

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 060**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00	(2006.01)	A61K 33/04	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K 33/06	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	A61K 33/26	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)	C07K 16/18	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)	C07K 16/28	(2006.01)
A61K 31/07	(2006.01)	A61K 33/30	(2006.01)
A61K 31/122	(2006.01)		
A61K 31/355	(2006.01)		
A61K 31/375	(2006.01)		
A61K 33/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010 E 10835979 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2510948**

54 Título: **Inhibidor de la activación de linfocitos T, composición farmacéutica que lo contiene y método de cribado de sustancias inhibidoras de la activación de linfocitos T**

30 Prioridad:

09.12.2009 JP 2009279189

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

28.12.2015

73 Titular/es:

**MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION
(100.0%)
3-2-10, Dosho-machi, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-8505, JP**

72 Inventor/es:

**YAMASHITA, TOSHIHIDE y
KUBO, TAKEKAZU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 555 060 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

Inhibidor de la activación de linfocitos T, composición farmacéutica que lo contiene y método de cribado de sustancias inhibitoras de la activación de linfocitos T

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un inhibidor de la activación de linfocitos T, a una composición farmacéutica que lo comprende y a un método de cribado de sustancias inhibitoras de la activación de linfocitos T. Más particularmente, la presente invención se refiere a un inhibidor de la activación de linfocitos T que comprende como ingrediente activo una sustancia inhibitora de RGM, una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad causada por la activación de linfocitos T, que comprende el inhibidor de la activación de linfocitos T, y
10 una método para el cribado de sustancias inhibitoras de la activación de linfocitos T, que comprende una etapa de poner en contacto una sustancia de ensayo con RGM.

Técnica anterior

- La molécula de orientación repulsiva (abreviadamente en lo sucesivo RGM por la expresión inglesa *Repulsive Guidance Molecule*) es una proteína de membrana identificada inicialmente como una molécula inductora de axones en el sistema visual (véase el documento no patente 1). La familia de RGM incluye 3 clases de miembros denominados
15 RGMa, RGMb y RGMc, y se sabe que al menos RGMa y RGMb actúan a través del mismo mecanismo de transducción de señal (véase el documento que patente 2). Estudios posteriores han aclarado que RGM tiene una función de inducción de axones y formación de láminas en embriones de *Xenopus* y pollo, así como una función de regulación del cierre del tubo neural de la cabeza y similares en un embrión de ratón (véase el documento no patente 3). Además de las funciones en las etapas de desarrollo, la RGM es expresada de nuevo después de una lesión del sistema nervioso central en seres humanos y ratas adultos y la inhibición de la RGM potencia el crecimiento de axones después de una lesión espinal y promueve la recuperación funcional en ratas (véase el documento que no es de patente 4). Por lo tanto, la RGM se considera una sustancia que inhibe la regeneración de axones después de una lesión del sistema nervioso central. También, el documento de patente 1 describe un promotor de la regeneración de axones
20 que comprende como ingrediente activo un anticuerpo neutralizante anti-RGM.

- La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica en la que la mielina (vainas de mielina) que cubre las fibras nerviosas en el cerebro y la médula espinal está inflamada causando la desmielinización, lo que impide la buena transmisión de la información neuronal, provocando con ello diversos síntomas como trastorno visual, trastorno del movimiento, hipoestesia, desequilibrio y similares. Hasta el momento no se ha aclarado su etiología y la enfermedad no se puede ser curada completamente por la medicina actual. Si bien se reconoce como una de las enfermedades autoinmunitarias, no ha sido esclarecido el detalle de su mecanismo de iniciación. Por ejemplo, el documento que no es patente 5 describe que los linfocitos T CD4⁺ atacan inmunológicamente a la mielina y al oligodendrocito en la sustancia blanca del cerebro y de la médula espinal.

- El documento WO 2009/106356 A1 describe proteínas aisladas, en particular anticuerpos monoclonales, que se unen a la proteína RGMa y la neutralizan, inhibiendo así la actividad de RGMa.

- El documento WO 2009/030500 A1 indica que anticuerpos que son producidos en los dominios de unión a proteínas morfogénicas óseas de la RGM e inhiben la interacción entre la RGM y el receptor de RGM, neogenina, exhiben una acción promotora de la neuragénesis.

- El documento WO 00/56772 se refiere a anticuerpos humanos que se unen específicamente a la interleuquina-12 humana (hIL-12).

[Lista de documentos]

[Documento de patente]:

Documento de patente 1: JP-B-3981148

[Documentos no patentes]

- 45 Documento no patente 1: Stahl, B., Muller, B., von Boxberg, Y., Cox, E.C. & Bonhoeffer, F. *Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. Neuron* 5, 735-743 (1990)

Documento no patente 2: Liu, X., Hashimoto, M., Horii, H., Yamaguchi, A., Naito, K. and Yamashita, T. *Repulsive guidance molecule b inhibits neurite growth and is increased after spinal cord injury. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 795-800 (2009)

- 50 Documento no patente 3: Yamashita, T., Mueller, B. K. & Hata, K. *Neogenin and repulsive guidance molecule signaling in the central nervous system. Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 29-34 (2007)

Documento no patente 4: Hata, K. et al. *RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury*. *J. Cell Biol.* 173, 47-58 (2006)

Documento no patente 5: Trapp, B.D., Ransohoff, R.M., Fisher, E. & Rudick, R. *Neurodegeneration in multiple sclerosis: relationship to neurological disability*. *Neuroscientist* 5, 48-57 (1999)

5 Sumario de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

La presente invención pretende encontrar una nueva función de la RGM, y proporcionar un nuevo inhibidor de la activación de linfocitos T, una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad causada por la activación de linfocitos T, y un método de cribado de una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T.

