, sino también en pruebas clínicas. Por ejemplo, la efectividad de un agente determinada mediante un ensayo de cribado tal como se indica en la presente memoria con el fin de incrementar la expresión génica y niveles polipeptídicos de PD-L2, o regular positivamente la actividad de PD-L2, puede seguirse en ensayos clínicos de sujetos que muestren una expresión génica o niveles de polipéptidos de PD-L2 reducidos o una actividad de PD-L2 regulada negativamente. Por ejemplo, la efectividad de un agente determinada mediante un ensayo de



cribado tal como se indica en la presente memoria con el fin de incrementar la expresión génica y niveles polipeptídicos de PD-L2, o regular positivamente la actividad de PD-L2, puede seguirse en ensayos clínicos de sujetos que muestren una expresión génica o niveles de polipéptidos de PD-L2 reducidos o una actividad de PD-L2 regulada negativamente. En dichas pruebas clínicas, la expresión o actividad de un gen PD-L2, y preferentemente de otros genes que se han implicado en, por ejemplo, un trastorno asociado a PD-L2 pueden utilizarse como "lectura" o marcador del fenotipo de una célula particular.

Por ejemplo, y no a título limitativo, pueden identificarse los genes, incluyendo PD-L2, que están modulados en células mediante tratamiento con un agente (por ejemplo un compuesto, fármaco o molécula pequeña) que modula la actividad de PD-L2 (por ejemplo identificado en un ensayo de cribado tal como se describe en la presente memoria). De esta manera, para estudiar el efecto de los agentes sobre los trastornos asociados a PD-L2 (por ejemplo trastornos caracterizados por una actividad de PD-1 desregulada); por ejemplo, en una prueba clínica, pueden aislarse células, prepararse ARN y analizarse para los niveles de expresión de PD-L2 y de otros genes implicados en el trastorno asociado a PD-L2, respectivamente. Los niveles de expresión génica (por ejemplo un patrón de expresión génica) pueden cuantificarse mediante análisis de transferencia northern o RT-PCR, tal como se describe en la presente memoria, o alternativamente mediante la medición de la cantidad de polipéptido producido, mediante uno de los métodos descritos en la presente memoria, o mediante la medición de los niveles de actividad de PD-L2 ó de otros genes. De esta manera, el patrón de expresión génica puede servir como marcador, indicado de la respuesta fisiológica de las células frente al agente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, este estado de respuesta puede determinarse antes del tratamiento y en diversos puntos durante el tratamiento del individuo con el agente.

La presente invención preferentemente describe un método para realizar el seguimiento de la efectividad de tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato identificado mediante los ensayos de cribado indicados en la presente memoria), incluyendo las etapas de: (i) obtener una muestra preadministración de un sujeto previamente a la administración del agente, (ii) detectar el nivel de expresión de un polipéptido PD-L2, ARNm o ADN genómico en la muestra preadministración, (iii) obtener una o más muestras post-administración del sujeto, (iv) detectar el nivel de expresión o actividad del polipéptido, ARNm o ADN genómico de PD-L2 en las muestras post-administración, (v) comparar el nivel de expresión o actividad del polipéptido, ARNm o ADN genómico de PD-L2 en la muestra preadministración con el polipéptido, ARNm o ADN genómico de PD-L2 en la muestra o muestras post-administración, y (vi) alterar la administración del agente en el sujeto de acuerdo con lo anteriormente expuesto. Por ejemplo, la administración incrementada del agente puede resultar deseable para incrementar la expresión o actividad de PD-L2 a niveles más elevados de los detectados, es decir, para incrementar la efectividad del agente. Alternativamente, puede resultar deseable la administración reducida del agente con el fin de reducir la expresión o actividad de PD-L2 a niveles más bajos de los detectados, es decir, para reducir la efectividad del agente. Según dicho aspecto, la expresión o actividad de PD-L2 puede utilizarse como indicador de la efectividad de un agente, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable.

#### D. Métodos de tratamiento:

La presente invención describe para métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo (o susceptible de presentar) un trastorno caracterizado por la producción insuficiente o excesiva de proteína PD-L2 ó de producción de formas de la proteína PD-L2 con actividad reducida o aberrante en comparación con la proteína PD-L2 de tipo salvaje. Además, los anticuerpos anti-PD-L2 de la realización pueden utilizarse para detectar y aislar proteínas PD-L2, regular la biodisponibilidad de las proteínas PD-L2 y modular la actividad de PD-L2, por ejemplo mediante la modulación de la interacción de PD-L2 y PD-1.

##### 1. Métodos profilácticos

En un aspecto, la realización describe un método para prevenir en un sujeto una enfermedad o condición asociada a una expresión o actividad de PD-L2 aberrante o no deseada, mediante la administración en el sujeto de un polipéptido PD-L2 o un agente que module la expresión de PD-L2 o por lo menos una actividad de PD-L2. Los sujetos en riesgo de una enfermedad o trastorno provocado o al que contribuye la expresión o actividad aberrante o no deseada de PD-L2 pueden identificarse mediante, por ejemplo, cualquiera de los ensayos diagnósticos o pronósticos indicados en la presente memoria o una combinación de ellos. La administración de un agente profiláctico puede realizarse antes de la manifestación de síntomas característicos de la anormalidad de PD-L2, de manera que se prevenga una enfermedad o trastorno, o alternativamente, retrasarse su progresión. Dependiendo del tipo de anormalidad de PD-L2, puede utilizarse, por ejemplo, un polipéptido PD-L2, un agonista de PD-L2 o un antagonista de PD-L2 (por ejemplo un anticuerpo anti-PD-L2 o una combinación de anticuerpos anti-PD-L2 y anti-PD-L1) para tratar el sujeto. El agente apropiado puede determinarse basándose en ensayos de cribado descritos en la presente memoria.

##### 2. Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la realización se refiere a métodos para modular la expresión o actividad de PD-L2 ó la interacción con sus parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, con fines terapéuticos. Se ha demostrado que PD-L2 inhibe la coestimulación y proliferación de las células inmunológicas activadas y transmite una señal inhibitoria a las células inmunológicas mediante PD-1. De acuerdo con ello, la actividad y/o la expresión de PD-L2, así como la interacción entre PD-L2 y PD-1, puede modularse con el fin de modular la respuesta inmunológica. Debido a que PD-L2 se une a receptores inhibidores, la regulación positiva de la actividad de PD-L2 resulta en la regulación negativa de las respuestas inmunológicas, mientras que la regulación negativa de la actividad de PD-L2 resulta en la regulación positiva de las respuestas inmunológicas. En una realización preferente, PD-L2 se une a receptores inhibidores. En una realización particularmente preferente, PD-L2 se une a PD-1.

Los métodos de modulación de la realización implican poner en contacto una célula con un polipéptido PD-L2 ó un agente que modula una o más de las actividades del polipéptido PD-L2 asociadas a la célula, por ejemplo un agente que module la expresión o actividad de PD-L2 y/o que module la interacción de PD-L2 y su pareja o parejas de unión naturales. En un aspecto preferente, la pareja de unión es PD-1. Un agente que module la actividad del polipéptido PD-L2 puede ser un agente tal como se describe en la presente memoria, tal como un ácido nucleico o un polipéptido, una pareja de unión natural de un polipéptido PD-L2 (por ejemplo PD-1), un anticuerpo de PD-L2, una combinación de anticuerpos de PD-L2 y PD-L1, un agonista o antagonista de PD-L2, un peptidomimético de un agonista o antagonista de PD-L2 u otra molécula pequeña. También pueden utilizarse formas solubles de PD-L2 para interferir con la unión de PD-1 a cualquiera de sus parejas de unión o ligandos naturales.

Un agente que modula la expresión de PD-L2 es, por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos antisentido, un oligonucleótido tríplex, un ribozima, o un vector recombinante para la expresión de un polipéptido PD-L2. Por ejemplo, puede sintetizarse un oligonucleótido complementario al área circundante al sitio de inicio de traducción de un polipéptido PD-L2. Pueden añadirse uno o más oligonucleótidos antisentido al medio celular, típicamente a una concentración de 200 mg/ml, o administrarse en un paciente para bloquear la síntesis de un polipéptido PD-L2. El oligonucleótido antisentido es incorporado por las células y se hibrida con un ARNm de PD-L2 para bloquear la traducción. Alternativamente, puede utilizarse un oligonucleótido que se una a ADN de doble cadena para formar un constructo tríplex para evitar el desenrollamiento del ADN y la transcripción. Como resultado de cualquiera de los dos sucesos, se bloquea la síntesis del polipéptido PD-L2. Al modular la expresión de PD-L2, preferentemente dicha modulación se produce por medios diferentes de la inactivación del gen PD-L2.

Los agentes que modulan la expresión, en virtud del hecho de que controlan la cantidad de PD-L2 en una célula, también modulan el nivel total de actividad de PD-L2 en una célula.

El agente que puede modular PD-L2 estimula una o más actividades de PD-L2. Entre los ejemplos de dichos agentes estimuladores se incluyen el polipéptido PD-L2 activo y una molécula de ácidos nucleicos codificante de PD-L2 que ha sido introducida en la célula. En otra realización, el agente inhibe una o más de las actividades de PD-L2. En una realización preferente, el agente inhibe o incrementa la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales. En una realización particularmente preferente, la pareja de unión es PD-1. Entre los ejemplos de dichos agentes inhibidores se incluyen moléculas de ácidos nucleicos antisentido de PD-L2, anticuerpos anti-PD-L2, inhibidores de PD-L2 y compuestos identificados en los ensayos de cribado de la invención. En una realización preferente adicional, un agente inhibidor es una combinación de un anticuerpo anti-PD-L2 y un anticuerpo anti-PD-L1.

Dichos métodos de modulación pueden llevarse a cabo *in vitro* (por ejemplo poniendo en contacto la célula con el agente) o, alternativamente, poniendo en contacto un agente con células *in vivo* (por ejemplo mediante la administración del agente en un sujeto). Como tales, los métodos de tratamiento de un individuo que sufre una condición o trastorno que se beneficiaría de la modulación positiva o negativa de un polipéptido PD-L2, por ejemplo un trastorno caracterizado por la expresión o actividad no deseada, insuficiente o aberrante de un polipéptido o molécula de ácidos nucleicos de PD-L2 indicada en la presente memoria. El método puede incluir la administración de un agente (por ejemplo un agente identificado mediante un ensayo de cribado descrito en la presente memoria) o la combinación de agentes que modulan (por ejemplo regulan positivamente o negativamente) la expresión o actividad de PD-L2.

En otro aspecto, el método incluye la administración de un polipéptido o molécula de ácidos nucleicos de PD-L2 como terapia para compensar para una expresión o actividad de PD-L2 reducida, aberrante o no deseada.

La estimulación de la actividad de PD-L2 resulta deseable en situaciones en las que PD-L2 se encuentra regulada negativamente de manera anormal y/o en las que la actividad de PD-L2 incrementada es probable que presente un efecto beneficioso. De manera similar, la inhibición de la actividad de PD-L2 resulta deseable en situaciones en las que PD-L2 se encuentra regulada negativamente de manera anormal y/o en las que la actividad de PD-L2 reducida es probable que presente un efecto beneficioso.

Entre los agentes ejemplares para la utilización en la modulación negativa de PD-L2 (es decir, antagonistas de PD-

L2) se incluyen, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos antisentido, anticuerpos que reconocen y bloquean PD-L2, combinaciones de anticuerpos que reconocen y bloquean PD-L2 y anticuerpos que reconocen y bloquean PD-L1, y compuestos que bloquean la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales sobre una célula inmunológica (por ejemplo moléculas de PD-L2 monovalentes solubles; formas solubles de PD-L2 que no se unen a receptores Fc sobre células presentadoras de antígeno, formas solubles de parejas de unión de PD-L2, o compuestos identificados en los ensayos de cribado de la invención). En una realización preferente, la pareja de unión es PD-1. Entre los agentes ejemplares para la utilización en la modulación positiva de PD-L2 (es decir, agonistas de PD-L2) se incluyen, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos PD-L2, formas multivalentes de PD-L2, compuestos que incrementan la expresión de PD-L2, compuestos que incrementan la interacción de PD-L2 con sus parejas de unión naturales (por ejemplo PD-1) y células que expresan PD-L2.

### 3. Regulación negativa de la respuesta inmunológica

Existen numerosos aspectos de la invención para la regulación positiva de la función de inhibición de un polipéptido PD-L2 para regular negativamente de esta manera las respuestas inmunológicas. La regulación negativa puede presentar la forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunológica que ya se está produciendo, o puede implicar el bloqueo de la inducción de una respuesta inmunológica. Las funciones de las células inmunológicas activadas puede inhibirse mediante la regulación negativa de las respuestas de las células inmunológicas o mediante la inducción de anergia específica en las células inmunológicas, o ambas.

Por ejemplo, en el caso de que PD-L2 se una a un receptor de inhibición, por ejemplo PD-1, pueden utilizarse formas de PD-L2 que se unen al receptor de inhibición, por ejemplo PD-L2 multivalente sobre una superficie celular para modular negativamente la respuesta inmunológica. De manera similar, la interacción PD-L2-PD-1 también puede incrementarse mediante la utilización de un agente adicional, por ejemplo un agente que bloquee la interacción de PD-L1 con PD-1, que además pueda modular negativamente la respuesta inmunológica.

En un aspecto de la invención, un anticuerpo activador utilizado para estimular la actividad de PD-L2 es un anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, dicho anticuerpo puede comprender un sitio de unión de PD-L2 y otro sitio de unión con diana en un receptor de superficie celular sobre una célula inmunológica, por ejemplo una célula T, una célula B o una célula mielóide. Dicho anticuerpo, además de comprender un sitio de unión de PD-L2, puede comprender además un sitio de unión que se une a un receptor de antígenos de células B, un receptor de antígenos de células T o un receptor de Fc, con el fin de dirigir la molécula a una población celular específica. La selección de este segundo antígeno para el anticuerpo biespecífico proporciona flexibilidad en la selección de la población celular que será la diana para la inhibición.

Los agentes que estimulan una actividad de PD-L2 o que incrementan la interacción de PD-L2 con sus parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1 (por ejemplo anticuerpos activadores de PD-L2 ó moléculas pequeñas activadoras de PD-L2) pueden identificarse a partir de su capacidad de inhibir la proliferación de las células inmunológicas y/o la función efectora o de inducir anergia al añadirlas a un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, pueden cultivarse células en presencia de un agente que estimule la transducción de señales mediante un receptor activador. Pueden utilizarse varias manifestaciones de la activación celular reconocidas por la técnica para medir, por ejemplo, la proliferación celular o la función efectora (por ejemplo la producción de anticuerpos, la producción de citoquinas, la fagocitosis) en presencia del agente activador. La capacidad de un agente de bloquear esta activación puede determinarse fácilmente mediante la medición de la capacidad del agente de producir una reducción de la proliferación o de la función efectora que se mide. En un aspecto, a concentraciones de antígeno bajas, las interacciones PD-L2-PD-1 inhiben señales B7-CD28 fuertes. En otro aspecto, a concentraciones de antígeno elevadas, las interacciones PD-L2-PD-1 reducen la producción de citoquinas pero no inhiben la proliferación de las células T. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la capacidad de un compuesto de ensayo de bloquear la activación puede determinarse mediante la medición de la producción de citoquinas y/o la proliferación a diferentes concentraciones de antígeno.

En un aspecto de la invención, se induce tolerancia contra antígenos específicos mediante la coadministración de un antígeno con un agonista de PD-L2. Por ejemplo, puede inducirse tolerancia frente a polipéptidos específicos. Las respuestas inmunológicas a alérgenos o polipéptidos foráneos contra los que no resulta deseable una respuesta inmunológica pueden ser inhibidas. Por ejemplo, los pacientes que reciben Factor VIII frecuentemente generan anticuerpos contra dicho factor de coagulación. La coadministración de un agente que estimula la actividad de PD-L2 ó la interacción con su pareja de unión natural, por ejemplo PD-1, con factor VIII recombinante (o la unión física de PD-L2 a Factor VIII, por ejemplo mediante entrecruzamiento) puede resultar en la modulación negativa de la respuesta inmunológica.

Puede utilizarse para modular negativamente las respuestas inmunológicas un agonista de PD-L2 y otro agente que pueda bloquear la actividad de los receptores de coestimulación sobre una célula inmunológica. Entre las moléculas ejemplares se incluyen: formas agonistas de otros ligandos de PD-1 (por ejemplo PD-L1), formas solubles de CTLA-4, anticuerpos anti-B7-1, anticuerpos anti-B7-2 ó combinaciones de los mismos. Alternativamente, pueden

combinarse dos péptidos separados (por ejemplo un polipéptido PD-L2 con formas bloqueantes de los polipéptidos B7-2 y/o B7-1) o una combinación de anticuerpos (por ejemplo anticuerpos activadores contra un polipéptido PD-L2 con anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-B7-2 y/o anti-B7-1) en forma de una sola composición o administrarse separadamente (simultánea o secuencialmente) para regular negativamente las respuestas inmunológicas mediadas por células inmunológicas en un sujeto. Además, puede utilizarse una cantidad terapéuticamente activa de uno o más péptidos que presentan una actividad de polipéptido PD-L2, conjuntamente con uno o más polipéptidos que presentan actividad de B7-1 y/o B7-1, conjuntamente con otros reactivos de modulación negativa para influir sobre las respuestas inmunológicas. Entre los ejemplos de otros reactivos inmunomoduladores se incluyen anticuerpos que bloquean una señal de coestimulación (por ejemplo contra CD28 ó ICOS), anticuerpos que activan una señal inhibidora mediante CTLA4 y/o anticuerpos contra otros marcadores de células inmunológicas (por ejemplo contra CD40, ligando de CD40 ó citoquinas), proteínas de fusión (por ejemplo CTLA4-Fc o PD-1-Fc) y fármacos inmunosupresores (por ejemplo rapamicina, ciclosporina A o FK506).

Los polipéptidos PD-L2 también pueden resultar útiles en la construcción de agentes terapéuticos que bloquean la función de las células inmunológicas mediante destrucción de células. Por ejemplo, pueden unirse partes de un polipéptido PD-L2 a una toxina para preparar un agente citotóxico capaz de inducir la destrucción de las células a las que se une.