10

Medios para resolver los problemas

La presente invención abarca cada una de las siguientes invenciones para resolver los problemas antes mencionados.

15

1. Una sustancia inhibidora de una molécula de orientación repulsiva a (RGMa) como ingrediente activo para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, tales como enfermedad autoinmunitaria celular, reumatismo, esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunitarias del sistema nervioso, tales como síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de neuro-Behçet, anemia maligna, diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), síndrome de Sjogren, dermatitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedades de Grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, glomerulonefritis, miastenia grave, enfermedades de Hashimoto.

20

2. La sustancia inhibidora de la RGMa para su uso como en 1, en donde la sustancia inhibidora de RGMa es un anticuerpo neutralizante anti-RGMa.

3. La sustancia inhibidora de la RGMa para su uso como en 1, en donde la sustancia inhibidora de la RGMa es siRNA de RGMa.

25

4. La sustancia inhibidora de la RGMa para su uso como en 1 a 3, en donde la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.

5. La sustancia inhibidora de la RGMa para uso como en 4, en donde la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple recurrente.

30

6. Un método *in vitro* para inhibir la activación de linfocitos T, que comprende una etapa de poner en contacto una sustancia inhibidora de la RGMa con una célula que expresa RGMa.

7. El método para inhibir la activación de linfocitos T de acuerdo con 6, en donde la sustancia inhibidora de la RGMa es un anticuerpo neutralizante anti-RGMa.

8. El método para inhibir la activación de linfocitos T de acuerdo con 6, en donde la sustancia inhibidora de la RGMa es un siRNA de RGMa.

35

9. Un método de cribado de una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T, que comprende una etapa de poner en contacto una sustancia de ensayo con RGMa, una etapa de medir el nivel de actividad de la RGMa antes mencionada, una etapa de comparar el nivel de actividad antes mencionada con el de RGMa libre de contacto con una sustancia de ensayo, y una etapa de seleccionar una sustancia de ensayo que reduce el nivel de actividad de RGMa.

40

Efecto de la invención

La presente invención puede proporcionar un nuevo inhibidor de la activación de linfocitos T. El inhibidor de la activación de linfocitos T es útil para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad causada por la activación de linfocitos T, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria. Además, una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T obtenible por el método de cribado de la presente invención sirve como ingrediente activo candidato de un fármaco profiláctico o terapéutico para una enfermedad causada por la activación de linfocitos T.

45

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados de la medición, por PCR cuantitativa en tiempo real, de la expresión de mRNA de RGMa en células dendríticas derivadas de la médula ósea (abreviadamente en lo sucesivo BMDC por la expresión inglesa *Bone Marrow-Derived Cells*) estimuladas con LPS,.

La Fig. 2 muestra los resultados de la detección de la expresión de RGMa en BMDC estimuladas con LPS, por transferencia de Western.

La Fig. 3 muestra los resultados del análisis por citometría de flujo de la unión de linfocitos T CD4⁺ o macrófagos CD11b⁺, y diversas concentraciones de RGMa-Fc humano.

5 La Fig. 4(A) muestra los resultados de la detección total de Rap1 y de la forma activa de Rap1 en linfocitos T CD4⁺ y macrófagos CD11b⁺ por transferencia de Western.

La Fig. 4(B) muestra los niveles relativos de activación de Rap1 calculados a partir de la cuantificación de las bandas en la transferencia de Western de la Fig. 4(A) usando el programa *Scion Image*.

10 La Fig. 5(A) muestra los resultados de la medición de relación de adhesión de esplenocitos a fibronectina en presencia o ausencia de estimulación con RGMa.

La Fig. 5(B) muestra los resultados de la medición de relación de adhesión de linfocitos T CD4⁺ a ICAM1 en presencia o ausencia de estimulación con RGMa.

15 La Fig. 6 muestra los resultados de la observación de los cambios con el tiempo en las puntuaciones cuantificadas de los síntomas clínicos de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en ratones modelo con esclerosis múltiple a los que se ha administrado un anticuerpo neutralizante anti-RGMa y en ratones modelo con esclerosis múltiple a los que se ha administrado un anticuerpo de control.

20 La Fig. 7(A) muestra la relación de expresión de los síntomas clínicos de la EAE en cada grupo, (B) muestra la media de los días de comienzo de la EAE en cada grupo, (C) muestra la media de la puntuación máxima de EAE de cada ratón en cada grupo y (D) muestra la media de la puntuación acumulativa de EAE de cada ratón en cada grupo.

Las Fig. 8 (a) y (b) muestran la histología teñida con HE de la médula espinal cervical de ratón modelo con esclerosis múltiples al que se le ha administrado anticuerpo de control, y (c) y (d) muestran la histología teñida con HE de la médula espinal cervical de ratón modelo con esclerosis múltiple al que se le ha administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMa.