Para preparar agentes citotóxicos, algunos polipéptidos pueden unirse, o asociarse operablemente, a toxinas utilizando técnicas que son conocidas de la técnica, por ejemplo mediante entrecruzamiento o técnicas de ADN recombinante. La preparación de inmunotoxinas es, en general, bien conocida de la técnica (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.340.535 y la patente EP nº 44167). Se conocen numerosos tipos de conectores que contienen enlaces disulfuro que pueden utilizarse con éxito para conjugar la fracción toxina con un polipéptido. Los conectores que contienen un enlace disulfuro que está estéricamente "impedido" resultan preferentes, debido a su mayor estabilidad *in vivo*, impidiendo de esta manera la liberación de la fracción toxina previamente a la unión al sitio de acción.

Se conoce una amplia diversidad de toxinas que pueden conjugarse con polipéptidos o anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen: numerosas toxinas útiles derivadas de plantas, hongos o incluso bacterias, entre las que, a título de ejemplo, se incluyen: diversas toxinas de cadena A, particularmente la cadena A de la ricina; proteínas inactivadoras de los ribosomas tales como la saporina o la gelonina; la  $\alpha$ -sarcina; la aspergilina; la restrictocina; y ribonucleasas tales como la ribonucleasa placentaria, la toxina angiogénica diftérica o la exotoxina de *Pseudomonas*. Una fracción toxina preferente para la utilización es la toxina cadena A que ha sido tratada para modificar o eliminar los residuos carbohidrato, la cadena A desglucosilada (patente US nº 5.776.427).

La infusión de una o de una combinación de dichos agentes citotóxicos (por ejemplo ricina PD-L2 (sola o en combinación con PD-L1-ricina) en un paciente puede resultar en la muerte de células inmunológicas, particularmente a la luz del hecho de que las células inmunológicas activadas expresan cantidades superiores de parejas de unión de PD-L2, por ejemplo PD-1. Por ejemplo, debido a que PD-1 resulta inducido sobre la superficie de los linfocitos activados, puede utilizarse un polipéptido PD-L2 para dirigir la reducción de estas células específicas mediante mecanismos dependientes del Fc-R o mediante ablación, mediante la conjugación de un fármaco citotóxico (por ejemplo ricina, saporina o calicheamicina) con el polipéptido PD-L2. En otra realización, la toxina puede conjugarse con un anticuerpo anti-PD-L2 con el fin de dirigir la eliminación de las células presentadoras de antígeno expresantes de PD-L2. La toxina-anticuerpo de PD-L2 puede ser un anticuerpo biespecífico. Este tipo de anticuerpos biespecíficos resultan útiles para dirigir una población celular específica, por ejemplo utilizando un marcador presente únicamente sobre un determinado tipo de células, por ejemplo linfocitos B, monocitos, células dendríticas o células de Langerhans.

La regulación negativa de las respuestas inmunológicas mediante activación de la activación de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1 (y, de esta manera, la estimulación de la función de señalización negativa de PD-1) resulta útil en la modulación negativa de la respuesta inmunológica, por ejemplo en situaciones de trasplante de tejidos, piel y órganos, en la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) o en alergias, o en enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso sistémico y la esclerosis múltiple. Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células inmunológicas resultan en una menor destrucción de los tejidos en el trasplante de tejidos. Típicamente, en los trasplantes de tejidos, el rechazo del trasplante se inicia por el reconocimiento como foráneo por parte de las células inmunológicas, seguido de una reacción inmunológica que destruye el trasplante. La administración de una molécula que estimula la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, sobre las células inmunológicas (tales como una forma multimérica soluble de un polipéptido PD-L2) solo o conjuntamente con otro agente de modulación negativamente antes o durante el trasplante puede inhibir la generación de una señal de coestimulación. Además, la inducción de la actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1 (y, de esta manera, una señal inhibidora de PD-1) también puede resultar suficiente para anergizar las células inmunológicas, induciendo de esta manera tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia de largo plazo mediante la inducción de una señal inhibidora mediada por PD-1 puede evitar

la necesidad de una administración repetida de dichos reactivos activadores.

Para alcanzar una inmunosupresión o tolerancia suficiente en un sujeto, también puede resultar deseable bloquear la función de coestimulación de otras moléculas. Por ejemplo, puede resultar deseable bloquear la función de B7-1 y B7-2 mediante la administración de una forma soluble de una combinación de péptidos con actividad de cada uno de dichos antígenos o el bloqueo de los anticuerpos contra dichos antígenos (separadamente o conjuntamente en una sola composición) antes o durante el trasplante. Alternativamente, puede resultar deseable inducir la actividad inhibidora de PD-L2 e inhibir una actividad de coestimulación de B7-1 y/o B7-2. Entre otros agentes de modulación negativa que pueden utilizarse en relación con los métodos de modulación negativa se incluyen, por ejemplo, agentes que transmiten una señal de inhibición mediante CTLA4, formas solubles de CTLA4, anticuerpos que activan una señal inhibidora mediante CTLA4, anticuerpos bloqueantes contra otros marcadores de células inmunológicas, o formas solubles de otras parejas de ligandos receptores (por ejemplo agentes que alteran la interacción entre CD40 y ligando de CD40 (por ejemplo anticuerpos anti-ligando de CD40), anticuerpos contra citoquinas o fármacos inmunosupresores.

Por ejemplo, la activación de la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1 (y, de esta manera, la función inhibidora de dicha pareja o parejas de unión), también puede resultar útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de la activación inapropiada de células inmunológicas que son reactivas contra los propios tejidos y que estimulan la producción de citoquinas, y autoanticuerpos que participan en la patología de las enfermedades. La prevención de la activación de las células inmunológicas autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de enfermedades. La administración de agentes que inducen actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, puede inducir tolerancia específica de antígeno de células inmunológicas autorreactivas que podría conducir a un alivio de largo plazo de la enfermedad. Además, la coadministración de agentes que bloquean la coestimulación de las células inmunológicas mediante la alteración de las interacciones receptor-ligando de moléculas B7 con receptores de coestimulación puede resultar útil para inhibir la activación de las células inmunológicas para bloquear la producción de autoanticuerpos o citoquinas que podrían participar en el proceso patológico. La eficacia de los reactivos en la prevención o alivio de trastornos autoinmunitarios puede determinarse utilizando varios modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Entre los ejemplos se incluyen la encefalitis autoinmunitaria experimental murina, el lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o los ratones híbridos NZB, la artritis del colágeno autoinmunitaria murina, la diabetes mellitus en ratones NOD y en ratas BB, y la miastenia gravis experimental murina (ver Paul, editor, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, 1989, páginas 840 a 856).

La inhibición de la activación de las células inmunológicas resulta útil terapéuticamente en el tratamiento de alergias y reacciones alérgicas, por ejemplo mediante la inhibición de la producción de IgE. Puede administrarse un agente que induce actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, en un sujeto alérgico con el fin de inhibir las respuestas alérgicas mediadas por células inmunológicas en el sujeto. La estimulación de la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, puede estar acompañada por la exposición a alérgenos conjuntamente con moléculas de MHC apropiadas. Las reacciones alérgicas pueden ser de naturaleza sistémica o local, dependiendo de la ruta de entrada del alérgeno y del patrón de deposición de IgE sobre los mastocitos o basófilos. De esta manera, las respuestas alérgicas mediadas por células inmunológicas pueden ser inhibidas local o sistémicamente mediante la administración de un agente que induce la actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1.

La inhibición de la activación de las células inmunológicas mediante la estimulación de la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, también puede resultar importante terapéuticamente en infecciones patogénicas de las células inmunológicas (por ejemplo por virus o bacterias). Por ejemplo, en el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la replicación vírica resulta estimulada por la activación de las células inmunológicas. La estimulación de la actividad de PD-L2 ó de la interacción de PD-L2-PD-1 puede resultar en la inhibición de la replicación vírica y, de esta manera, en la mejora del curso del SIDA.

La regulación negativa de una respuesta inmunológica mediante la estimulación de la actividad de PD-L2 ó de la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, también puede resultar útil para estimular el mantenimiento del embarazo. PD-L2 normalmente se expresa a nivel elevado en trofoblastos placentarios, la capa de células que forma la interfaz entre la madre y el feto y podría desempeñar un papel en la prevención del rechazo materno del feto. Las hembras en riesgo de aborto espontáneo (por ejemplo las identificadas mediante cribado para la actividad de PD-L2, tal como se describe en la sección de "Ensayos pronósticos"; aquéllas que han experimentado previamente un aborto espontáneo o aquéllas que han experimentado dificultades en la concepción) debido al rechazo inmunológico del embrión o feto pueden tratarse con agentes que estimulan la actividad de PD-L2 ó de su interacción con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1.

La regulación negativa de una respuesta inmunológica mediante la estimulación de la actividad de PD-L2 ó de la

interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, también puede resultar útil para tratar un ataque autoinmunitario de tejidos autólogos. Por ejemplo, PD-L2 normalmente se expresa a nivel elevado en el corazón y protege a éste frente al ataque autoinmunitario. Esto se pone de manifiesto en el hecho de que los ratones Balb/c con inactivación de PD-1 muestran un ataque autoinmunitario masivo del corazón con trombosis. De esta manera, las condiciones que son causadas o exacerbadas por un ataque autoinmunitario (por ejemplo, en el presente ejemplo, la enfermedad cardíaca, el infarto de miocardio o la aterosclerosis) pueden ser aliviadas o mejoradas mediante el incremento de la actividad de PD-L2 ó de la unión de PD-L2 a su pareja de unión natural, por ejemplo PD-1. Por lo tanto, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención modular las condiciones exacerbadas por el ataque autoinmunitario, tales como los trastornos autoinmunitarios (así como condiciones tales como las enfermedades cardíacas, el infarto de miocardio y la aterosclerosis) mediante estimulación de la actividad de PD-L2 ó de la interacción de PD-L2 con PD-L1.

Al llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, se encuentra comprendido dentro del alcance regular negativamente una respuesta inmunológica mediante estimulación de las actividades de tanto PD-L2 como PD-1. PD-L1 es un ligando de PD-1 adicional que se describe en la patente US copendiente n° 6.936.704; solicitud publicada de patente internacional WO n° 01/14557; Dong H. *et al.*, Nat. Med. 5:1365-1369, 1999; y Freeman G.J. *et al.*, J. Exp. Med. 192:1027-1034, 2000. En una realización adicional, al llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, se encuentra comprendido dentro del alcance descrito regular negativamente una respuesta inmunológica mediante la administración de uno o más agentes adicionales. Por ejemplo, la utilización de otros agentes que es conocido que regulan negativamente la respuesta inmunológica conjuntamente con un agente que estimula la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1.

#### 4. Regulación positiva de las respuestas inmunológicas

La inhibición de la actividad de PD-L2 ó de la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, también puede resultar útil en la terapia la regulación positiva de las respuestas inmunológicas. La regulación positiva de las respuestas inmunológicas puede ser en forma de un incremento de una respuesta inmunológica existente o la inducción de una respuesta inmunológica inicial. Por ejemplo, el incremento de una respuesta inmunológica mediante la inhibición de la actividad de PD-L2 ó de la interacción PD-L2-PD-1 resulta útil en casos de infecciones por microbios, por ejemplo bacterias, virus o parásitos, o en casos de inmunosupresión. Por ejemplo, un agente que inhiba la actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1, por ejemplo un anticuerpo no activador (es decir, un anticuerpo bloqueante) contra PD-L2, una combinación de anticuerpos no activadores contra PD-L2 y PD-L1, o una forma soluble de PD-L2, resultaría terapéuticamente útil en situaciones en las que la regulación positiva de respuestas mediadas por anticuerpos y células, las cuales resultasen en una eliminación más rápida o más completa de un virus, bacteria o parásito, resultaría beneficioso. Entre estas condiciones se incluyen enfermedades víricas de la piel tales como el herpes o el herpes zóster, en cuyo caso dicho agente puede administrarse tópicamente sobre la piel. Además, las enfermedades víricas sistémicas tales como influenza, el resfriado común y la encefalitis podrían aliviarse mediante la administración de dichos agentes por vía sistémica. En determinados casos, puede resultar deseable administrar además otros agentes que regulen positivamente respuestas inmunológicas, por ejemplo formas de miembros de la familia de B7 que transducen señales mediante receptores de coestimulación, con el fin de incrementar adicionalmente la respuesta inmunológica.

Alternativamente, las respuestas inmunológicas pueden incrementarse en un paciente infectado mediante eliminación de las células inmunológicas del paciente, puesta en contacto de las células inmunológicas *in vitro* con un agente que inhiba la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, y la reintroducción de las células inmunológicas estimuladas *in vitro* en el paciente. Un método de incremento de las respuestas inmunológicas puede implicar el aislamiento de las células infectadas de un paciente, por ejemplo de células infectadas víricamente, transfectándolas con una molécula de ácidos nucleicos codificante de una forma de PD-L2 que no puede unirse a su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, de manera que las células expresen la totalidad o una parte de la molécula PD-L2 sobre su superficie, y la reintroducción de las células transfectadas en el paciente. Las células transfectadas podrían ser capaces de bloquear una señal inhibitoria, y de esta manera activar, las células inmunológicas *in vivo*.

Un agente que inhiba la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, puede utilizarse profilácticamente en vacunas contra diversos polipéptidos, por ejemplo polipéptidos derivados de patógenos. La inmunidad contra un patógeno, por ejemplo un virus, puede inducirse mediante vacunación con un polipéptido vírico conjuntamente con un agente que inhiba la actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1, en un adyuvante apropiado. Alternativamente, puede utilizarse para la vacunación un vector que comprende genes que codifican tanto un antígeno patogénico como una forma de PD-L2 que bloquea la interacción PD-L2-PD-1. Pueden administrarse vacunas de ácidos nucleicos mediante una diversidad de medios, por ejemplo mediante inyección (por ejemplo intramuscular, intradérmica o biolística de partículas de oro recubiertas de ADN en la epidermis con una pistola génica que utiliza un acelerador de partículas o un gas comprimido para inyectar las partículas en la piel (Haynes *et al.*, J. Biotechnol. 44:37, 1996). Alternativamente, las vacunas de ácidos

nucleicos pueden administrarse por medios no invasivos. Por ejemplo, puede administrarse ADN puro o formulado con lípidos en el sistema respiratorio o dirigirlo a otros sitios, por ejemplo a los parches de Peyer mediante administración oral de ADN (Schubbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:961, 1997). Pueden utilizarse microorganismos atenuados para la administración en superficies mucosales (Sizemore *et al.*, Science 270:29, 1995).

En otra realización, el antígeno en la vacuna es un autoantígeno. Dicha vacuna resulta útil en la modulación de la tolerancia en un organismo. La inmunización con un autoantígeno y un agente que bloquea la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja de unión natural (por ejemplo PD-1) puede romper la tolerancia (es decir, interferir con la tolerancia de un autoantígeno). Dicha vacuna también incluye adyuvantes tales como la alúmina o las citoquinas (por ejemplo GM-CSF, IL-12, B7-1 ó B7-2).

En una realización, un agente que inhibe la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, puede administrarse con polipéptidos del CHM de clase I mediante, por ejemplo, una célula transfectada para coexpresar un polipéptido PD-L2 ó mediante el bloqueo de anticuerpos y del polipéptido cadena  $\alpha$  del CHM de clase I y la microglobulina  $\beta_2$ , resultando en la activación de las células T y proporcionando inmunidad frente a la infección. Por ejemplo, entre los patógenos víricos para los que resultan útiles las vacunas se incluyen: hepatitis B, hepatitis C, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, VIH-1, VIH-2, tuberculosis, paludismo y esquistosomiasis.

En otra aplicación, la inhibición de la actividad de PD-L2 ó de la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, puede resultar útil en el tratamiento de la inmunidad tumoral. Las células tumorales (por ejemplo sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma o carcinoma) pueden transfectarse con una molécula de ácidos nucleicos que inhibe la actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1. Estas moléculas pueden ser, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos de orientación antisentido respecto a PD-L2, o pueden codificar anticuerpos anti-PD-L2 no activadores o combinaciones de anticuerpos anti-PD-L2 y anti-PD-L1. Estas moléculas también pueden ser la región variable de un anticuerpo anti-PD-L2 y/o de un anticuerpo anti-PD-L1. Si se desea, las células tumorales también pueden transfectarse con otros polipéptidos que activan la coestimulación (por ejemplo B7-1 ó B7-2). Las células tumorales transfectadas se devuelven al paciente, resultan en la inhibición (por ejemplo en la inhibición local) de la actividad de PD-L2 ó en la interacción PD-L2-PD-1. Alternativamente, pueden utilizarse técnicas de terapia génica para focalizarse en una célula tumoral para la transfección *in vivo*.

La estimulación de una respuesta inmunológica frente a células tumorales también puede conseguirse mediante la inhibición de la actividad de PD-L2 ó mediante la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, mediante tratamiento de un paciente con un agente que inhiba la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1. Entre los ejemplos preferentes de dichos agentes se incluyen, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos antisentido, anticuerpos que reconocen y bloquean PD-L2, una combinación de anticuerpos que reconoce y bloquea PD-L2 y anticuerpos que reconocen y bloquean PD-L1, y compuestos que bloquean la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales sobre una célula inmunológica (por ejemplo moléculas de PD-L2 monovalentes solubles; formas solubles de moléculas de PD-L2 que no se unen a receptores de Fc sobre células presentadoras de antígenos; formas solubles de una o más parejas de unión de PD-L2, y compuestos identificados en los cribados de ensayo del sujeto). En una realización más preferente, la pareja de unión de PD-L2 es PD-1.