25 La Fig. 9 muestra los resultados de los niveles de inflamación, cuantificados basándose en un índice inflamatorio, de una muestra de tejido de médula ósea de ratón modelo con esclerosis múltiple al que se le ha administrado anticuerpo de control y una muestra de tejido de médula ósea de ratón modelo con esclerosis múltiple al que se ha administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMa.

30 La Fig. 10 muestra los resultados del examinar la activación de linfocitos T específica de antígenos y la activación de linfocitos T no específica de antígenos, de esplenocitos preparados de ratón modelo con esclerosis múltiple al que se le ha administrado anticuerpo de control y de ratón modelo con esclerosis múltiple al que se le ha administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMa, en donde (a) muestra la proliferación celular, (b) muestra la cantidad de secreción de IL-2, (c) muestra la cantidad de secreción de IFN-γ y (d) muestra la cantidad de secreción de IL-17.

35 La Fig. 11 muestra los resultados de la observación de los cambios con el tiempo en las puntuaciones cuantificadas de los síntomas clínicos de la EAE en el ratón modelo con esclerosis múltiple recurrente al que se ha administrado un anticuerpo neutralizante anti-RGMa y en el ratón modelo con esclerosis múltiple al que se ha administrado un anticuerpo de control.

40 La Fig. 12 muestra los resultados de la observación de los cambios con el tiempo en las puntuaciones cuantificadas de los síntomas clínicos de la EAE en ratón receptor al que se han trasplantado BMDC con expresión reducida del gen de RGMa o BMDC sin expresión reducida del gen de RGMa, cada uno después de estimulación con la glicoproteína oligodendrocítica mielínica (abreviadamente en lo sucesivo MOG, por la expresión inglesa *Myelin/Oligodendrocyte Glycoprotein*).

45 La Fig. 13 muestra los resultados de observación de los cambios con el tiempo en las puntuaciones cuantificadas de los síntomas clínicos de la EAE en ratones receptores trasplantados con linfocitos T CD4⁺, que se prepararon a partir de un ratón donante al que se había administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMa o anticuerpo de control, y MOG, y sometido a estimulación con MOG.

Descripción de las realizaciones

50 Los autores de la presente invención han encontrado por primera vez que la RGM se expresa en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) y el receptor de la RGM se expresa en los linfocitos T CD4⁺ y los macrófagos CD11b⁺, y que la proteína Rap1 es activada cuando la RGM se une al receptor de la RGMa en los linfocitos T CD4⁺ y los macrófagos CD11b⁺, potenciando así la actividad de adhesión celular del linfocitos T CD4⁺ o el macrófago CD11b⁺. Los autores de la presente invención han aclarado en un experimento que utiliza un ratón modelo con esclerosis múltiple que la administración de un anticuerpo neutralizante anti-RGM reduce tanto los síntomas clínicos como las lesiones de tejidos del ratón modelo con esclerosis múltiple (ratón con encefalomiелitis autoinmunitaria ex-

perimental (EAE)) inducidas por la glicoproteína oligodendrocítica miélnica (MOG), y los esplenocitos recogidos de un ratón modelo con esclerosis múltiple al que se ha administrado un anticuerpo neutralizante anti-RGM muestran activación de linfocitos T específica y no específica de antígenos notablemente atenuada. Además, los autores de la presente invención han encontrado que la administración de un anticuerpo neutralizante anti-RGM suprime la expresión de los síntomas clínicos de EAE en un ratón modelo con esclerosis múltiple recurrente inducida por una proteína proteolipídica (PLP) miélnica; cuando las BMDC con expresión reducida del gen RGMa se estimulan con MOG y se trasplantan a un ratón, se suprime la expresión de los síntomas clínicos de EAE en el ratón receptor; y cuando linfocitos T CD4⁺ preparado a partir de un ratón al que se ha administrado un anticuerpo neutralizante anti-RGM y MOG se estimulan con MOG y se trasplantan a un ratón, se suprime la expresión de los síntomas clínicos de EAE en el ratón receptor (véanse los Ejemplos).

[Inhibidor de la activación de linfocitos T]

La presente invención proporciona un inhibidor de la activación de linfocitos T que contiene como ingrediente activo una sustancia inhibidora de la RGM. La sustancia inhibidora de la RGM, que es un ingrediente activo del inhibidor de la activación de linfocitos T de la presente invención, puede ser cualquier sustancia que inhiba la actividad de la RGM (actividad de RGM) y una sustancia que inhiba la expresión de RGM.

Ejemplos de sustancias que inhiben la actividad de RGM incluyen un compuesto de bajo peso molecular, un anticuerpo neutralizante anti-RGM y similares, que inhiben la actividad de RGM. Ejemplos del índice de actividad de RGM incluyen una actividad de RGM para unirse al receptor de RGM (véase el Ejemplo 1 (1-2)), activación de la proteína Rap1 que induce la actividad (véase el Ejemplo 1 (1-3)), mejora de la actividad en la adhesión de los linfocitos T a ICAM (véase el Ejemplo 1 (1-4)) y similares. Una sustancia que inhibe (atenúa) la actividad de RGM cuando se evaluó usando estos índices se refiere a una sustancia inhibidora de RGM. Ejemplos del compuesto de bajo peso molecular que inhibe la actividad RGM incluyen Y27632 conocido como un inhibidor de la Rho-quinasa (M. Uehata, et al., *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. Nature* 389, 990 (1997)).