Además, las células tumorales que no presentan moléculas de CHM clase I ó de CHM clase II, o que no expresan cantidades suficientes de moléculas del CHM de clase I ó II, pueden transfectarse con ácidos nucleicos codificantes de la totalidad o una parte (por ejemplo una parte truncada en el dominio citoplasmático) de un polipéptido cadena  $\alpha$  del CHM de clase I y polipéptido microglobulina  $\beta_2$  o un polipéptido cadena  $\alpha$  del CHM de clase II y un polipéptido cadena  $\beta$  del CHM de clase II, expresando de esta manera polipéptidos del CHM de clase I ó II sobre la superficie celular. La expresión del CHM de clase I ó de clase II apropiado conjuntamente con un polipéptido inhibidor de PD-L2 ó ácido nucleico antisentido induce una respuesta inmunológica mediada por células T contra la célula tumoral transfectada. Opcionalmente, un gen codificante de un constructo antisentido que bloquea la expresión de un polipéptido asociado al CHM de clase II, tal como la cadena invariante, también puede cotransfectarse con un ADN codificante de un polipéptido inhibidor de PD-L2 ó con un ácido nucleico tumoral. La expresión de B7-1 por parte de células tumorales murinas negativas para B7-1 se ha demostrado que induce inmunidad específica mediada por células T acompañada de rechazo tumoral y una protección prolongada frente al reto tumoral en ratones (Chen L. *et al.*, Cell 71: 1093-1102, 1992; Townsend S.E. y Allison J.P., Science 259:368-370, 1993; Baskar S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5687-5690, 1993). De esta manera, la inducción de una respuesta inmunológica mediada por células inmunológicas en un sujeto humano puede resultar suficiente para superar la tolerancia específica tumoral en el sujeto.

La respuesta inmunológica puede estimularse mediante la inhibición de la actividad de PD-L2 ó de la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, de manera que se supere la tolerancia preexistente. Por ejemplo, las respuestas inmunológicas contra antígenos contra los que un sujeto no puede montar

una respuesta inmunológica significativa, por ejemplo antígenos específicos de tumor, pueden ser inducidas mediante la administración de un agente que inhibe la actividad de PD-L2 ó la capacidad de PD-L2 de unirse a su pareja de unión natural, por ejemplo PD-1. Pueden utilizarse antagonistas de PD-1 como adyuvantes para reforzar las respuestas a antígenos foráneos durante el proceso de inmunización activa.

Las células inmunológicas pueden obtenerse de un sujeto y cultivarse *ex vivo* en presencia de un agente que inhiba la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1, con el fin de expandir la población de células inmunológicas. A continuación, las células inmunológicas pueden ser administradas en un sujeto. Puede estimularse que las células inmunológicas proliferen *in vitro* proporcionando a las células inmunológicas, por ejemplo, una señal de activación primaria y una señal coestimuladora, tal como es conocido de la técnica. También pueden utilizarse diversas formas de polipéptidos PD-L2 ó agentes que inhiben la actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1 y/o PD-L1/PD-1 para coestimular la proliferación de las células inmunológicas. En un aspecto, las células inmunológicas se cultivan *ex vivo* según los métodos descritos en la solicitud de patente PCT nº WO 94/29436. La molécula coestimuladora puede ser soluble, encontrarse unida a una membrana celular o unirse a una superficie sólida, tal como una perla.

Durante la realización de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención la regulación positiva de una respuesta inmunológica mediante la administración de uno o más agentes adicionales. Por ejemplo, otros agentes que es conocido que estimulan la respuesta inmunológica, tales como citoquinas, adyuvantes o formas estimuladoras de moléculas coestimuladoras o de sus ligandos pueden ser utilizados conjuntamente con un agente que inhibe la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1. Por ejemplo, puede utilizarse un agente que inhiba PD-L1 (por ejemplo un agente de bloqueo de PD-L1) conjuntamente con un agente que inhiba PD-L2 (por ejemplo un anticuerpo de bloqueo de PD-L2). PD-L1 es un ligando de PD-1 adicional que se describe en la patente US copendiente nº 6.936.704; solicitud publicada de patente internacional WO nº 01/14557; Dong H. *et al.*, Nat. Med. 5:1365-1369, 1999; y Freeman G.J. *et al.*, J. Exp. Med. 192:1027-1034, 2000.

#### E. Identificación de citoquinas moduladas mediante modulación de la actividad de PD-L2 ó de la interacción PD-L2-PD-1

Las moléculas de PD-L2 indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para identificar citoquinas producidas en células inmunológicas o cuya producción resulta incrementada o inhibida en las mismas en respuesta a la modulación de la actividad de PD-L2 ó la interacción de PD-L2 con su pareja o parejas de unión naturales, por ejemplo PD-1. Las células inmunológicas que expresan PD-1 pueden estimularse subóptimamente *in vitro* con una señal de activación primaria, por ejemplo las células T pueden estimularse con éster de forbol, anticuerpo anti-CD3 ó, preferentemente, antígeno, asociado con una molécula de MHC de clase II, y recibir una señal coestimuladora, por ejemplo por una forma estimuladora de antígeno de la familia de B7, por ejemplo por una célula transfectada con ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido B7 y que expresan el péptido sobre su superficie, o por una forma estimuladora soluble del péptido. A continuación, las células pueden ponerse en contacto con células que expresan PD-L2 y/o tratarse con agentes que inhiben la interacción PD-L2-PD-1 (por ejemplo anticuerpos contra PD-L2, o combinaciones de anticuerpos contra PD-L2 y anticuerpos contra PD-L1). Las citoquinas conocidas que se liberan al medio pueden identificarse mediante ELISA o a partir de la capacidad de un anticuerpo que bloquea la citoquina de inhibir la proliferación de las células inmunológicas o la proliferación de otros tipos celulares que resultan inducidos por la citoquina. Por ejemplo, se encuentra disponible un kit ELISA de IL-4 de Genzyme (Cambridge, MA), al igual que un anticuerpo bloqueante de IL-7. Los anticuerpos bloqueantes contra IL-9 e IL-12 se encuentran disponibles del Genetics Institute (Cambridge, MA). A continuación, puede determinarse el efecto de la estimulación o bloqueo de la actividad de PD-L2 ó de la interacción de PD-L2 y PD-1 sobre el perfil de citoquinas.

También puede utilizarse un ensayo de coestimulación *in vitro* de células inmunológicas tal como se ha indicado anteriormente, en un método para identificar nuevas citoquinas que pueden modularse mediante modulación de la actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1. Por ejemplo, en el caso de que la estimulación de la ruta de CD28/CTLA4 aparentemente incremente la secreción de IL-2, la estimulación de la ruta de ICOS aparentemente incrementa la secreción de IL-10 (Hutloff *et al.*, Nature 397:263, 1999). En el caso de que una actividad particular inducida con la coestimulación, por ejemplo la proliferación de células inmunológicas, no pueda inhibirse mediante la adición de anticuerpos bloqueantes de citoquinas conocidas, la actividad puede resultar de la acción de una citoquina desconocida. Tras la coestimulación, dicha citoquina puede purificarse del medio por medios convencionales y su actividad medida a partir de su capacidad de inducir la proliferación de células inmunológicas.

Para identificar las citoquinas que podrían desempeñar un papel en la inducción de tolerancia, puede utilizarse un ensayo de coestimulación *in vitro* de células T tal como el indicado anteriormente. En este caso, las células T recibirían la señal de activación primaria y se pondrían en contacto con una citoquina seleccionada, pero no recibirían la señal de coestimulación. Tras el lavado y reposo de las células inmunológicas, las células se retarían nuevamente con una señal de activación primaria y una señal de coestimulación. En el caso de que las células inmunológicas no respondan (por ejemplo proliferen o produzcan citoquinas), se han tolerizado y la citoquina no ha



impedido la inducción de tolerancia. Sin embargo, en el caso de que las células inmunológicas respondan, la citoquina ha impedido la inducción de tolerancia. Aquellas citoquinas que sean capaces de impedir la inducción de tolerancia puede ser la diana para el bloqueo *in vivo* conjuntamente con reactivos que bloquean antígenos de los linfocitos B, como medio más eficiente para inducir tolerancia en receptores de trasplantes o en sujetos con enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, podría administrarse un anticuerpo bloqueante de citoquinas en un sujeto conjuntamente con un agente que induzca actividad de PD-L2 ó la interacción PD-L2-PD-1.

## EJEMPLOS

En los Ejemplos 1 a 9 se utilizaron los Materiales y Métodos siguientes.

### Materiales y métodos

#### *Ratones*

Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, proporcionó ratones que expresaban un transgén TCR (DO11.10), el cual es específico para el péptido OVA (323-339) asociado a IA<sup>d</sup>. Se obtuvieron ratones Balb/c de Taconic Farms (Germantown, NY). Todos los ratones se utilizaron a edades de entre 6 y 12 semanas. Los ratones recibieron los cuidados indicados en las directrices institucionales.

#### *Clonación molecular*

Una búsqueda de BLAST de la base de datos no redundante del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la secuencia de la proteína PD-L1 humana como proteína problema identificó que el acceso de GenBank n° A142780 (también denominado en la presente memoria PD-L2 de ratón) presentaba una identidad de aminoácidos con PD-L1 del 38%. PD-L1 es un ligando de PD-1 descrito en la patente US copendiente n° 6.936.704; solicitud publicada de patente internacional WO n° 01/14557; Dong H. *et al.*, Nat. Med. 5:1365-1369, 1999; y Freeman G.J. *et al.*, J. Exp. Med. 192:1027-1034, 2000. La región codificante AF142780 se amplificó mediante PCR utilizando como cebadores 5'-dGTCGACCACCATGCTGCTCCTGCTGCCGATA-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'-dGTCGACTCACTAGATCCTCTT-TCTCTGGATTATCAC-3' (SEQ ID NO: 8) y se clonó en pEF6 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Una búsqueda de la base de datos de EST del NCBI identificó 2 EST de corazón fetal humano (accesos de GenBank n° AA247117 y AA247128) con homología con el PD-L2 murino. Se amplificó una región de 101 pb mediante PCR utilizando como cebadores 5'-dGTACATAATAGAGCATGGCAGCA-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-dCCACCTTTTGCAAAGTGGCTGT-3' (SEQ ID NO: 10). El producto de PCR se marcó con biotina y se utilizó para aislar un ADNc de longitud completa mediante Cloncapture (Clontech, Palo Alto, CA) a partir de una biblioteca de ADNc de placenta humana en el vector pAXEF (Freeman G.J. *et al.*, J. Exp. Med. 192:1027-1034, 2000). La secuencia de ADNc del PD-L2 humano de longitud completa se ha depositado en GenBank (número de acceso todavía no asignado).

#### *Proteínas de fusión y transfecciones celulares*

Las proteínas de fusión de Ig consisten de la región extracelular completa de un receptor unido a los dominios de bisagra CH2-CH3 de la Ig  $\gamma$ 2a murina (con cuatro mutaciones puntuales bloqueantes de la unión del receptor de Fc y del complemento), proporcionando fusiones de Ig( $\gamma$ 2a) (Duncan A.R. *et al.*, Nature 332:563-564, 1988; Morgan A. *et al.*, Immunology 86:319-324, 1995). La Ig de control consistía de la secuencia líder de oncostatina-M unida a la Ig  $\gamma$ 2a murina. Estas proteínas recombinantes se produjeron en líneas celulares CHO establemente transfectadas y se purificaron a partir de medio condicionado utilizando proteína A-sefarosa. El ADNc de PD-L2 murino en pEF6 se linearizó con Scal y se coelectroporó en células CHO.I-A<sup>d</sup> o CHO.I-A<sup>d</sup>.mB7-2 con un constructo de plásmido que contenía un gen de resistencia a la puomicina bajo el control de un promotor génico de fosfoglicerato quinasa. El ADNc del PD-L2 humano en pAXEF se linearizó con ApaI y se coelectroporó en células CHO.K1 con un gen de resistencia a la puomicina bajo el control de un promotor génico de fosfoglicerato quinasa. Los transfectantes se seleccionaron en 10 mg/ml de puomicina, se tiñeron con hPDI.Ig, se separaron y se clonaron mediante dilución limitante.

#### *Análisis de transferencia northern*

Se sondearon transferencias northern de múltiples tejidos de ratón y humanos (Clontech, Palo Alto, CA) con sondas de ADNc marcadas radioactivamente con <sup>32</sup>P-dCTP en QuikHyb (Stratagene, La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda de PD-L2 humana consistía de un fragmento XbaI de 1,2 kb que comprendía la región codificante y la secuencia 3' no traducida. La sonda de PD-L2 de ratón consistía de un fragmento de ADNc KpnI/EcoRV de 444 kb que comprendía la región codificante. Las sondas de actina fueron proporcionadas por Clontech. Los filtros se lavaron dos veces a temperatura ambiente en 2X SSC, SDS al 0,1%, seguido de 0,1X SSC, SDS al 0,1% a 65°C y se examinaron mediante autorradiografía.

*Citometría de flujo*

5 Para la detección de PD-L2, se incubaron  $5 \times 10^4$  células CHO transfectadas con 5 mg/ml de PD-Ilg humano (hPD-1.Ig) (Genetics Institute, Cambridge, MA) y se revelaron con anticuerpo de cabra anti-IgG2a de ratón-ficoeritina (PE) (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL). Además, se tiñeron las células separadamente con 5 mg/ml de anti-IA<sup>d</sup>-PE o B7.2-PE (Pharmingen, San Diego, CA).

10 Se incubaron células T CD4<sup>+</sup> con anticuerpo anti-PD-1 biotinilado (o anti-CD28 biotinilado (Pharmingen) o anti-CD25 biotinilado (Pharmingen) y se revelaron con estreptavidina-PE (Pharmingen). Todos los controles de isotipo se obtuvieron de Pharmingen. Tras cada etapa, las células se lavaron tres veces con PBS/BSA al 1%/azida sódica al 0,02%. Tras la incubación final, las células se fijaron con paraformaldehído al 1%. Se analizaron diez mil sucesos en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Todos los controles de isotipo se obtuvieron de Pharmingen.

15 *Activación de células T*

20 Para generar células T específicas de antígeno activadas, se prepararon esplenocitos a partir de ratones DO11.10 y se trataron con Tris-NH<sub>4</sub>Cl para reducir los eritrocitos. Las células se cultivaron con 1 mg/ml de péptido OVA durante 72 horas (Analytical Biotechnology Services, Boston, MA) en RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con FCS al 10% (Sigma, St. Louis, MO), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 250 ng/ml de anfotericina B, Hepes 10 mM, 2-ME 50 pM (todos de Life Technologies) y 15 mg/ml de gentamicina (BioWhittaker, Walkersville, MD). Las células T CD4<sup>+</sup> se purificaron mediante selección positiva utilizando columnas de separación celular activada magnéticamente (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), con una pureza resultante de >98%. Las células se dejaron en reposo durante la noche previamente a la reestimulación.

25 *Estimulación en perlas de células T*

30 Se unieron covalentemente Ab anti-CD3 (2C11; Pharmingen, La Jolla, CA), mPD-L2.Ig e Ig de control a perlas Dynabeads recubiertas de poliuretano y activadas con tosilo (DynaL, Lake Success, NY). Las perlas se prepararon con una concentración subóptima constante de Ab anti-CD3 (60% de la proteína total unida) y mPD-L2.Ig o Ig de control (40% de la proteína unida total). Las perlas presentan una capacidad de unión de proteínas de  $5 \text{ mg}/10^7$  perlas. Las células T se purificaron a partir de nódulos linfáticos Balb/c mediante selección negativa utilizando columnas de enriquecimiento celular (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se cultivaron  $0,5\text{-}1 \times 10^5$  células T en cada pocillo de placas de 96 pocillos con una proporción 2:1 de las perlas de tosilo recubiertas indicadas:células. Se midió la proliferación mediante incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina durante las últimas 10 horas de un cultivo de 72 horas.

35 *Estimulación en células CHO de células T*

40 Se inhibió la proliferación de células CHO transfectadas, mediante incubación con 50 mg/ml de mitomicina C (Bristol Laboratories, Princeton, NJ) ó 16 horas a 37°C. Al final del periodo de incubación, las células se recolectaron con EDTA 10 mM en PBS, se lavaron dos veces y se dejaron sobre hielo durante 1 hora. A continuación las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en medio de cultivo. Se cultivaron  $10^5$  células T CD4<sup>+</sup> previamente activadas, con concentraciones variables de péptido OVA y  $10^4$  CHO transfectantes tratadas con mitomicina C, en placas de 96 pocillos. Para someter a ensayo la proliferación, los cultivos se incubaron durante 48 horas y se pulsaron con 1 mCi/pocillo de [<sup>3</sup>H]-timidina (New England Nuclear, Boston, MA) durante las últimas 6 horas del periodo de incubación.

*ELISA de citoquinas*

50 Se recolectaron alícuotas de los sobrenadantes en diversos tiempos después del inicio de los cultivos. Se analizaron los niveles de IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 utilizando mAb y estándares de citoquina recombinante de Pharmingen. Los límites de detección eran los siguientes: IL-2: 20 pg/ml; IL-4: 40 pg/ml; IFN- $\gamma$ : 100 pg/ml, e IL-10: 200 pg/ml.

55 *Ensayo de protección frente a ARNasa (RPA)*

60 Se reestimularon células T CD4<sup>+</sup> con diversas células CHO transfectantes y 0,01 mg/ml de péptido OVA. Tras 48 horas, se recolectaron las células y se aisló el ARNm utilizando reactivo TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies, Grand Island, NY). Se analizaron 5 mg de ARNm para los niveles de citoquina mediante ensayo de protección frente a ARNasa utilizando el kit multisonda RiboQuant mCK1 siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmingen, San Diego, CA).

*Análisis del ciclo celular*

Se reestimularon células T CD4<sup>+</sup> con 0,01 mg/ml de péptido y CHO transfectantes, tal como se ha indicado

anteriormente. Tras 36 horas de cultivo, se recuperaron las células y se tiñeron con anti-CD4-FITC. Las células se lavaron en PBS, se fijaron en etanol al 70% durante 1 hora sobre hielo y después se resuspendieron en PBS que contenía 10 mg/ml de ARNasa (Sigma, St. Louis, MO) y 50 mg/ml de yoduro de propidio (Sigma). El análisis se llevó a cabo dentro de la hora posterior de tinción utilizando un FACScalibur.

## **EJEMPLO 1: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ADNc de PD-L2 HUMANO Y DE RATÓN**

En el presente ejemplo se describe la identificación y caracterización de los genes codificantes del PD-L2 humano y del PD-L2 de ratón.