El anticuerpo neutralizante anti-RGM puede ser cualquiera siempre que sea un anticuerpo que se une a la RGM e inhiba su actividad, y sus ejemplos incluyen un anticuerpo anti-RGM que se une a RGM y evita que RGM se una al receptor de RGM y similares. Un anticuerpo neutralizante anti-RGM se puede producir por un método conocido y usar la RGM o su fragmento como inmunógeno. Que el anticuerpo obtenido es un anticuerpo neutralizante se puede confirmar utilizando el índice de actividad de la RGM antes mencionado. Ejemplos de RGM incluyen, aunque sin limitación, RGMa humana que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, RGMa de rata que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y similares. La RGM procedente de diversos organismos se puede utilizar preferiblemente como inmunógeno. Sus secuencias de aminoácidos se pueden obtener fácilmente a partir de una base de datos conocida (Protein Data Bank, etc.).

El anticuerpo neutralizante anti-RGM puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. También puede ser una molécula de anticuerpo completa o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv, etc.). Un anticuerpo policlonal se puede preparar y adquirir, por ejemplo, como sigue. Para ser precisos, un antígeno (RGM o uno de sus fragmentos) se disuelve en PBS, y se inmuniza un mamífero (ratón, rata, conejo, cabra, caballo, etc.) con la solución opcionalmente mezclada con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional (por ejemplo, adyuvante completo de Freund) como inmunógeno. Aunque el método de inmunización no está particularmente limitado es preferible, por ejemplo, un método que incluya la inyección subcutánea o inyección intraperitoneal una vez o varias veces a intervalos adecuados. Luego, se recoge sangre del animal inmunizado por un método convencional, se separa el suero y se purifica una fracción de anticuerpo policlonal para obtener el anticuerpo policlonal. Se puede obtener un anticuerpo monoclonal fusionando un inmunocito (por ejemplo, un esplenocito) obtenido del mamífero inmunizado antes mencionado y una célula de mieloma para obtener un hibridoma, y recuperar el anticuerpo de un cultivo del hibridoma. Un anticuerpo monoclonal recombinante se puede producir también por clonación de un gen de anticuerpo de un hibridoma, incorporando el gen en un vector adecuado, introduciendo el vector en una célula hospedante y usando una técnica de recombinación génica. Por otra parte, también puede ser producido por un método de presentación en fagos.

El anticuerpo neutralizante anti-RGM es preferiblemente un anticuerpo quimérico humano o un anticuerpo humanizado. El anticuerpo quimérico humano se refiere a un anticuerpo que consiste en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo procedente de un animal distinto de un ser humano, y una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo obtenido por injerto de las CDR (regiones determinantes de la complementariedad) de un anticuerpo procedente de un animal distinto de un ser humano en las CDR de un anticuerpo humano, y también se denomina anticuerpo injertado de CDR, anticuerpo de reconstitución y similares. Como una región de marco (abreviadamente en lo sucesivo FR por la expresión inglesa *Frame Region*) de un anticuerpo humanizado, se selecciona una región en la que la CDR forma un buen sitio de unión al antígeno. Cuando sea necesario, la secuencia de aminoácidos de la FR en la región variable de un anticuerpo puede ser sustituida de manera que la CDR del anticuerpo humanizado pueda formar un sitio de unión al antígeno apropiado. La secuencia de aminoácidos de la región constante de un anticuerpo humano se puede adquirir en una base de datos conocida (Protein Data Bank, etc.).

Ejemplos de la sustancia que inhibe la expresión de RGM incluyen siRNA (ARN corto de interferencia), shRNA (ARN de horquilla corta), oligonucleótido antisentido y similares al gen de RGM. Ejemplos del gen de RGM incluyen, aunque sin limitación, un gen de RGMa humana que consiste en la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 1, un gen de RGMa de rata que consiste en la secuencia de bases mostrada en la SEQ ID NO: 3 y similares. Las secuencias de bases de los genes de RGM procedentes de diversos organismos se pueden adquirir fácilmente en una base de datos conocida (GenBank, etc.). El siRNA es un RNA bicatenario corto que puede suprimir la expresión de un gen diana (gen de RGM en la presente invención). Siempre que sea funcional como siRNA, la secuencia de bases y la longitud (longitud de bases) no están particularmente limitadas. Es preferible menos de aproximadamente 30 bases, más preferiblemente alrededor de 19 - 27 bases, más preferiblemente alrededor de 21 - 25 bases. El shRNA se refiere a una molécula que tiene una estructura de horquilla corta con un saliente en el extremo 3' y que tiene aproximadamente 20 pares de bases o más, que es un ARN monocatenario que contiene parcialmente una secuencia de bases palindrómica para formar una estructura intramolecularmente bicatenaria. Después de introducido en la célula dicho shRNA es degradado en dicha célula en una longitud de aproximadamente 20 bases (típicamente, por ejemplo, 21 bases, 22 bases, 23 bases) y puede suprimir la expresión del gen diana (gen de RGM en la presente invención) igual que siRNA. Los siRNA y shRNA pueden tener cualquier forma, siempre que puedan suprimir la expresión del gen de RGM. Los siRNA y shRNA se pueden sintetizar químicamente de modo artificial. Además, los RNA con sentido y antisentido se pueden sintetizar *in vitro* a partir de DNA molde usando, por ejemplo, RNA-polimerasa de T7 y promotor de T7. El oligonucleótido antisentido sólo necesita ser un nucleótido que sea complementario o se hibride a secuencias continuas de 5 a 100 bases en la secuencia de DNA del gen de RGM, y puede ser cualquiera de DNA y RNA. También, se puede modificar siempre que no imponga ningún efecto adverso en la función. El oligonucleótido antisentido puede ser sintetizado por un método convencional y, por ejemplo, puede ser sintetizado fácilmente por un sintetizador de DNA comercialmente disponible.

Por lo tanto, una sustancia inhibidora de RGM puede inhibir la activación de linfocitos T poniéndola en contacto con una célula que expresa RGM (célula que expresa RGM o célula que tiene actividad de expresión de RGM). Por lo tanto, la presente invención abarca un método para inhibir la activación de linfocitos T, que comprende una etapa de poner en contacto una sustancia inhibidora de RGM con una célula que expresa RGM.

[Composición farmacéutica]

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad causada por la activación de linfocitos T, que contiene el inhibidor de la activación de linfocitos T antes mencionado de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención es, en otras palabras, una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad causada por la activación de linfocitos T, que contiene como ingrediente activo una sustancia inhibidora de la RGM.

Como enfermedad causada por la activación de linfocitos T, se pueden mencionar enfermedades autoinmunitarias, trastornos cerebrovasculares y similares. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen enfermedad autoinmunitaria celular, reumatismo, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso (síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de neuro-Behçet, etc.), anemia maligna, diabetes tipo I (insulino-dependiente), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), síndrome de Sjogren, dermatitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, glomerulonefritis, miastenia grave, enfermedad de Hashimoto y similares. Como trastorno cerebrovascular se pueden mencionar infarto cerebral, hemorragia cerebral, hemorragia subaracnoidea y similares. En particular, la composición farmacéutica de la presente invención se usa preferiblemente para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, particularmente se usa preferiblemente para la profilaxis o el tratamiento de la esclerosis múltiple.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular mezclando una sustancia inhibidora de la RGM como ingrediente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable o un aditivo según sea apropiado. Específicamente, se puede formular en preparaciones orales, tales como comprimido, comprimido recubierto, píldora, polvo, gránulo, cápsula, líquido, suspensión, emulsión y similares; o preparaciones parenterales, tales como inyección, infusión, supositorio, pomada, parche y similares. Las relaciones de mezcla entre el vehículo y el aditivo se pueden ajustar apropiadamente basándose en los intervalos adoptados generalmente en el campo de los productos farmacéuticos. Aunque el vehículo y el aditivo que se puede mezclar no están particularmente limitados, por ejemplo, se pueden mencionar diversos vehículos, tales como agua, solución salina y otros disolventes acuosos, base acuosa u oleosa y similares; y diversos aditivos, tales como excipiente, aglutinante, agente de ajuste del pH, disgregante, promotor de la absorción, lubricante, colorante, modificador, aromatizante y similares.

Cuando la sustancia inhibidora de la RGM es un anticuerpo neutralizante anti-RGM, se administra preferiblemente como una inyección o infusión formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable por vía de administración parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea o tópica. Una inyección o infusión que contiene un anticuerpo neutralizantes anti-RGM se pueden utilizar como solución, suspensión o emulsión. Como disolvente por lo tanto se puede utilizar, por ejemplo, agua destilada para inyección, solución salina, solución de glucosa y solución isotónica (por ejemplo, soluciones de cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerol, manitol, sorbitol, ácido bórico, bórax, propilenglicol y similares) y similares. Dichas inyección e infusión pueden contener agente estabilizante, agente solubilizante, agente de puesta en suspensión, emulsionante, relajante,

tampón, conservante, antiséptico, agente de ajuste del pH y similares. Como agente estabilizante, se pueden usar albúmina, globulina, gelatina, manitol, glucosa, dextrano, etilenglicol, propilenglicol, ácido ascórbico, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, EDTA sódico, citrato de sodio, dibutilhidroxitolueno y similares. Como agente solubilizante, se puede usar alcohol (por ejemplo, etanol, etc.), polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, etc.), tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80 (marca registrada), HCO-50, etc.) y similares. Como agente de puesta en suspensión, se pueden usar monoestearato de glicerol, monoestearato de aluminio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, laurilsulfato de sodio y similares. Como agente emulsionante, se pueden usar goma arábiga, alginato de sodio, goma de tragacanto y similares. Como agente relajante, se pueden usar alcohol bencílico, clorobutanol, sorbitol y similares. Como agente tampón, se pueden usar tampón de fosfato, tampón de acetato, tampón de borato, tampón de carbonato, tampón de citrato, tampón Tris y similares. Como agente conservante, se pueden usar p-hidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, p-hidroxibenzoato de propilo, p-hidroxibenzoato de butilo, clorobutanol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, deshidroacetato de sodio, edetato de sodio, ácido bórico, bórax y similares. Como agente antiséptico, se pueden usar cloruro de benzalconio, ácido p-oxibenzoico, clorobutanol y similares. Como agente de ajuste del pH, se pueden usar ácido clorhídrico, hidróxido sódico, ácido fosfórico, ácido acético y similares.