### Aislamiento del ADNc del PD-L2 humano

La invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de genes humanos codificantes de nuevos polipéptidos, denominados en la presente memoria PD-L2 humanos. Se aisló el ADNc de PD-L2 humano a partir de una biblioteca de ADNc placentario humano utilizando como sonda la EST humana AA247117. Se determinó la secuencia completa del PD-L2 humano y se encontró que contenía un marco de lectura abierto denominado "PD-L2" humano.

La secuencia de nucleótidos codificante del PD-L2 humano se muestra en la figura 1 y se indica como SEQ ID NO: 1. El polipéptido codificado por este ácido nucleico comprende aproximadamente 273 aminoácidos y presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 e indicada como SEQ ID NO: 2. La región codificante (marco de lectura abierto) de SEQ ID NO: 1 se indica como SEQ ID NO: 3.

La secuencia de nucleótidos codificante del PD-L2 de ratón se muestra en la figura 2 y se indica como SEQ ID NO: 4. El polipéptido codificado por este ácido nucleico comprende aproximadamente 247 aminoácidos y presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 e indicada como SEQ ID NO: 5. La región codificante (marco de lectura abierto) de SEQ ID NO: 4 se indica como SEQ ID NO: 6.

### Análisis de las moléculas de PD-L2 humano y de ratón

Cada una de las secuencias de aminoácidos del PD-L2 humano y de ratón se analizó mediante comparación con otros miembros de la familia de B7 para la presencia de un péptido de señal. Estos análisis resultaron en la identificación de un dominio de péptido de señal en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 humano nativo (SEQ ID NO: 2) en aproximadamente los residuos 1 a 19 (figura 3). Estos análisis identificaron además un dominio de péptido de señal en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 de ratón nativo (SEQ ID NO: 5) en aproximadamente los residuos 1 a 19 (figura 3).

Cada una de las secuencias de aminoácidos del PD-L2 humano y de ratón se analizó además mediante comparación con otros miembros de la familia de B7 para la presencia de un dominio IgV. Estos análisis resultaron en la identificación de un dominio IgV en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 humano nativo (SEQ ID NO: 2) en aproximadamente los residuos 20 a 120 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 1 a 101 en el polipéptido maduro predicho. Estos análisis identificaron además un dominio IgV en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo de ratón (SEQ ID NO: 5) en aproximadamente los residuos 20 a 120 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 1 a 101 en el polipéptido maduro predicho.

Además, cada una de las secuencias de aminoácidos del PD-L2 humano y de ratón fue analizada mediante comparación con otros miembros de la familia de B7 para la presencia de un dominio IgC. Estos análisis resultaron en la identificación de un dominio IgC en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo humano (SEQ ID NO: 2) en aproximadamente los residuos 121 a 219 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 102 a 200 en el polipéptido maduro predicho. Estos análisis identificaron además un dominio IgC en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo de ratón (SEQ ID NO: 5) en aproximadamente los residuos 121 a 219 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 102 a 200 en el polipéptido maduro predicho.

Cada una de las secuencias de aminoácidos del PD-L2 humano y de ratón se analizó además mediante comparación con otros miembros de la familia de B7 para la presencia de un dominio extracelular. Estos análisis resultaron en la identificación de un dominio extracelular en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 humano nativo (SEQ ID NO: 2) en aproximadamente los residuos 1 a 219 (figura 1), y en aproximadamente los residuos 1 a 200 en el polipéptido maduro predicho. Estos análisis identificaron además un dominio extracelular en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo de ratón (SEQ ID NO: 5) en aproximadamente los residuos 1 a 219 (figura 2), y en aproximadamente los residuos 1 a 200 en el polipéptido maduro predicho.

Cada una de las secuencias de aminoácidos del PD-L2 humano y de ratón fue analizada además mediante comparación con otros miembros de la familia de B7 para la presencia de un dominio transmembranal. Estos análisis resultaron en la identificación de un dominio transmembranal en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo

humano (SEQ ID NO: 2) en aproximadamente los residuos 220 a 243 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 201 a 224 en el polipéptido maduro predicho. Estos análisis identificaron además un dominio transmembranal en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo de ratón (SEQ ID NO: 5) en aproximadamente los residuos 220 a 242 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 201 a 223 en el polipéptido maduro predicho.

Cada una de las secuencias de aminoácidos del PD-L2 humano y de ratón fue analizada además mediante comparación con otros miembros de la familia de B7 para la presencia de un dominio citoplasmático. Estos análisis resultaron en la identificación de un dominio citoplasmático en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo humano (SEQ ID NO: 2) en aproximadamente los residuos 244 a 273 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 225 a 254 en el polipéptido maduro predicho. Estos análisis identificaron además un dominio citoplasmático en la secuencia de aminoácidos del PD-L2 nativo de ratón (SEQ ID NO: 5) en aproximadamente los residuos 243 a 247 (figura 3), y en aproximadamente los residuos 224 a 228 en el polipéptido maduro predicho.

La proteína PD-L2 de ratón presenta una identidad de secuencia de aminoácidos del 38% con el PD-L1 de ratón (ver la figura 6). El PD-L2 de ratón y humano presentan una identidad de secuencia de aminoácidos del 70% (figura 6), que es superior a la identidad de 46% a 50% entre el B7-1 ó el B7-2 humanos y murinos.

#### **EJEMPLO 2: EXPRESIÓN DEL POLIPÉPTIDO PD-L2 RECOMBINANTE EN CÉLULAS BACTERIANAS**

En el presente ejemplo, el PD-L2 humano se expresó como polipéptido de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) recombinante en *E. coli* y se aisló y se caracterizó el polipéptido de fusión. Específicamente, se fusionó PD-L2 con GST y este polipéptido de fusión se expresó en *E. coli*, por ejemplo en la cepa PEB199. La expresión de la proteína de fusión GST-PD-L2 en PEB199 se indujo con IPTG. El polipéptido de fusión recombinante se purificó a partir de lisados bacterianos crudos de la cepa PEB199 inducida, mediante cromatografía de afinidad sobre perlas de glutatión. Mediante la utilización de análisis electroforético en gel de poliacrilamida del polipéptido purificado de los lisados bacterianos, se determinó el peso molecular del polipéptido de fusión resultante.

#### **EJEMPLO 3: UNIÓN DE PD-L2 a PD-1**

Se transfectaron células COS con un plásmido de expresión que contenía AF142780, el ADNc de PD-L2 de ratón o un ligando PD-1 de ratón de control. Tras 72 horas, las células COS transfectadas se desengancharon mediante incubación en PBS que contenía EDTA 0,5 mM durante 30 minutos a 37°C.

Se sometió a ensayo la capacidad de las células COS expresantes de PD-L2 de unirse a diversas proteínas de fusión de Ig. El análisis de FACS de la unión de IgG2a (Ig de control), ICOS-IgG y PD-1-Ig por células COS transfectadas con PD-L2 demostró que ni IgG2a ni ICOS-IgG se unían a PD-L2 ó al ligando PD-1 de control. Sin embargo, se demostró que PD-1-Ig se unía a PD-L2 y al ligando PD-1 de control (figura 4).

Los experimentos con ADNc de PD-L2 humano proporcionaron resultados similares a los obtenidos con ADNc de PD-L2 de ratón.

También se llevaron a cabo experimentos con células CHO. Los estudios de citometría de flujo indicaron que hPD-1-Ig reconoce las células CHO establemente transfectadas con PD-L2 (fig. 7). Esta tinción era específica, ya que no se producía unión a los transfectantes de control (CHO-IA<sup>d</sup>, CHO-IA<sup>d</sup>/B7.2). Las células CHO transfectadas con PD-L2 no mostraron tinción con CTLA4-Ig, CD28Ig o ICOS-Ig. También se aisló una variante alternativamente procesada de PD-L2 murino, en la que el exón IgV ha sido deletado. Esta variante no se unía a PD-1-Ig, indicando que el dominio IgV resulta necesario para la unión de PD-L2 a PD-1.

#### **EJEMPLO 4: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS TOTALMENTE HUMANOS CONTRA PD-L2**

En el presente ejemplo, se generaron anticuerpos totalmente humanos contra PD-L2 en ratones que eran transgénicos para los genes marco de inmunoglobulina humana. Se obtuvieron ratones transgénicos mediante métodos estándares, por ejemplo según Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, o se obtuvieron comercialmente. Se manipularon células madre embrionarias siguiendo procedimientos publicados (*Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*, Robertson E.J., editor, IRL Press, Washington, D.C., 1987; Zijlstra *et al.*, *Nature* 342:435-438, 1989, y Schwartzberg *et al.*, *Science* 246:799-803, 1989). Se llevaron a cabo procedimientos de clonación de ADN según Sambrook J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Se sintetizaron oligonucleótidos, por ejemplo en un sintetizador de oligonucleótidos de Applied BioSystems según especificaciones proporcionadas por el fabricante o se obtuvieron comercialmente.

Se inmunizaron ratones transgénicos utilizando un PD-L2 purificado o recombinante o una proteína de fusión que comprende por lo menos una parte inmunogénica del dominio extracelular de PD-L2. Se inyectaron por vía intraperitoneal en cada ratón aproximadamente cuatrocientos mg de PD-L2 en 100 ml de solución salina tamponada

con fosfato (PBS). Se recogieron muestras de suero aproximadamente seis días después mediante sangrado del seno retroorbital.

5 Se evaluó la reactividad y especificidad de los anticuerpos para PD-L2 utilizando un ensayo indirecto de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Se sometieron a ensayo varias moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas a modo de controles (por ejemplo CTLA4 y CD28) para analizar la especificidad de anticuerpo del anticuerpo para PD-L2. Los anticuerpos que presentaban regiones de marco humanas que se unían a PD-L2 se detectaron con conjugados de enzima específicos para las subclases de IgM humana y de IgG humana sin reactividad cruzada con inmunoglobulinas de ratón. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación de PVC con PD-L2 mediante el recubrimiento de los pocillos durante la noche a 37°C con 5 mg/ml de PD-L2 en PBS. Se diluyeron muestras de suero en PBS, suero al 5%, Tween-20 al 0,5%, y se incubaron en los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de Fc anti-IgG humana y F(ab') de IgG-peroxidasa de rábano picante o Fc anti-IgM humana-peroxidasa de rábano picante, en el mismo diluyente. Tras 1 hora a temperatura ambiente, se evaluó la actividad enzimática mediante adición de sustrato ABTS (Sigma, St. Louis, Mo.) y se leyó tras 30 minutos a 415-490 nm. En muestras de suero preinmunización de los mismos ratones también se sometieron a ensayo los títulos de anticuerpos humanos contra los mismos antígenos diana.

20 Se recolectaron células de bazo aisladas de ratones que presentaban títulos de anticuerpos apropiados. Las células de bazo se fusionaron con parejas de fusión apropiadas (por ejemplo células de mieloma) para preparar hibridomas. Los hibridomas y anticuerpos se manipularon según *Antibodies: A Laboratory Manual*, editores Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

#### EJEMPLO 5: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA PD-L2

##### 25 *Anticuerpos anti-PD-L2 humano*

También pueden prepararse anticuerpos anti-PD-L2 mediante inmunización de ratones con ADNc. Para la producción de anticuerpos anti-PD-L2 humano, se prepararon ratones Balb/c hembra (Harlan Sprague-Dawley, Inc., Indianapolis, IN) para la inmunización con ADNc mediante inyección de 50 µl de cardiotoxina 10 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) en solución salina al 0,9% en el músculo tibial anterior de cada pata trasera. 30 Cinco días después, se inyectaron 50 µl de ADNc de hPD-L2 purificado 1 mg/ml en el vector de expresión de mamífero pAXEF en solución salina al 0,9%, en cada músculo tibial anterior en regeneración de cada ratón. Se repitió la inmunización con ADNc dos veces a intervalos de 2 semanas. A continuación, los ratones se dejaron en reposo durante cuatro semanas, seguido de tres refuerzos de 100 µg de ADNc en cada ratón, separados por 3 a 4 35 semanas. Cinco días antes de la fusión, un ratón seleccionado para la fusión recibió un refuerzo de ADNc por vía intramuscular. Las células de bazo se fusionaron con células de mieloma SP2/0, se clonaron y los hibridomas se cribaron mediante ELISA para reactividad con proteína de fusión hPD-L2-mIgG2a, seguido de la tinción de la superficie celular de células 300.19 y COS transfectadas con hPD-L2, y para la falta de reactividad, con células no transfectadas y células transfectadas con hPD-L1.

40 Se aislaron nueve anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón anti-PD-L2 humano. Con el fin de determinar la capacidad de estos anticuerpos de bloquear la interacción PD-1/PD-L2, los mAb anti-PD-L2 se preincubaron con células transfectadas con PD-L2. La inhibición de la interacción se midió como la capacidad de los mAb de reducir la unión de PD-1-Ig biotinilado a células transfectadas con PD-L2. Los mAb mejores fueron los anticuerpos 24F.10C12 45 (también denominados en la presente memoria 10C12) y 24F7G12 (también denominados en la presente memoria 7G12). Los resultados fueron los siguientes:

	<u>Intensidad de fluorescencia media de hPD-1-Ig biotinilado unido a 300 células hPD-L2</u>
mAb	
7G12	0,110
10C12	0,109
control positivo	2,57

##### 50 *Anticuerpos anti-PD-L2 de ratón*

Para la producción de anticuerpos anti-PD-L2 de ratón, se prepararon ratones Balb/c hembra (Harlan Sprague-Dawley, Inc., Indianapolis, IN) para la inmunización con ADNc mediante inyección de 100 µl de cardiotoxina 10 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) en solución salina al 0,9% en el músculo tibial anterior de cada pata trasera. 55 Cinco días después, se inyectaron 100 µl de ADNc de hPD-L2 murino purificado 1 mg/ml en el vector de expresión de mamífero pEF6 en solución salina al 0,9%, en cada músculo tibial anterior en regeneración de cada rata. Se repitió la inmunización con ADNc tres veces a intervalos de 2 a 3 semanas. A continuación, se inmunizaron las ratas con  $1-5 \times 10^7$  CHO transfectantes de mPD-L2 cuatro veces a intervalos de 2 a 5 semanas.

5 Cinco días antes de la fusión, una rata seleccionada para la fusión recibió un refuerzo tanto de ADNc (200 mg) como de células ( $5 \times 10^7$ ). Las células de bazo se fusionaron con células de mieloma SP2/0, se clonaron y los hibridomas se cribaron mediante tinción de la superficie celular de células 300.19 y COS transfectadas con mPD-L2 y para la falta de reactividad, con células no transfectadas y células transfectadas con mPD-L1. Se produjeron anticuerpos monoclonales que reconocían específicamente mPD-L2.

#### EJEMPLO 6: EXPRESIÓN DE PD-L2

10 Para analizar la expresión de PD-L2, se analizó la expresión de ARNm mediante hibridación de transferencia northern en una diversidad de tejidos y en células presentadoras de antígenos activadas. Los ARNm de PD-L2 humano y murino se expresan a nivel elevado en la placenta normal, y se expresan a niveles bajos en bazo, nódulos linfáticos y timo normales. PD-L2 también se expresa en el corazón humano, pero se expresa a un nivel bajo en el corazón de ratón. Otros tejidos en los que se expresa PD-L2 son el páncreas, el pulmón y el hígado humanos. No se detectó ARNm de PD-L2 en monocitos humanos no estimulados, pero resultó regulado positivamente por la estimulación con IFN- $\gamma$ . La inducción de PD-L2 presentó una cinética ligeramente retrasada en comparación con la regulación positiva de PD-L1 (Freeman G.J. *et al.*, J. Exp. Med. 192:1027-1034, 2000). El análisis de transferencia northern de líneas celulares tumorales murinas reveló expresión de ARNm de PD-L2 en líneas de origen linfoides tales como PU5-1.8 (linfoma mielóide), RAW 264.7 (linfoma de macrófagos), R1.1 (linfoma T), L1210 (leucemia linfocítica), P388D1 (linfoma de monocitos/macrófagos) y P815 (mastocitoma). PD-L2 se expresaba a nivel bajo o nulo en todas las líneas celulares de fibroblastos (M-MSV Balb/3T3, K-Balb, LM) y en la línea celular de teratocarcinoma P19. PD-L2 también se expresa en las líneas celulares de hepatoma (Hepa 1-6) y de neuroblastoma (NB41A3).

#### EJEMPLO 7: LA INTERACCIÓN PD-L2-PD-1 INHIBE LAS RESPUESTAS MEDIADAS POR TCR

25 Con el fin de investigar el papel de la ruta de PD-L2-PD-1 en la activación de las células T, se utilizó un sistema de activación de las células T basado en perlas Dynal. Se activaron células T purificadas a partir de nódulos linfáticos de Balb/c, con perlas recubiertas con anti-CD3 más Ig de control o con mPD-L2.Ig. Se midió la proliferación mediante incorporación de timidina- $^3$ H. Las células T activadas con anti-CD3 más perlas recubiertas con mPD-L2.Ig mostraron una reducción marcada de la proliferación en comparación con las células activadas con anti-CD3 más control (figura 8). De esta manera, la unión sobre las células T de PD-1 a PD-L2 conduce a la inhibición de la proliferación de las células T.

35 Con el fin de estudiar las señales específicas de antígenos, se compararon células CHO coexpresantes de PD-L2 y I-A<sup>d</sup> y células CHO que expresaban niveles similares de sólo I-A<sup>d</sup> (figura 7) respecto a su capacidad de activar las células T CD4<sup>+</sup> DO11.10. Debido a que PD-1 se encuentra regulado positivamente después de la activación, se utilizaron células T DO11.10 preactivadas para permitir la máxima interacción de PD-L2. Se incubaron células T CD4<sup>+</sup> preactivadas con un intervalo de concentraciones de péptido OVA (323-339) y CHO transfectantes tratadas con mitomicina C. Tal como se observa en la figura 9, las células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 preactivadas proporcionaron una respuesta proliferativa moderada frente al péptido OVA presentado por CHO.1-A<sup>d</sup>. En contraste, esta respuesta se vio significativamente reducida en presencia de PD-L2. La producción de interleuquina (IL)-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 también se vieron marcadamente reducidas (fig. 9). No se detectó IL-2 bajo dichas condiciones de activación. Estos datos demuestran que las interacciones PD-1-PD-L2 pueden inhibir la proliferación y producción de citoquinas mediadas por TCR. Los efectos de inhibición de la ruta de PD-1-PD-L2 y la expresión de PD-L2 en órganos no linfoides apuntan a un papel en el control de las reacciones autoinmunitarias.