Cuando la sustancia inhibidora de la RGM es un ácido nucleico (siRNA, shRNA, oligonucleótido antisentido y similares), se puede administrar en forma de un vector no viral o un vector viral. Cuando tiene una forma de vector no viral, se puede utilizar un método que usa un liposoma para introducir una molécula de ácido nucleico (método de liposomas, método de HVJ-liposomas, método de liposomas catiónico, método de lipofección, método de lipofectamina y similares), un método de microinyección, un método de transferir una molécula de ácido nucleico a una célula junto con un vehículo (partículas de metal) por una pistola génica y similares. Cuando siRNA o shRNA se administra al cuerpo utilizando un vector viral, se puede usar un vector viral tal como adenovirus recombinante, retrovirus y similares. Un gen puede ser introducido en una célula o tejido por introducción de un siRNA o shRNA que expresa DNA en un virus de DNA o virus de RNA, tales como retrovirus destoxificado, adenovirus, virus adeno-asociado, virus herpes, virus de la viruela vacuna, poxvirus, virus de la poliomielitis, virus Sindbis, virus hemaglutinante de Japón, SV40 y similares, para permitir la infección de la célula o tejido con el virus recombinante.

Administrando una cantidad eficaz de la preparación así obtenida a, por ejemplo, seres humanos y otros mamíferos (por ejemplo, rata, ratón, conejo, oveja, cerdos, ganado bovino, gato, perro, mono y similares), se puede prevenir o tratar una enfermedad causada por activación de linfocitos T. La dosis se determina apropiadamente teniendo en cuenta el objeto, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso, el sexo y el historial médico del paciente, la clase de ingredientes activos y similares. Por ejemplo, cuando el ingrediente activo es un anticuerpo neutralizante anti-RGM, se prefiere alrededor de 0,02 mg - 4000 mg al día y es más preferible aproximadamente 0,1 mg - 200 mg al día, para un ser humano normal, con un peso de aproximadamente 65 - 70 kg como diana. La dosis diaria total puede ser una dosis única o dosis divididas.

[Método de cribado]

El método de cribado de la presente invención puede ser cualquiera siempre que comprenda una etapa de puesta en contacto de una sustancia de ensayo con la RGM, una etapa de medición del nivel de actividad de la RGM en contacto con la sustancia de ensayo, una etapa de comparación del nivel de actividad medida con el de la RGM en contacto con la sustancia de ensayo y una etapa de selección de una sustancia de ensayo que reduce el nivel de actividad de la RGM. Una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T se puede cribar conveniente y eficazmente por el método de cribado de la presente invención.

Una sustancia de ensayo se puede poner en contacto con la RGM, por ejemplo, añadiendo la sustancia de ensayo a una solución de RGM para permitir su disolución o puesta en suspensión. Como RGM, se puede usar una RGM recombinante comercialmente disponible o una RGM recombinante propia preparada de acuerdo con un método convencional. El tiempo de contacto y la temperatura de contacto no están particularmente limitados y se pueden determinar apropiadamente. Además, se ajusta preferiblemente un grupo de control sin contacto con la sustancia de ensayo. El nivel de actividad de la RGM se puede medir como un índice basándose la actividad de unión de la RGM al receptor de RGM (véase el Ejemplo 1 (1-2)), la actividad inductora de la activación de Rap1 (véase el Ejemplo 1 (1-3)), la mejor actividad en la adhesión de linfocitos T a ICAM (véase el Ejemplo 1 (1-4)) y similares.

Por comparación del nivel de actividad medida con el de RGM que no ha estado en contacto con la sustancia de ensayo, se puede juzgar si la sustancia de ensayo es una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T. Cuando el nivel de actividad de la RGM en contacto con una sustancia de ensayo es menor que el de la RGM que no ha estado en contacto con la sustancia de ensayo, se interpreta que la sustancia de ensayo es una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T y se selecciona. Preferiblemente, cuando el nivel de actividad de la RGM en contacto con una sustancia de ensayo no es mayor del 50%, más preferiblemente no mayor del 25%, se interpreta que la sustancia de ensayo es una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T. Una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T obtenible por el método de cribado de la presente invención es útil como sustancia candidata de un ingrediente activo de un fármaco profiláctico o terapéutico para una enfermedad causada por la activación de linfocitos T, tal como una enfermedad autoinmunitaria y similar. En particular, es extremadamente útil como sustancia candidata de un ingrediente activo de un fármaco profiláctico o terapéutico para la esclerosis múltiple.