#### EJEMPLO 8: PD-L2 PUEDE INHIBIR LAS SEÑALES DE TCR-CD28

50 Debido a que la expansión clonal óptima de las células T requiere las señales tanto de TCR como de CD28, se examinaron las interrelaciones entre las señales de TCR más CD28 y PD-L2-PD-1. Para ello, se utilizaron las CHO transfectantes siguientes: CHO.I-A<sup>d</sup>.B7-2 y CHO.I-A<sup>d</sup>.B7-2.PD-L2. Se comparó la capacidad de estas CHO transfectantes de estimular células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 previamente activadas con péptido OVA. La expresión de I-A<sup>d</sup> y B7-2 era similarmente alta en estas CHO transfectantes (fig. 7). El nivel de expresión de PD-L2, medido por la unión de PD-1.Ig, era elevado. Tal como se esperaba, la introducción de B7-2 condujo a un incremento de las respuestas proliferativas por parte de las células T a todas las concentraciones de antígeno, con la estimulación más marcada a concentraciones de antígeno bajas (figura 10). La coexpresión de PD-L2 sobre las CHO transfectantes inhibió las respuestas proliferativas mediadas por TCR y B7-2 a concentraciones de péptido bajas (0,01 mg/ml y 0,001 mg/ml) (figura 10). A la concentración de péptido de 0,01 mg/ml, PD-L2 inhibió significativamente la producción de citoquinas mediada por TCR-B7-2, lo que resulta consistente con la inhibición de la proliferación (figura 11). A la concentración de péptido de 0,1 mg/ml, con la que se produjo sólo una inhibición débil de la proliferación, la producción de citoquinas resultó inhibida al cultivar las células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 con péptido y transfectantes CHO.I-A<sup>d</sup>.B7-2.PD-L2 (figura 12). Por lo tanto, la unión de PD-1 a PD-L2 puede regular negativamente la estimulación mediada por TCR-CD28 de la producción de citoquinas.

Con el fin de determinar si la menor producción de citoquinas se debía a niveles reducidos de ARNm, se midieron los niveles de ARNm de citoquinas mediante el ensayo de protección frente a ARNasa. Se detectaron con facilidad los ARNm de interleuquina-4, IL-10, IL-13, IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  en células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 previamente activadas, tras la estimulación con 0,01 mg/ml de péptido OVA presentado por CHO.I-A<sup>d</sup>.B7-2. Sin embargo, la introducción de PD-L2 en transfectantes CHO.I-A<sup>d</sup>.B7-2 redujo significativamente los niveles de ARNm para las citoquinas tanto T<sub>h</sub>1 como T<sub>h</sub>2. Se observó una expresión mínima de ARNm de citoquinas al incubar células T previamente activadas, solas o con péptido presentado por CHO.I-A<sup>d</sup>. Estos resultados corroboran la capacidad de las rutas de PD-L2-PD-1 de antagonizar una señal de B7-CD28 cuando la estimulación antigénica es débil o limitante.

Con el fin de evaluar si la capacidad de la ruta de PD-L2-PD-1 de inhibir a concentraciones de antígeno bajas se relacionaba con variaciones de los niveles de expresión de CD28 y PD-1 a diferentes concentraciones de antígeno, se examinó la expresión en superficie de PD-1 y CD28. La Tabla 1 muestra la intensidad de fluorescencia media de PD-1, CD28 y CD25 sobre las células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 tras diferentes condiciones de activación.

**Tabla 1: IFM de CD28, PD-1 y CD25 sobre células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 previamente activadas y durante la reestimulación con CHO.I-A<sup>d</sup>.B7-2**

	Anticuerpo	IFM							
Células T CD4 <sup>+</sup> DO11.10 recién aisladas	CD28	33							
	PD-1	14							
	CD25	27							
	Isotipo	16							
<hr/>									
Células T CD4 <sup>+</sup> DO11.10 previamente activadas		Exp. 1				Exp. 2			
	CD28	50				117			
	PD-1	51				51			
	CD25	373				2705			
	Isotipo	12				17			
<hr/>									
Células T CD4 <sup>+</sup> DO11.10 reestimuladas	Conc. péptido (mg/ml)	0,001	0,01	0,1	1,0	0,001	0,01	0,1	1,0
		<hr/>							
		Exp. 1				Exp. 2			
	CD28	77	106	123	165	77	121	338	516
<hr/>									
		Exp. 1				Expt. 2			
	PD-1	78	56	41	39	117	92	84	55
	CD25	334	417	560	1154	2507	2602	2971	7021
	Isotipo	11	14						

Se incubaron células T CD4<sup>+</sup> con anticuerpo anti-PD-1 biotinilado, anti-CD28 biotinilado, anti-CD25 biotinilado o control de isotipo biotinilado y se revelaron con estreptavidina-PE.

Las células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 recién aisladas expresaban CD28, pero ni PD-1 ni CD25. Las células T estimuladas con 1 mg/ml de péptido presentado por células APC esplénicas regularon positivamente CD28 en un grado modesto y incrementaron fuertemente PD-1 y CD25. Tras la reestimulación de células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 previamente activadas, con diversas concentraciones de péptido presentado por CHO.I-A<sup>d</sup>.B7.2, se incrementó la expresión de CD28 y CD25 sobre las células T CD4<sup>+</sup> a la concentración de péptido más alta. En contraste, la expresión de PD-1 fue más alta sobre las células T activadas a baja concentración de péptido y se redujo a concentraciones de péptido más altas. La expresión más alta de PD-1 a dosis de antígeno más bajas sugiere adicionalmente un mecanismo por el que la ruta de PD-L2-PD-1 podría atenuar las respuestas débiles a antígenos.

**EJEMPLO 9: MECANISMO DE ACCIÓN DE LA RUTA DE PD-1-PD-L2**

Se ha demostrado que el entrecruzamiento de CTLA-4 inhibe la progresión del ciclo celular en células T no expuestas (Krummel M.F. y Allison J.P., J. Exp. Med. 183:2533-2540, 1996; Walunas T.L. *et al.*, J. Exp. Med.

183:2541-2550, 1996). Debido a que PD-1 se aisló de líneas celulares murinas que experimentaban apoptosis, un posible mecanismo de acción de la ruta de PD-1:PD-2 podría ser el incremento de la muerte celular programada (por ejemplo la muerte celular inducida por activación, o AICD). Para examinar esta cuestión, se reestimularon células T CD4<sup>+</sup> DO11.10 con 0,01 mg/ml de péptido y diversas CHO transfectantes, y se analizó la progresión del ciclo celular. Tras 48 horas, se recuperaron las células, se tiñeron con CD4-FITC, se permeabilizaron y se incubaron con yoduro de propidio para analizar las poblaciones G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S/G<sub>2</sub> y subdiploide. Las células T CD4<sup>+</sup> reestimuladas con péptido presentado por CHO-IA<sup>d</sup> o por CHO-IA<sup>d</sup>/PD-L2 presentaban en ambos casos una gran proporción de células en la población subdiploide, indicativa de apoptosis (figura 13). Estos resultados fueron confirmados mediante la tinción con anexina. En los cultivos en los que se estimularon células T CD4<sup>+</sup> con péptido presentado por CHO-IA<sup>d</sup> (1 mg/ml), se produjo un número incrementado de células en la etapa S/G<sub>2</sub>, indicando que las células se encontraban en el ciclo. La introducción de PD-L2 en transfectantes I-A<sup>d</sup> condujo a un número incrementado de células en la etapa G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, sugiriendo la detención del ciclo celular.

A continuación, se comparó la progresión del ciclo celular en presencia de las señales B7-2 y PD-L2. Las células T CD4<sup>+</sup> estimuladas con 0,01 mg/ml de péptido presentado por CHO.I-A<sup>d</sup>.B7-2 mostraron un número incrementado de células en la etapa S/G<sub>2</sub> y un número reducido en la población subdiploide, indicando que las células se encontraban en el ciclo y que habían sido rescatadas de la apoptosis por la coestimulación con B7-CD28 (figura 14). Tal como se observa con los transfectantes CHO.I-A<sup>d</sup> a concentraciones de péptido más altas, la introducción de PD-L2 en transfectantes B7-2 condujo a un número incrementado de células en la etapa G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y a una reducción correspondiente de aquéllas en etapa S. No se observó ninguna diferencia en la proporción de células apoptóticas entre las células T estimuladas con B7-2 y con B7-2.PD-L2, indicando que el entrecruzamiento de PD-1 no conducía a un incremento de la muerte celular.

#### **EJEMPLO 10: ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T MEDIANTE INHIBICIÓN DE LA INTERACCIÓN DE PD-1:LIGANDO DE PD-1**

Tal como se ha indicado anteriormente, la señalización mediante PD-1 se encuentra doinada por fuertes señales coestimuladoras de TCR/CD28; la ruta de señalización de PD-1 inhibe las señales coestimuladoras moderadas de TCR/CD28, reduciéndose la producción de citoquinas en primer lugar sin una reducción de la proliferación de las células T. A medida que se debilitan las señales coestimuladoras de TCR/CD28, domina la ruta de PD-1, con una gran reducción de la producción de citoquinas, acompañada de la reducción de la proliferación. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, con el fin de determinar si la inhibición de la ruta de PD-1 mediante inhibición de la interacción con PD-L1 ó PD-L2 incrementaría la activación de las células T, se llevaron a cabo reacciones mixtas de linfocitos (MLR) utilizando células presentadoras de antígenos (APC) débilmente funcionales (es decir, células presentadoras de antígenos con una débil coestimulación de TCR/CD28).

Las células dendríticas maduras son APC potentes. Sin embargo, el tratamiento con IL-10 reduce su potencia. Los informes previos indican que IL-10 reduce en gran medida la potencia de las APC células dendríticas, y ello se ha atribuido a una reducción de la expresión de MHC, B7-1 y B7-2. Sin embargo, los experimentos en la presente memoria indican que la reducción es modesta; además, las células dendríticas tratadas con IL-10 expresan PD-L1 y PD-L2.

Se aislaron células dendríticas mieloides inmaduras mediante cultivo de monocitos sanguíneos periféricos humanos en IL-4 y GM-CSF. La exposición de las células dendríticas inmaduras a un cóctel inflamatorio de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub> induce el desarrollo de células dendríticas maduras que funcionan como APC. Sin embargo, la adición de IL-10 a las citoquinas inflamatorias proporcionadas durante la etapa de maduración resulta en unas APC que funcionan sólo a 1/6 a 1/3 del nivel previo a la adición.

Los ensayos de activación de células T (MLR) se llevaron a cabo tal como se ha descrito de manera general anteriormente, utilizando células dendríticas tratadas con IL-10 como APC, en presencia de anticuerpos contra PD-L1 y/o PD-L2, o de anticuerpos de control. La adición de mAb anti-PD-L1 ó anti-PD-L2 a cultivos de células dendríticas tratadas con IL-10 más células T alogénicas resultó en un incremento de 3 veces de la proliferación de las células T, en comparación con los cultivos tratados con IgG de control (figura 15). Una combinación de anticuerpos anti-PD-L1 y anti-PD-L2 resultó en un incremento de la estimulación mayor que el observado con cualquiera de los anticuerpos por sí solo (figura 16). Esta estimulación era consistente con el resultado esperado del bloqueo de la señal inmunoinhibidora mediada por la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1.

#### **Equivalentes**

El experto en la materia reconocerá, o podrá determinar, utilizando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a los descritos en la presente memoria.

SEQ ID NO:1



GCAAACCTTAAGCTGAATGAACAACCTTTTCTTCTCTTGAATATATCTTAACGCCAAATTTTGAGTGCTTTTTTG  
TTACCCATCCTCATATGTCCAGCTGGAAAGAATCCTGGGTGGAGCTACTGCATGTTGATTGTTTTGTTTTTC  
CTTTTGGCTGTTTCAATTTTGGTGGCTACTATAAGGAAATCTAACACAAACAGCAACTGTTTTTTGTTGTTTACTT  
TTGCATCTTTACTTGTGGAGCTGTGGCAAGTCCTCATATCAAATACAGAACATGATCTTCTCCTGCTAATGTT  
GAGCCTGGAATTGCAGCTTCACCAGATAGCAGCTTTATTACAGTGACAGTCCCTAAGGAACTGTACATAATAG  
AGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGAATGCAACTTTGACACTGGAAGTCATGTGAACCTTGGAGCAATAACAGCC  
AGTTTGCAAAAGGTGGAAAATGATACATCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTTGCTGGAGGAGCAGCTGCCCT  
AGGGAAGGCCTCGTTCCACATACCTCAAGTCCAAGTGAGGGACGAAGGACAGTACCAATGCATAATCATCTATG  
GGTTCGCCTGGGACTACAAGTACCTGACTCTGAAAGTCAAAGCTTCTACAGGAAAATAAACACTCACATCCTA  
AAGGTTCCAGAAACAGATGAGGTAGAGCTCACCTGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGAAGTATCCTGGCC  
AAACGTCAGCGTTCCTGCCAACACCAGCCACTCCAGGACCCCTGAAGGCCTTACCAGGTACCAGTGTCTG  
GCCTAAAGCCACCCCTGGCAGAAACTTCAGCTGTGTGTTCTGGAATACTCAGTGAGGGAACCTACTTTGGCC  
AGCATTGACCTTCAAAGTCAGATGGAACCCAGGACCCATCCAACTTGGCTGCTTACATTTTTCATCCCCTCCTG  
CATCATTGCTTTTCAATTTTCATAGCCACAGTGATAGCCCTAAGAAAACAACTCTGTCAAAGCTGTATTCTTCAA  
AAGACACAACAAAAGACCTGTCCACACAACAAAGAGGGAAGTGAACAGTGCTATCTGAACCTGTGGTCTTGGG  
AGCCAGGTGACCTGATATGACATCTAAAGAAGCTTCTGGACTCTGAACAAGAAATTCGGTGGCCTGCAGAGCTT  
GCCATTTGACTTTTCAAATGCCTTTGGATGACCCAGCA

SEQ ID NO:2

5 MIFLLMLSLLEQLHQIAALFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLNCFDGTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERAT  
LLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIIIYGVAWDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGY  
PLAEVSWPNVSPANTSHSRTPEGLYQVTSVLRLLKPPGRNFSCVFWNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPTWL  
LHIFIPSCIIAFIFIAFVIALRKQLCQKLYSSKDTTKRPVTTTKREVNSAI

SEQ ID NO:3

10 ATGATCTTCTCCTGCTAATGTTGAGCCTGGAATTGCAGCTTACCAGATAGCAGCTTTATTACAGTGACAGT  
CCCTAAGGAACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCTGGAATGCAACTTTGACACTGGAAGTCATG  
TGAACCTTGGAGCAATAACAGCCAGTTTGCAAAAGGTGGAAAATGATACATCCCCACACCGTGAAAGAGCCACT  
TTGCTGGAGGAGCAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCCACATACCTCAAGTCCAAGTGAGGGACGAAGGACA  
GTACCAATGCATAATCATCTATGGGGTCGCCTGGGACTACAAGTACCTGACTCTGAAAGTCAAAGCTTCTTACA  
GGAAAATAAACACTCACATCCTAAAGGTTCCAGAAACAGATGAGGTAGAGCTCACCTGCCAGGCTACAGGTTAT  
CCTCTGGCAGAAGTATCCTGGCCAAACGTCAGCGTTCCTGCCAACACCAGCCACTCCAGGACCCCTGAAGGCCT  
CTACCAGGTACCAGTGTCTGCGCCTAAAGCCACCCCTGGCAGAAACTTCAGCTGTGTGTTCTGGAATACTC  
ACGTGAGGGAACCTACTTTGGCCAGCATTGACCTTCAAAGTCAGATGGAACCCAGGACCCATCCAACTTGGCTG  
CTTACATTTTTCATCCCCTCCTGCATCATTGCTTTCAATTTTCATAGCCACAGTGATAGCCCTAAGAAAACAACT  
CTGTCAAAGCTGTATTCTTCAAAGACACAACAAAAGACCTGTCCACACAACAAAGAGGGAAGTGAACAGTG  
CTATC

SEQ ID NO:4

GAATTCGGCACGAGGTCAAATGTGGCATATCTTTGTTGTCTCCTTCTGTCTCCCAACTAGAGAGAACACACTTA  
CGGCTCCTGTCCCGGGCAGGTTTGGTTGTCCGGTGTGATTGGCTTCCAGGGAACCTGATACAAGGAGCAACTGTG  
TGCTGCCCTTTTCTGTGTCTTTGCTTGAGGAGCTGTGCTGGGTGCTGATATTGACACAGACCATGCTGCTCCTGC  
TGCCGATACTGAACCTGAGCTTACAACCTCATCCTGTAGCAGCTTTATTACCCTGACAGCCCCCTAAAGAAGTG  
TACACCGTAGACGTCCGCAGCAGTGTGAGCCTGGAGTGCATTTTGACCGCAGAGAATGCACTGAACTGGAAGG  
GATAAGAGCCAGTTTGCAGAAGGTAGAAAATGATACGTCTCTGCAAAGTGAAAGAGCCACCCTGCTGGAGGAGC  
AGCTGCCCTGGGAAAGGCTTTGTTCCACATCCCTAGTGTCCAAGTGAGAGATTTCCGGGCAGTACCGTTGCCTG  
GTCATCTGCGGGGCCCTGGGACTACAAGTACCTGACGGTGAAAGTCAAAGCTTCTTACATGAGGATAGACAC  
TAGGATCCTGGAGGTTCCAGGTACAGGGGAGGTGCAGCTTACCTGCCAGGCTAGAGGTTATCCCCTAGCAGAAG  
TGTCTTGGCAAAATGTCAGTGTCTCTGCCAACACCAGCCACATCAGGACCCCCGAAGGCCTCTACCAGGTCACC

AGTGTCTGCGCCTCAAGCCTCAGCCTAGCAGAACTTCACTGTCATGTTCTGGAATGCTCACATGAAGGAGCT  
GACTTCAGCCATCATTGACCCTCTGAGTCGGATGGAACCCAAAGTCCCAGAACCTGGCCACTTCATGTTTCA  
TCCCGGCCTGCACCATCGCTTTGATCTTCTGGCCATAGTGATAATCCAGAGAAAGAGGATCTAGGGGAAGCTG  
TATTACGGAAGAAGTGGTCTCTTCTTCCCAGATCTGGACCTGCGGTCTTGGGAGTTGGAAGGATCTGATGGAA  
ACCCCTAAGAGACTTCTGGACTCAAAGTGAGAATCTTGCAGGACCTGCCATTTGCACTTTTGAACCCTTTGGAC  
GGTGACCCAGGGCTCCGAAGAGGAGCTTGTAAAGACTGACAATCTTCCCTCTGTCTCAAGACTCTCTGAACAGCA  
AGACCCCAATGGCACTTTAGACTTACCCCTGGGATCCTGGACCCCAAGTGAGGGCCTAAGGCTCCTAATGACTTT  
CAGGGTGAGAACAAAAGGAATGCTCTCCGCCCCACCCCACTCCTGCTTTCCGCAGGGAGACATGGAAATTC  
CCAGTTACTAAAATAGATTGTCAATAGAGTTATTTATAGCCCTCATTTCCCTCCGGGGACTTGAAGCTTCAGAC  
AGGGTTTTTCATAAACAAAGTCATAACTGATGTGTTTTACAGCATCCTAGAATCCTGGCAGCCTCTGAAGTTCT  
AATTAAGTGAAGCATTTAAGCAACACGTCAGTGCCTTCTGTGTTTCTACTTTTCTGTTTTTAA  
AGTGTGAGTCACAAGGTAATTGTTGTAACCTGTGATATCACTGTTTCTTGTGTCTCTTCTTTCAACTACATCTT  
TTAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO:5

5

MLLLLPILNLSLQLHPVAALFTVTAPKEVYTVDVGSSVSLCEDFDRRECTELEGRASLQKVENDTSLQSERAT  
LLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRCLVICGAAWDYKYLTVKVKASYMRIDTRILEVPGTGEVQLTCQARGY  
PLAEVSWQNVSPANTSHIRTPEGLYQVTSVLRKLPQPSRNFSCMFWNAHMKELTSALIDPLSRMEPKVPRTWP  
LHVFI PACTIALIFLAIVIIQRKRIMLLLPIILNLSLQLHPVAALFTVTAPKEVYTVDVGSSVSLCEDFDRREC  
TELEGRASLQKVENDTSLQSERATLLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRCLVICGAAWDYKYLTVKVKASY  
MRIDTRILEVPGTGEVQLTCQARGYPLAEVSWQNVSPANTSHIRTPEGLYQVTSVLRKLPQPSRNFSCMFWNA  
HMKELTSALIDPLSRMEPKVPRTWPLHVFI PACTIALIFLAIVIIQRKRI

SEQ ID NO:6

ATGCTGCTCCTGCTGCCGATACTGAACCTGAGCTTACAACCTTCATCCTGTAGCAGCTTTATTCACCGTGACAGC  
CCCTAAAGAAGTGTACACCGTAGACGTCGGCAGCAGTGTGAGCCTGGAGTGCGATTTTGACCGCAGAGAATGCA  
CTGAACTGGAAGGGATAAGAGCCAGTTTGCAGAAGGTAGAAAATGATACGTCCTCTGCAAAGTGAAAGAGCCACC  
CTGCTGGAGGAGCAGCTGCCCTGGGAAAGGCTTTGTTCACATCCCTAGTGTCCAAGTGAGAGATTCCGGGCA  
GTACCGTTGCCTGGTCATCTGCGGGGCCGCTGGGACTACAAGTACCTGACGGTGAAAGTCAAAGCTTCTTACA  
TGAGGATAGACACTAGGATCCTGGAGGTTCCAGGTACAGGGGAGGTGCAGCTTACCTGCCAGGCTAGAGGTTAT  
CCCCTAGCAGAAGTGTCTGGCAAAAATGTCAGTGTTCCTGCCAACACCAGCCACATCAGGACCCCCGAAGGCT  
CTACCAGGTCACCAGTGTCTGCGCCTCAAGCCTCAGCCTAGCAGAAACTTCAGCTGCATGTTCTGGAATGCTC  
ACATGAAGGAGCTGACTTCAGCCATCATTGACCCTCTGAGTCGGATGGAACCCAAAGTCCCCAGAACGTGGCCA  
CTTCATGTTTTTCATCCCGGCTGCACCATCGCTTTGATCTTCTGGCCATAGTGATAATCCAGAGAAAGAGGAT  
CATGCTGCTCCTGCTGCCGATACTGAACCTGAGCTTACAACCTTCATCCTGTAGCAGCTTTATTCACCGTGACAG  
CCCCAAAGAAGTGTACACCGTAGACGTCGGCAGCAGTGTGAGCCTGGAGTGCGATTTTGACCGCAGAGAATGC  
ACTGAAC TGGAAAGGGATAAGAGCCAGTTTGCAGAAGGTAGAAAATGATACGTCCTCTGCAAAGTGAAAGAGCCAC  
CCTGCTGGAGGAGCAGCTGCCCTGGGAAAGGCTTTGTTCACATCCCTAGTGTCCAAGTGAGAGATTCCGGGC  
AGTACCGTTGCCTGGTCATCTGCGGGGCCGCTGGGACTACAAGTACCTGACGGTGAAAGTCAAAGCTTCTTAC  
ATGAGGATAGACACTAGGATCCTGGAGGTTCCAGGTACAGGGGAGGTGCAGCTTACCTGCCAGGCTAGAGGTTA  
TCCCCTAGCAGAAGTGTCTGGCAAAAATGTCAGTGTTCCTGCCAACACCAGCCACATCAGGACCCCCGAAGGCC  
TCTACCAGGTCACCAGTGTCTGCGCCTCAAGCCTCAGCCTAGCAGAAACTTCAGCTGCATGTTCTGGAATGCT  
CACATGAAGGAGCTGACTTCAGCCATCATTGACCCTCTGAGTCGGATGGAACCCAAAGTCCCCAGAACGTGGCC  
ACTTCATGTTTTTCATCCCGGCTGCACCATCGCTTTGATCTTCTGGCCATAGTGATAATCCAGAGAAAGAGGA  
TC

SEQ ID NO:7

5 GTCGACCACCATGCTGCTCCTGCTGCCGATA

SEQ ID NO:8

10 GTCGACTCACTAGATCCTCTTTCTCTGGATTATCAC

SEQ ID NO:9

GTACATAATAGAGCATGGCAGCA

15 SEQ ID NO:10

CCACCTTTTGCAAACCTGGCTGT

SEQ ID NO:11

20 MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVAGEEDL  
KPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLVKNAPYRKINQRISVDPATS  
EHELICQAEGYPEAEVIWNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAE  
LIIPELPATHPPQNRTHWVLLGSILLFLIVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET

SEQ ID NO:12

25 MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDL  
KVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVT  
SEHELTCQAEGYPKAEVIWTS SDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTA  
ELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

**REIVINDICACIONES**

1. Agente que inhibe la interacción entre PD-L2 y PD-1, que comprende una combinación de un anticuerpo de bloqueo que reconoce PD-L2 y un anticuerpo de bloqueo que reconoce PD-L1, en el que PD-L2 es un polipéptido aislado seleccionado de entre el grupo que consiste en:
- 5 a) un fragmento de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en el que el fragmento comprende al menos 20 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:2,
- b) una variante alélica natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en la que el polipéptido se encuentra codificado por una molécula de ácidos nucleicos que se hibrida a un complemento
- 10 de una molécula de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 ó 3, bajo condiciones astringentes,
- c) un polipéptido que se encuentra codificado por una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 70% idéntica a un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 3; y
- 15 d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 71% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. Uso de un agente según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para la regulación positiva de una respuesta inmunológica.
- 20 3. Agente según la reivindicación 1 ó 2, para su uso como medicamento.
4. Agente según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento de una condición que se beneficiaría de la regulación positiva de una respuesta inmunológica.
- 25 5. Agente según la reivindicación 4, en el que la condición se selecciona del grupo que consiste en un tumor, una infección patogénica o una enfermedad inmunosupresora.
6. Agente según la reivindicación 5, en el que dicha infección patogénica se selecciona del grupo que consiste en una infección vírica, una infección bacteriana o una infección parasitaria.
- 30

# FIG. 1

Secuencia de nucleótidos del PD-L2 humano

1 GCAAACCTTAAGCTGAATGAACAACCTTTTCTTCTCTTGAATATATCTTAACGCCAA  
 ATTTTGAGTGCTTTTTTGTACCCATCCTCATATGTCCCAGCTGGAAAGAATCCTG  
 GGTTGGAGCTACTGCATGTTGATTGTTTTGTTTTTCTTTTGGCTGTTCAATTTGG  
 TGGCTACTATAAGGAAATCTAACACAAACAGCAACTGTTTTTTGTTGTTTACTTTT  
 GCATCTTTACTTGTGGAGCTGTGGCAAGTCCTCATATCAAATACAGAACATGATCT  
 TCCTCCTGCTAATGTTGAGCCTGGAATTGCAGCTTCACCAGATAGCAGCTTTATTC  
 ACAGTGACAGTCCCTAAGGAACTGTACATAATAGAGCATGGCAGCAATGTGACCCT  
 GGAATGCAACTTTGACACTGGAAGTCATGTGAACCTTGGAGCAATAACAGCCAGTT  
 TGCAAAGGTGGAAAATGATACATCCCCACACCGTGAAAGAGCCACTTTGCTGGAG  
 GAGCAGCTGCCCTAGGGAAGGCCTCGTTCCACATACCTCAAGTCCAAGTGAGGGA  
 CGAAGGACAGTACCAATGCATAATCATCTATGGGGTTCGCCTGGGACTACAAGTACC  
 TGACTCTGAAAGTCAAAGCTTCTACAGGAAAATAAACACTCACATCCTAAAGGTT  
 CCAGAAACAGATGAGGTAGAGCTCACCTGCCAGGCTACAGGTTATCCTCTGGCAGA  
 AGTATCCTGGCCAAACGTCAGCGTTCCTGCCAACACCAGCCACTCCAGGACCCCTG  
 AAGGCCTCTACCAGGTCACCAGTGTTCTGCGCCTAAAGCCACCCCTGGCAGAAAC  
 TTCAGCTGTGTGTTCTGGAATACTCACGTGAGGGAACTTACTTTGGCCAGCATTGA  
 CCTTCAAAGTCAGATGGAACCCAGGACCCATCCAACTTGGCTGCTTACATTTTCA  
 TCCCCTCCTGCATCATTGCTTTCATTTTCATAGCCACAGTGATAGCCCTAAGAAA  
 CAACTCTGTCAAAGCTGTATTCTTCAAAGACACAACAAAAGACCTGTCACCAC  
 AACAAAGAGGGAAAGTGAACAGTGCTATCTGAACCTGTGGTCTTGGGAGCCAGGGTG  
 ACCTGATATGACATCTAAAGAAGCTTCTGGACTCTGAACAAGAATTCCGGTGGCCTG  
 CAGAGCTTGCCATTTGCACTTTTCAAATGCCTTTGGATGACCCAGCA 1223

Secuencia de aminoácidos del PD-L2 humano

1 MIFLLMLSLLELQLHQIAALFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLNCFDVGSHVNLGAI  
 ASLQKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASPHIPQVQVRDEGQYQCIIIIYGVWDY  
 KYLTLKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSVNPANTSHSR  
 TPEGLYQVTSVLRLKPPPGRNFSVFNWTHVRELTASIDLQSQMEPRTHPTWLLH  
 IFIPSCIIAFIFIAIVIALRKQLCQKLYSSKDTTKRPVTTTKREVNSAI 273

## FIG. 2

Secuencia de nucleótidos del PD-L2 de ratón

1 GAATTCGGCACGAGGTCAAATGTGGCATATCTTTGTTGTCTCCTTCTGTCTCCCAA  
 CTAGAGAGAACACACTTACGGCTCCTGTCCCGGGCAGGTTTGGTTGTGGTGTGAT  
 TGGCTTCCAGGGAACCTGATACAAGGAGCAACTGTGTGCTGCCTTTTCTGTGTCTT  
 TGCTTGAGGAGCTGTGCTGGGTGCTGATATTGACACAGACCATGCTGCTCCTGCTG  
 CCGATACTGAACCTGAGCTTACAACCTTCATCCTGTAGCAGCTTTATTACCCGTGAC  
 AGCCCCATAAGAAGTGTACACCGTAGACGTCGGCAGCAGTGTGAGCCTGGAGTCCG  
 ATTTTGACCGCAGAGAATGCACTGAACTGGAAGGGATAAGAGCCAGTTTGCAGAAG  
 GTAGAAAATGATACGTCTCTGCAAAGTGAAAGAGCCACCCTGCTGGAGGAGCAGCT  
 GCCCCTGGGAAAGGCTTTGTTCCACATCCCTAGTGTCCAAGTGAGAGATTCCGGGC  
 AGTACCGTTGCCTGGTCACTGCGGGGCCGCTGGGACTACAAGTACCTGACGGTG  
 AAAGTCAAAGCTTCTTACATGAGGATAGACACTAGGATCCTGGAGGTTCCAGGTAC  
 AGGGGAGGTGCAGCTTACCTGCCAGGCTAGAGGTTATCCCCTAGCAGAAGTGTCTT  
 GGCAAAATGTCAGTGTTCCTGCCAACACCAGCCACATCAGGACCCCCGAAGGCCTC  
 TACCAGGTCACCAGTGTCTGCGCCTCAAGCCTCAGCCTAGCAGAACTTCACTG  
 CATGTTCTGGAATGCTCACATGAAGGAGCTGACTTCAGCCATCATTGACCCCTCTGA  
 GTCGGATGGAACCCAAAGTCCCAGAACGTGGCCACTTCATGTTTTTCATCCCGGCC  
 TGCACCATCGCTTTGATCTTCTGGCCATAGTGATAATCCAGAGAAAGAGGATCTA  
 GGGGAAGCTGTATTACGGAAGAAGTGGTCTCTTCTTCCCAGATCTGGACCTGCGGT  
 CTGGGAGTTGGAAGGATCTGATGGGAAACCCTCAAGAGACTTCTGGACTCAAAGT  
 GAGAATCTTGAGGACCTGCCATTTGCACTTTTGAACCCTTTGGACGGTGACCCAG  
 GGCTCCGAAGAGGAGCTTGTAAGACTGACAATCTTCCCTCTGTCTCAAGACTCTCT  
 GAACAGCAAGACCCCAATGGCACTTTAGACTTACCCCTGGGATCCTGGACCCAGT  
 GAGGGCCTAAGGCTCCTAATGACTTTCAAGGTTGAGAACAAAAGGAATTGCTCTCCG  
 CCCCACCCACCTCCTGCTTTCCGCAGGGAGACATGGAAATCCCAGTTACTAAA  
 ATAGATTGTCAATAGAGTTATTTATAGCCCTCATTTCTCCGGGGACTTGGAAAGCT  
 TCAGACAGGGTTTTTCATAAACAAAGTCATAACTGATGTGTTTTACAGCATCCTAG  
 AATCCTGGCAGCCTCTGAAGTTCTAATTAACCTGGAAGCATTTAAGCAACACGTCAA  
 GTGCCCCCTGCTGTGGTATTTGTTTTCTACTTTTCTGTTTTTAAAGTGTGAGTCACAA  
 GGTAATTGTTGTAACCTGTGATATCACTGTTTCTTGTGTCTCTTCTTTCAACTACA  
 TCTTTTAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1655

Secuencia de aminoácidos del PD-L2 de ratón

1 MLLLLPILNLSLQLHPVAALFTVTAPKEVYTVDVGSSVSLECDFDRRECTELEGIR  
 ASLQKVENDTSLQSERATLLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRCLVICGAAWDY  
 KYLTVKVKASYMRIDTRILEVPGTGEVQLTCQARGYPLAEVSWQNVSPANTSHIR  
 TPEGLYQVTSVLRLLKPQPSRNFSCMFWNAHMKELTSALIDPLSRMEPKVPRTWPLH  
 VFIPACTIALIFLAIVIIQRKRI 247

# FIG. 3

PD-L2

Orden de dominios: señal, IgV, IgC, transmembranal, citoplasmático

Murino 247 aa

**Péptido de señal** MLLLLPILNLSLQLHPVAA

**IgV** LFTVTAPKEVYTVDVGSSVSLECFDRRECTELEGIRASLQKVENDTSLQS  
ERATLLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRCLVICGAAWDYKYLTVKVK

**IgC** ASYMRIDTRILEVPGTGEVQLTCQARGYPLAEVSWQNVSPANTSHIRTP  
GLYQVTSVLRLLKPPSRNFSMFWNAHMKELTSALIDPLSRMEPKVPR

Extracelular

**Trans-membranal** TWPLHVFIPACTIALIFLAIVII

**Cito-plásmico** QRKRI

Humano 373 aa

**Péptido de señal** MIFLLLMLSLELQLHQIAA

**IgV** LFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHR  
ERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCI IYGVAWDYKYLTLKVK