Ejemplos

La presente invención se explica en detalle a continuación con referencia a los ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

[Ejemplo 1: Expresión de la RGMa y el receptor de la RGMa en un inmunocito]

5 (1-1) Expresión de la RGMa en las células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC)

De acuerdo con el método de Lutz et al., (Lutz, M. B., et al. *J. Immunol. Methods* 223, 77-92 (1999)), se recogieron células de médula ósea de ratones C57BL/6 (de 8 a 10 semanas de edad) y se cultivaron en un medio que contenía GM-CSF (20 ng/mL, Sigma-Aldrich) para obtener BMDC. Para el experimento, se utilizaron las BMDC el día 6 desde el comienzo del cultivo.

10 La expresión de mRNA de RGMa en las BMDC se midió por PCR cuantitativa en tiempo real. Concretamente, se añadió LPS (Sigma-Aldrich) a las BMDC en 0, 0,01, 0,1 o 1 µg/mL en el día seis desde el comienzo del cultivo, las BMDC se cultivaron durante 24 horas y se recogieron las BMDC activadas. Se extrajo el RNA total de las BMDC usando el kit RNeasy (QUIAGEN) y se obtuvo cDNA usando una transcriptasa inversa (GE Healthcare). Utilizando como molde el cDNA obtenido, se realizó una PCR TaqMan en tiempo real (ABI Prism 7500 Sequence Detection System) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se analizó cuantitativamente la expresión del mRNA de la RGMa. Los cebadores y las sondas específicos fueron adquiridos a Applied Biosystems.

15 Además, la expresión de la RGMa en las BMDC se detectó por transferencia de Western. Concretamente, las BMDC (2×10^6 células) a las 24 horas desde la adición de LPS se disolvieron en 2 x tampón de muestra (Tris-HCl 250 mM, 4% de SDS, 20% de glicerol, 0,02% azul de bromofenol y 10% de β-mercaptoetanol), se llevó a ebullición durante 5 minutos, y una cantidad igual de cada muestra se sometió a SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras. Después de la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). Después de bloquear con PBS que contenía 5% de leche desnatada y 0,05% de Tween 20, la proteína se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-RGMa (anticuerpo producido por los autores de la presente invención, véase el documento no patente 3), y se detectó usando un sistema de luminiscencia química ECL (GE Healthcare) y un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP) (Cell Signaling Technology). La banda proteínica se cuantificó utilizando el programa Scion Image.

20 Los resultados de la PCR en tiempo real se muestran en la Fig. 1 y los resultados de la transferencia de Western se muestran en la Fig. 2. Como se deduce de la Fig. 1, la expresión del mRNA de RGMa en las BMDC fue potenciada por la estimulación con LPS. Además, como se deduce de la Fig. 2, existían bandas de 35 kDa y 50 kDa que muestran la unión del anticuerpo anti-RGMa, y una cantidad en la célula aumentada por estimulación con LPS. La banda de 50 kDa corresponde a la longitud completa de RGMa y la banda de 35 kDa es un fragmento del extremo C de la RGMa y se supone que es una forma madura de la RGMa (Mueller, B.K., Yamashita, T., Schaffar, G. & Mueller, R. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 1513-1529 (2006)). Estos resultados han aclarado que la expresión de la RGMa es inducida en las BMDC activadas.

35 (1-2) Expresión del receptor de RGMa en linfocitos T CD4⁺ y macrófagos CD11b⁺

Se aisló el bazo de un ratón C57BL/6 (de 8 a 10 semanas de edad), se colocó rápidamente en un medio RPMI1640 (Invitrogen), se prensó suavemente y se realizó un tratamiento para eliminar los eritrocitos con un tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville) obteniéndose una suspensión celular. Después de lavar tres veces con RPMI1640, la suspensión celular se filtró por un filtro de células de 70 µm obteniéndose una suspensión celular de un solo esplenocito. A esta suspensión se añadieron diversas concentraciones de un fragmento del extremo C de la RGMa humana (en lo sucesivo denominado "RGMa-Fc") y la suspensión se incubó durante 30 minutos. Después de lavado, se realizó una inmunotinción utilizando el anticuerpo anti-CD11b marcado con PE o el anticuerpo anti-CD4 marcado con APC, y el anticuerpo RGMa-Fc anti-humano marcado con FITC (BD Biosciences) en combinación, y la unión de las células y el RGMa-Fc humano se midió por análisis de citometría de flujo. Para el análisis por citometría de flujo, se utilizaron FACSCalibur (BD Biosciences) y el programa informático CellQuest (BD Biosciences).

Los resultados se muestran en la Fig. 3. Como se deduce de la Fig. 3, tanto los linfocitos T CD4⁺ derivados del bazo como los macrófagos CD11b⁺ se unieron a RGMa-Fc humano de manera dependiente de la concentración. El resultado ha aclarado que estas células expresan un receptor de RGMa.