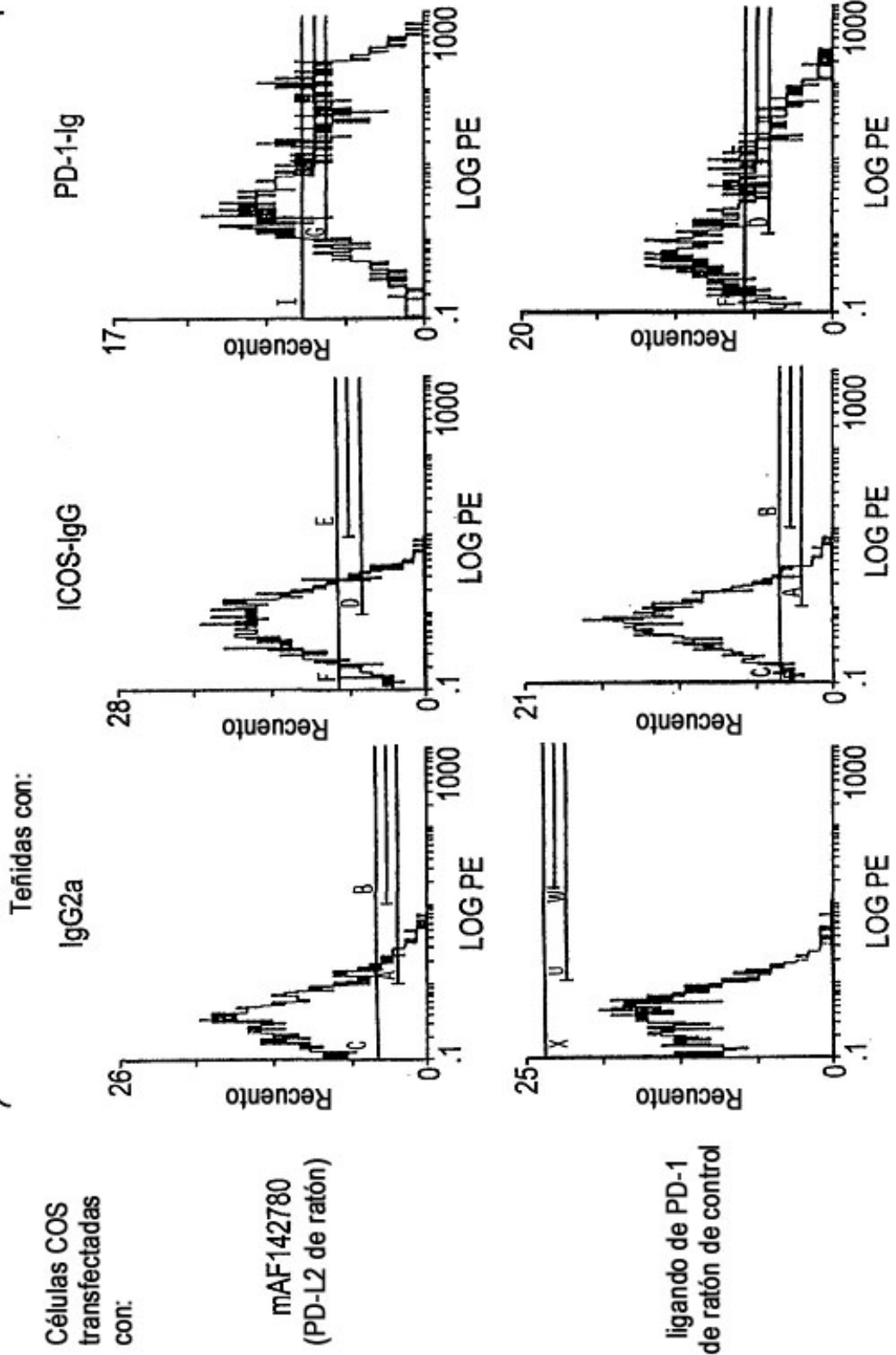
**IgC** ASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSPANTSHSRTP  
GLYQVTSVLRLLKPPPGRNFSVFWNTHVRELTSLASIDLQSQMEPRTHP

Extracelular

**Trans-membranal** TWLLHIFIPSCIIAFIFIATVIAL

**Cito-plásmico** RKQLCQKLYSSKDTTKRPVTTTKREVNSAI

FIG. 4





# FIG. 5

PD-L2 murino vs PD-L2 humano

Identidad del 70%

mPD-L2: 15 HPVAALFTVTAPKEVYTVDVGSSVLECDFRRECTELEGIRASLQKVENDTSLQSERAT 74  
 H +AALFTVT PKE+Y ++ GS+V+LEC+FD L I ASLQKVENDTS ERAT

hPD-L2: 15 HQIAALFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERAT 74

mPD-L2: 75 LLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRCLVICGAANDYKYLTVKVKASYMRIDTRILEVP 134  
 LLEEQLPLGKA FHIP VQVRD GQY+C++I G AWDYKYL+KVKASY +I+T IL+VP

hPD-L2: 75 LLEEQLPLGKASFHIPQVQRDEGQYQCIIYGVANDYKYLTLKVKASYRKINTHILKVP 134

mPD-L2: 135 GTGEVQLTCQARGYPLAEVSWQNVSVVPANTSHIRTPEGLYQVTSVLRLLKPQPSRNFSCMF 194  
 T EV+LTCQA GYPLAEVSW NVSVVPANTSH RTPEGLYQVTSVLRLLKP P RNFSC+F

hPD-L2: 135 ETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNSVVPANTSHSRTPEGLYQVTSVLRLLKPPGGRNFSCVF 194

mPD-L2: 195 WNAHMKELTSAIIDPLSRMEPKVPRTWPLHVFIPACTIALIFLAIVIIQRKRI 247  
 WN H++ELT A ID S+MEP+ TW LH+FIP+C IA IF+A VI RK++

mPD-L2: 195 WNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPTWLLHIFIPSCIIAFIATVIALRKQL 247

# FIG. 6

```

mPD-L2 MLLLLPIILNLSLQLHPVAALFTVTAPKEVYTVVDVGSSVSLECFDRRECTELEGI.....
hPD-L2 MIFLLLMLSLELQLHQIAALFTVTPKELYIIEHGSNVTLECNEDTGSHVNLGAI.....
mPD-L1 ~MRIFAGIIFACCHLLRA.FTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWE
hPD-L1 ~MRIFAVFI FMTYWHLINA.FTVTPKDLVVEYGSNMTIECKEFPVEKQLDLAALIVYWE
1.....10.....20.....30.....40.....50.....

mPD-L2 ...RASLQKV..ENDTSLQ...SERATLLEEQLPLGKALFHIPSVQVRDSGQYRCLVIC
hPD-L2 ...TASLQKV..ENDTSPH...RERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIY
mPD-L1 KEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLKGNALQITDVKLQDAGVYCCIISY
hPD-L1 MEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKQDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY
61.....70.....80.....90.....100.....110.....

mPD-L2 GAAWDYKYLTVKVKASYMRI DTRILEV.PGTGEVQLTCQARGYPLAEVSWQN.....VSV
hPD-L2 GVAWDYKYLTLKVKASYRKIN THILKV.PETDEVELTCQATGYPLAEVSWPN.....VSV
mPD-L1 GGA.DYKRITLKV NAPYRKINQRI.SVDPATSEHELICQAE GYPAEVIW TNSDHQPVSG
hPD-L1 GGA.DYKRITVKNAPY NKINQRI LVVDEVTSEHELTCQAE GYPKAEVIW TSSDHQVLSG
121.....130.....140.....150.....160.....170.....

mPD-L2 PANTSHIRTP EGLYQVTSVLR LKPOPSRNFSCMFWNAHMKELTS A..IIDPLSRMEPKVP
hPD-L2 PANTSHSRTP EGLYQVTSVLR LKPPPGRNFSCVFWNTHVRELT LA..SIDLQSOMEP RTH
mPD-L1 KRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDV FYCTFWRSQPGQNHTAELI IPELPA THPPQN
hPD-L1 KTTT TNSKRE EKL FNVTSLRINTTTNEI FYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLA HPPNE
181.....190.....200.....210.....220.....230.....

mPD-L2 RTWPLHVFIPACTIALIFLAIVIIQRKRI ~~~~~
hPD-L2 PTWLLHIFIPSCIIAIFIFIATVIALRKQLCQKLYSSKDTTKRPVTTTKREVNSAI ~
mPD-L1 RT...HWVLLGSILLELIVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET
hPD-L1 RT...HLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG.RMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
241.....250.....260.....270.....280.....290.....

```

FIG. 7A

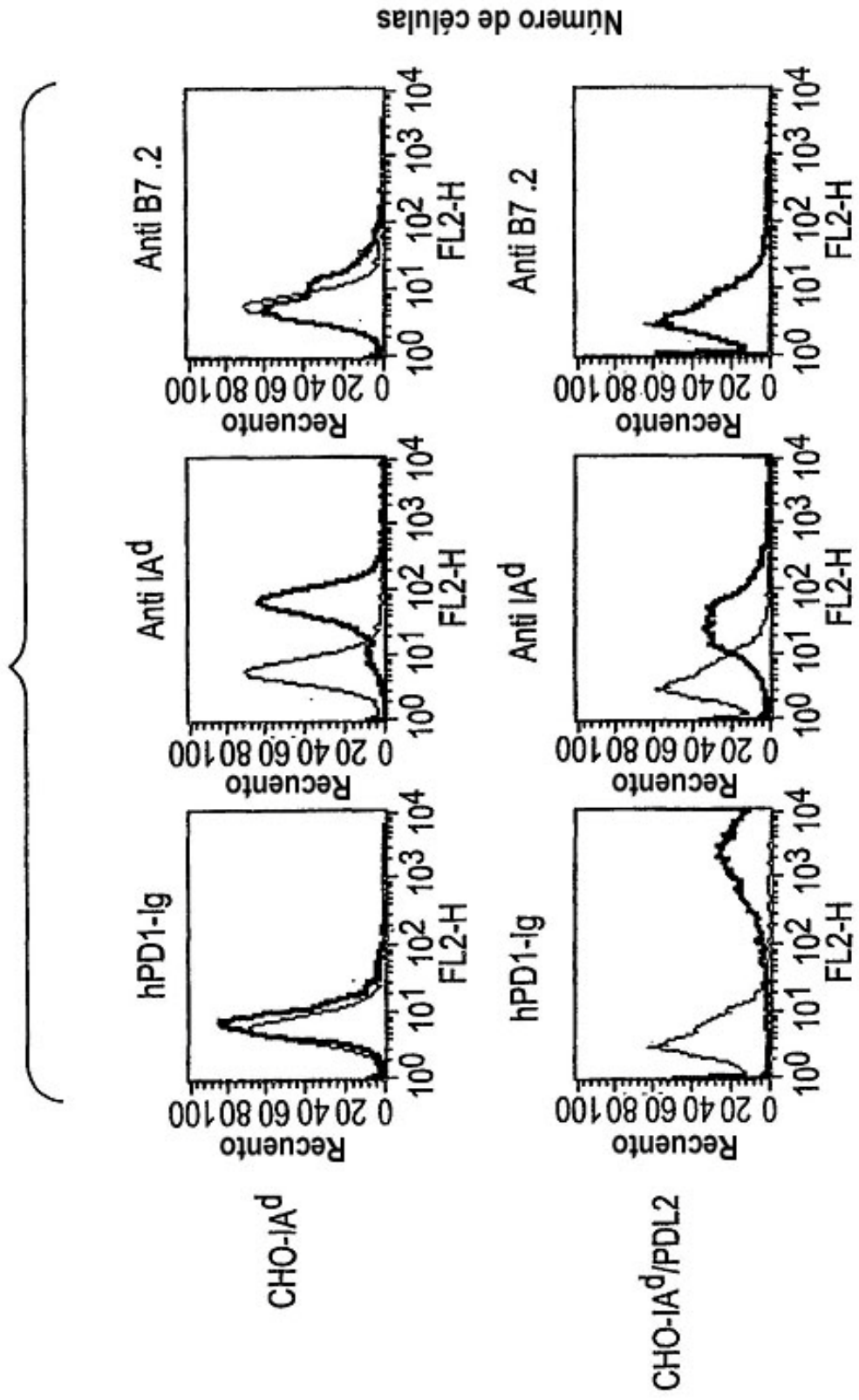
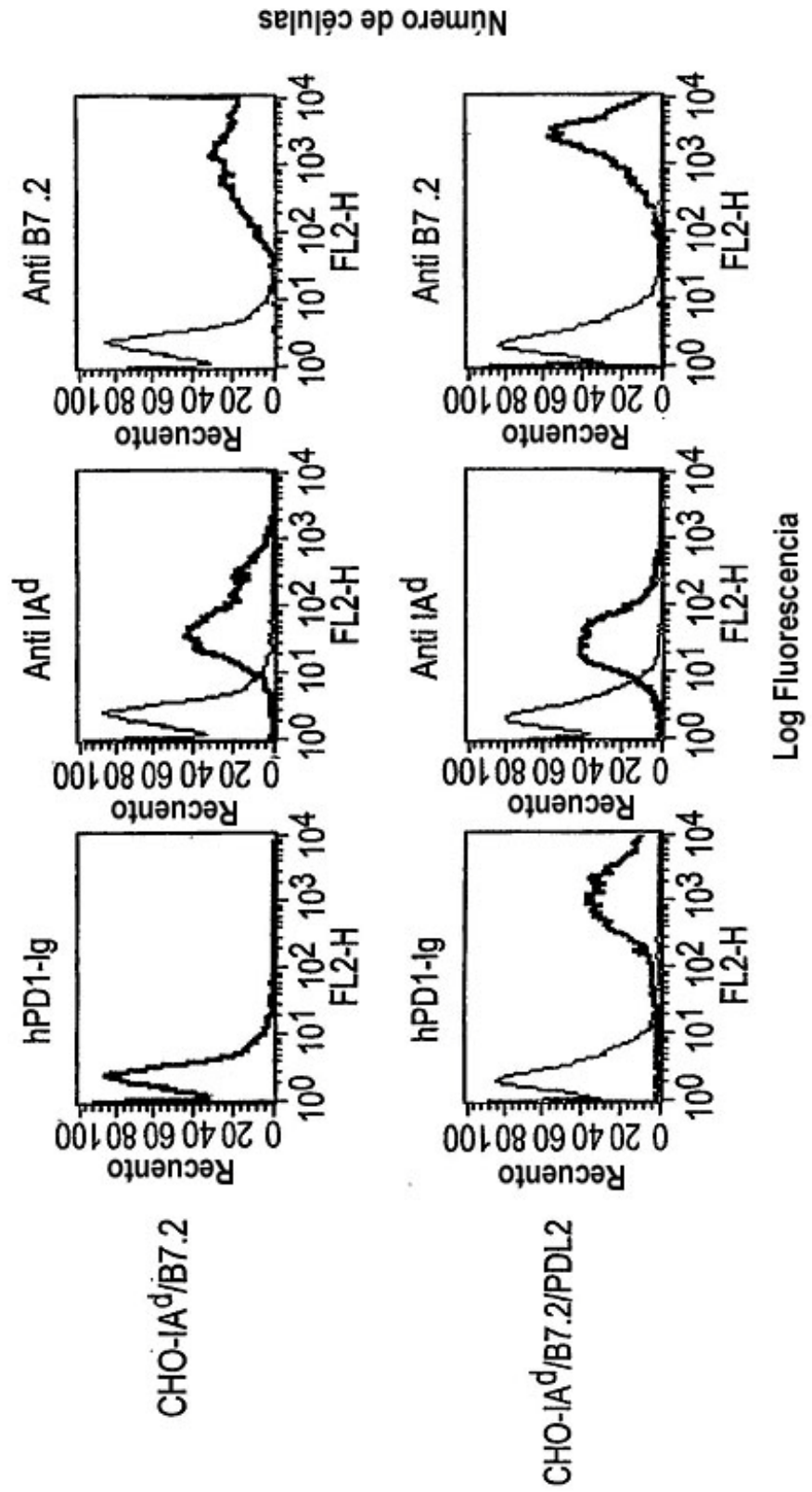


FIG. 7B



**FIG. 8**

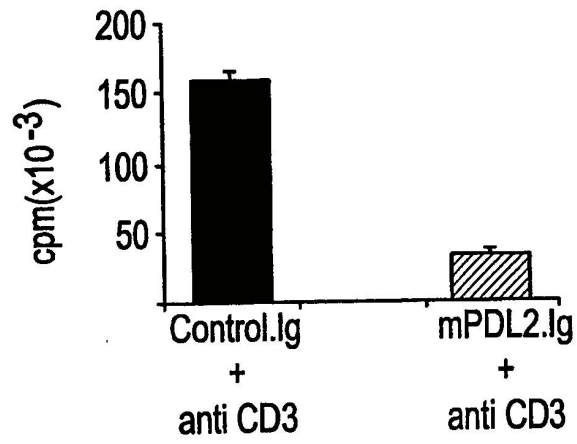


FIG. 9

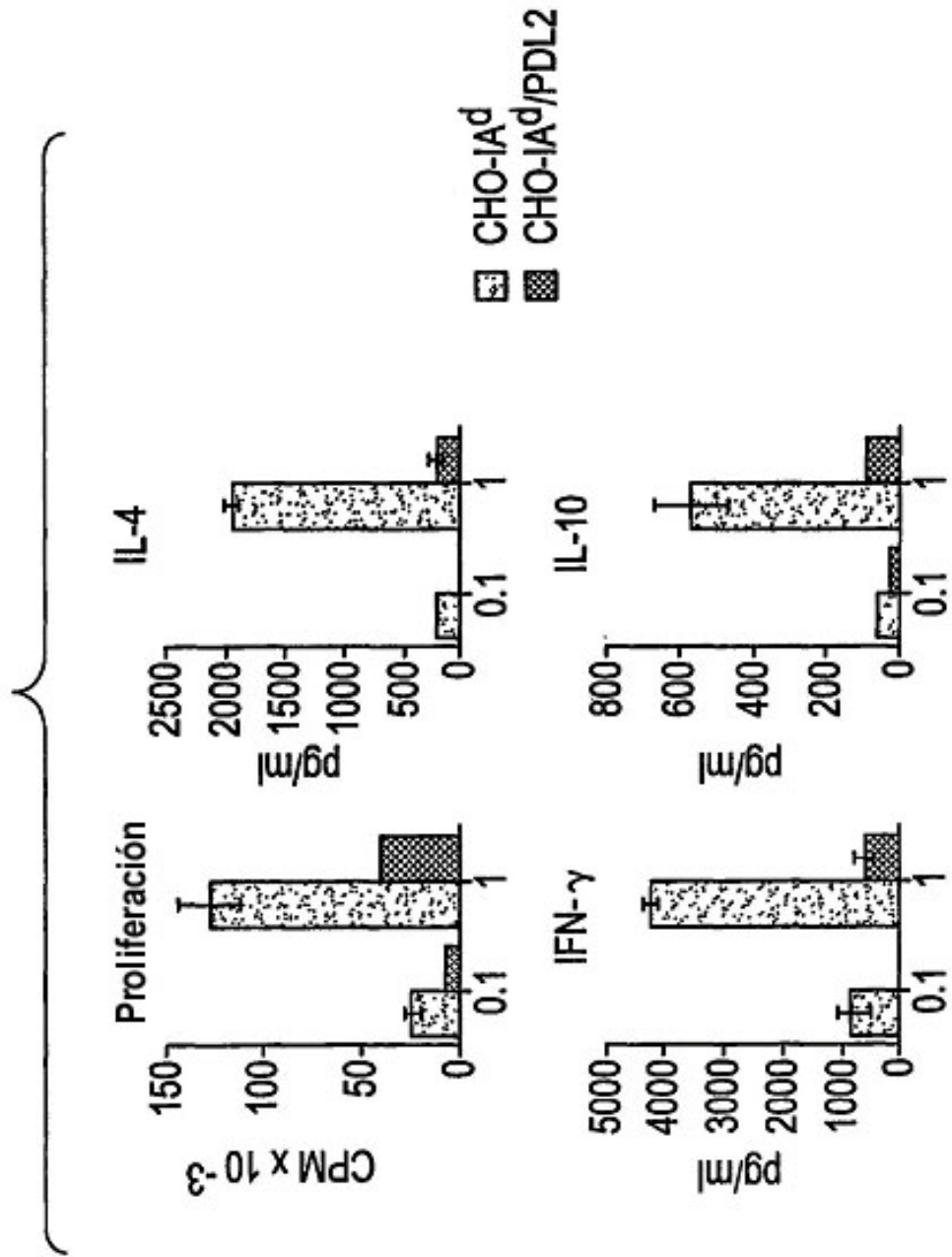


FIG. 10

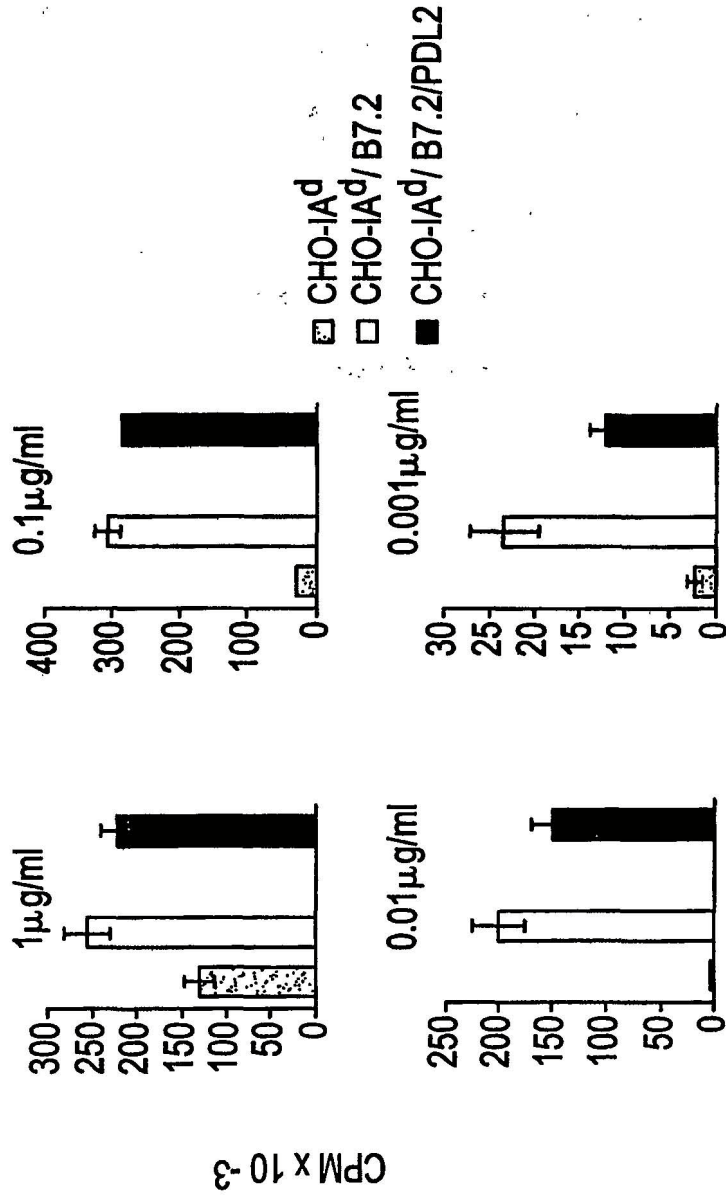


FIG. 11

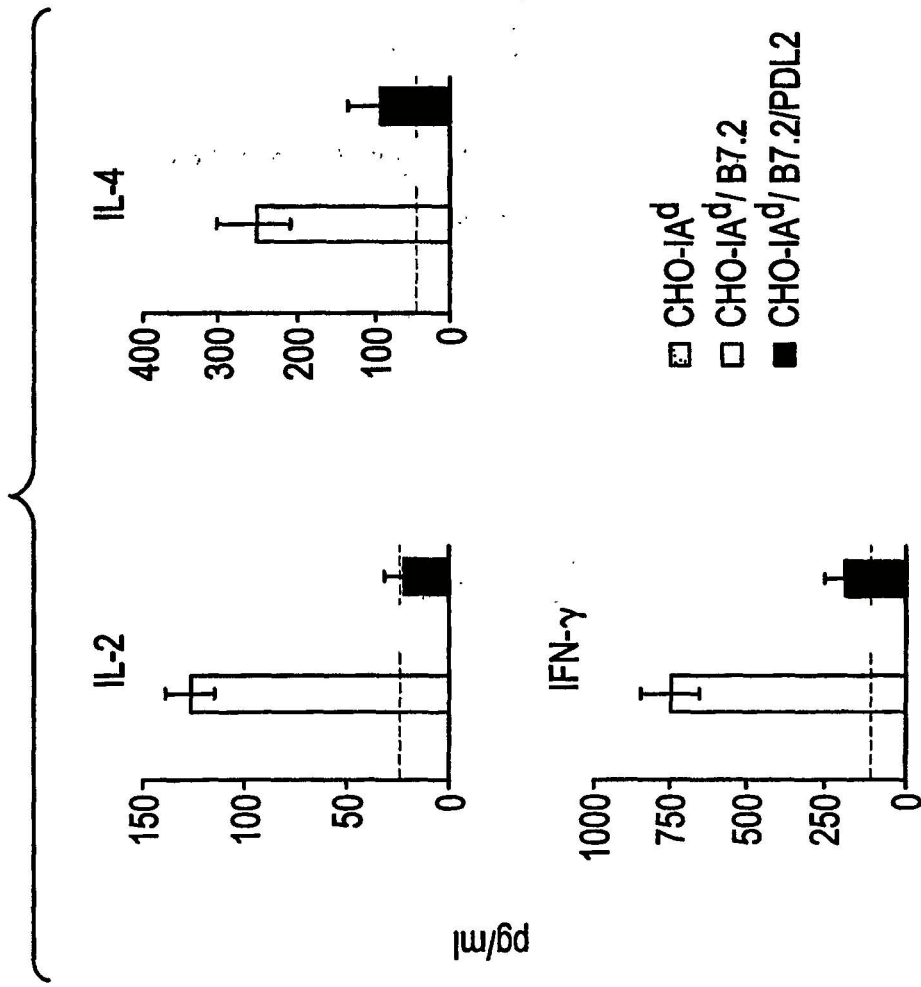
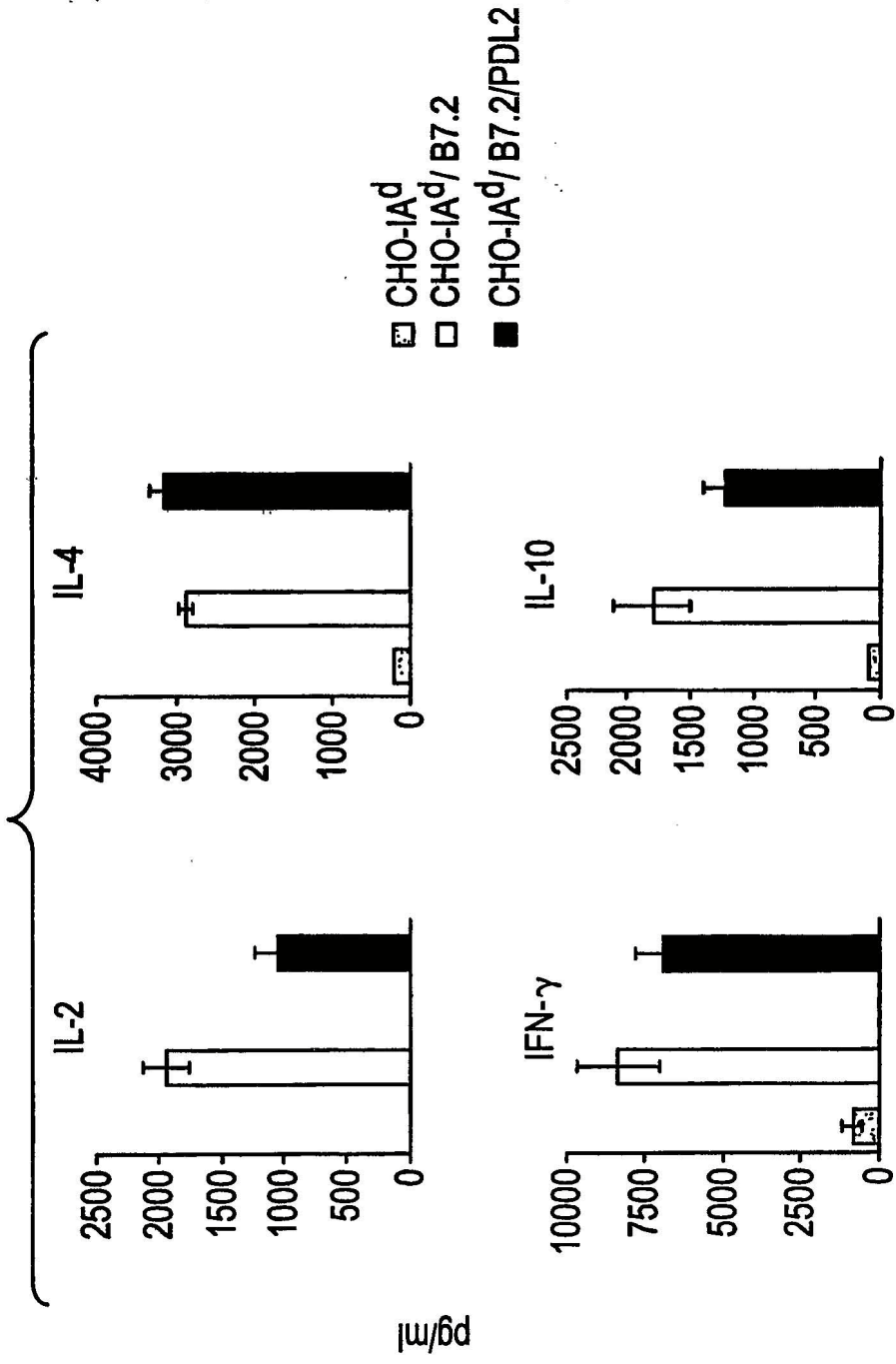
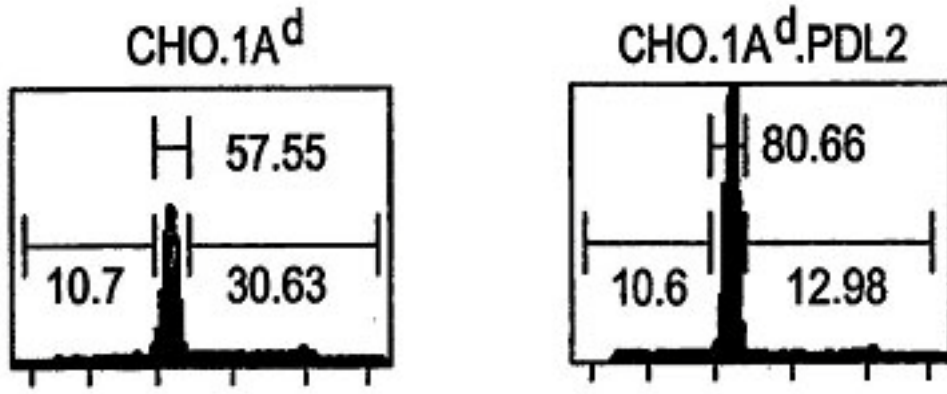




FIG. 12

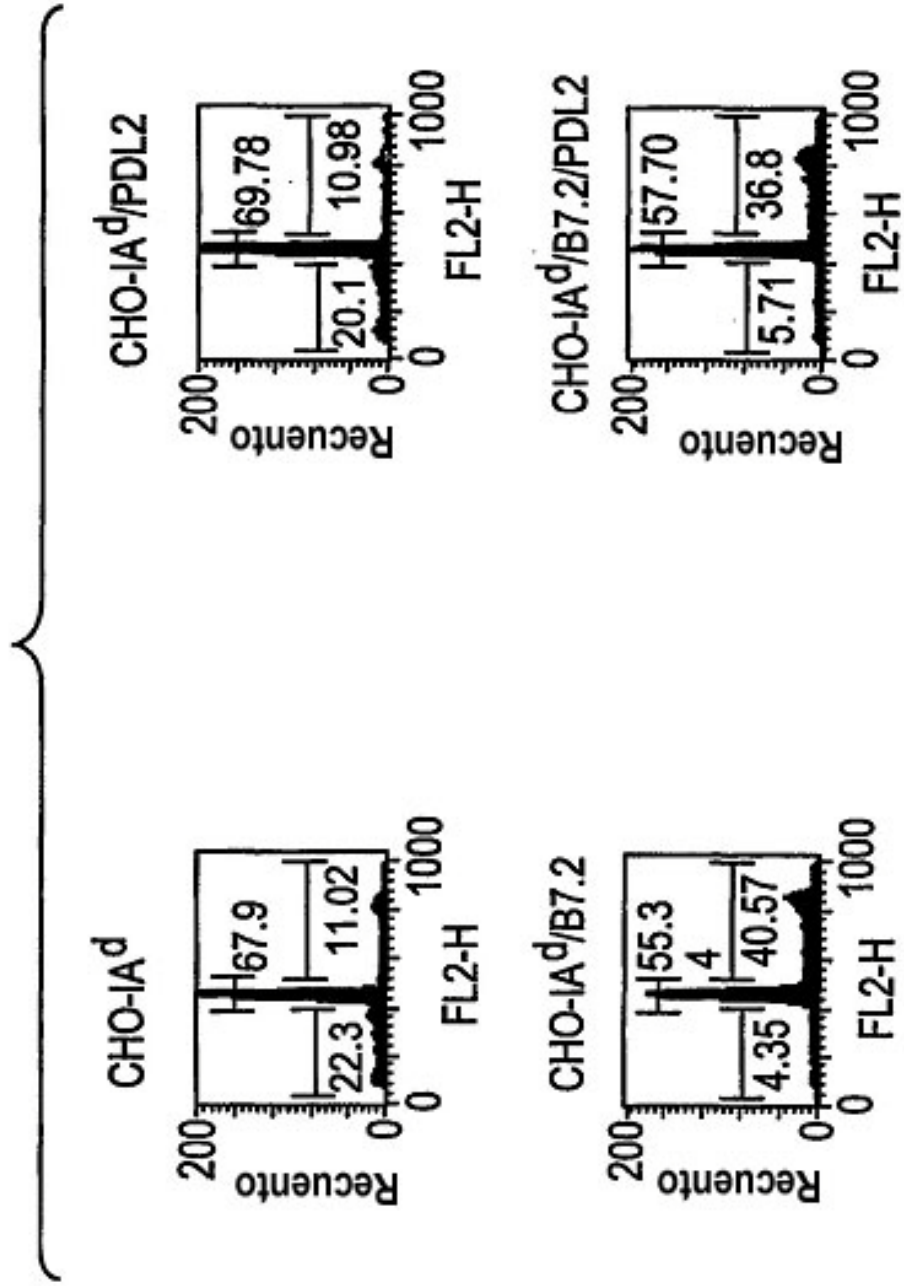


# FIG. 13



Fluorescencia lineal

FIG. 14



**FIG. 15**

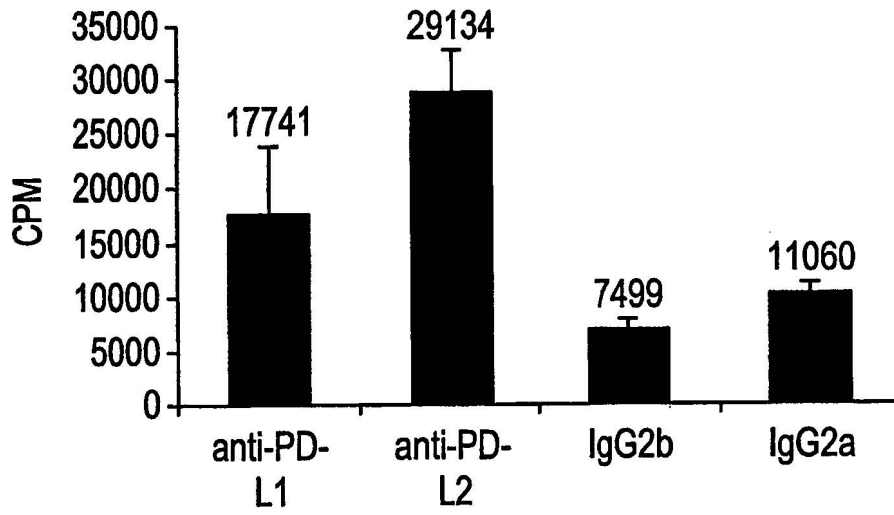


FIG. 16