(1-3) Estudio de la activación de Rap1 en linfocitos T CD4⁺ y macrófagos CD11b⁺

50 Se investigó la transducción de señales mediada posiblemente por RGMa unida a linfocitos T CD4⁺ y a macrófagos CD11b⁺. Se sabe que, en los linfocitos T, el ligamiento al TCR induce la activación temporal de Rap1 y la acumulación de Rap1-GTP en una superficie de contacto de los linfocitos T con la célula presentadora de antígenos, que regula la señal mediada por LFA-1 (integrina): ICAM-1 (ligando de integrina) (Katagiri, K. et al., *Mol. Cell Biol.* 20, 1956-69 (2000), Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N. & Kinashi, T. *Mol. Cell Biol.* 22, 1001-1015 (2002)). Por tanto, se evaluó la implicación de la RGMa en la activación de Rap1 en linfocitos T CD4⁺ y macrófagos CD11b⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ y los macrófagos CD11b⁺ se aislaron por clasificación positiva, utilizando respectivamente perlas magnéticas con anti-CD4 y perlas magnéticas con anti-CD11b (Miltenyi Biotec) de la suspensión celular de un solo esplenocito preparada en el ejemplo (1-2) antes mencionado y se midió la forma activa de Rap1. Para la medición de la forma activa de Rap1, se utilizó un kit de ensayo de activación de Rap1 (Upstate Biotech) y se utilizaron como control esplenocitos antes del aislamiento de los linfocitos T CD4⁺ y los macrófagos CD11b⁺. Para ser específicos, se añadió a cada suspensión celular 2 µg/mL de RGMa de ratón recombinante (R&D Systems), la mezcla se trató durante 5 minutos y se lisaron en tampón de lisis de Mg²⁺ (que contenía HEPES 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 1% de Igepal CA-630, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, 2% de glicerol, ortovanadato de sodio 2 mM, fluoruro de etilsulfonilo 1 mM y cócteles de inhibidores de la proteasa (Roche Diagnostics)). El lisado celular se utilizó para la medición de la Rap1 total. Agarosa unida a RaGDS y el lisado celular se hicieron reaccionar a 4°C durante 30 minutos para precipitar la forma activa de Rap1 unida a un dominio de unión a Ra1. Las perlas se lavaron con tampón de lisis de Mg²⁺, se volvieron a poner en suspensión en 2 x tampón de muestra y se sometieron a transferencia de Western. Para la transferencia de Western, se utilizó anticuerpo anti-Rap1 unido al kit y se siguieron procedimientos similares a los del ejemplo (1-1) antes mencionado. La banda se cuantificó utilizando el programa Scion Image y se calculó el nivel relativo de activación de Rap1.

En la Fig. 4 (A) se muestran los resultados de la transferencia de Western y en la Fig. 4 (B) se muestra un gráfico que muestra la actividad relativa de Rap1. En la Fig. 4 (B) se muestra el gráfico de los valores medios de la actividad relativa y el error típico de 3 o 4 experimentos independientes, y "" significa p <0,05 en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 4 (A), la forma activa de Rap1 (Rap1 desplegada en la figura) aumentó en todas las células por el tratamiento con la RGMa de ratón. Como se muestra en la Fig. 4 (B), se ha aclarado que la estimulación por RGMa durante 5 minutos activa significativamente Rap1 en esplenocitos, linfocitos T CD4⁺ y macrófagos CD11b⁺. Estos resultados sugieren la posibilidad de que RGMa se exprese en células dendríticas activando la Rap1 intracelular vía el receptor de RGMa en la superficie de linfocitos T CD4⁺ y macrófagos CD11b⁺.

(1-4) Ensayo de unión a linfocitos

La adhesión mediada por integrina desempeña un papel central en el tráfico y la activación de los linfocitos T. Además, la adhesión inducida por TCR requiere la activación de Rap1 (Katagiri, K. et al. *Mol. Cell Biol.* 20, 1956-69 (2000), Reedquist, K.A. et al. *J. Cell Biol.* 148, 1151-1158 (2000), Suga, K. et al. *FEBS Lett.* 489, 249-253 (2001)). Para confirmar si Rap1 en forma activa o no activa inducida por RGMa está implicada en la actividad de adhesión, se realizó un ensayo de unión a linfocitos.

La adhesión celular se evaluó de acuerdo con el método descrito en las referencias de la técnica anterior (Sebzda, E., Bracke, M., Tugal, T., Hogg, N. & Cantrell, D.A. *Nat. Immunol.* 3, 251-258 (2002), Duchniewicz, M. et al. *Mol. Cell Biol.* 26, 643-653 (2006)). Concretamente, se añadieron 2 µg/mL de ICAM-1/Fc recombinante de ratón (R&D Systems) o 4 µg/mL de fibronectina (Sigma-Aldrich) a una placa plana de 96 pocillos (NUNC, MaxiSorp) y se dejaron en reposo a 4°C durante una noche para pre-revestimiento. La placa se lavó con PBS y se bloqueó con RPMI1640 (Invitrogen) que contenía 2% de BSA a 37°C durante 1 hora para evitar la unión no específica. La placa revestida con ICAM-1/Fc se utilizó para la evaluación de linfocitos T CD4⁺, y la placa revestida con fibronectina se utilizó para la evaluación de los esplenocitos.

Se marcaron esplenocitos o linfocitos T CD4⁺ recién preparados con 2,5 µM de BCECF-AM éster acetoximetílico de (2'7'-bis-(2-carboxietil)-5- (y -6)-carboxifluoresceína, Calbiochem) a 37°C durante 30 minutos y después se lavaron con RPMI1640 que contenía 0,5% de BSA. A la placa pre-revestida se añadieron 5 x 10⁵ células, y se incubaron en RPMI1640 que contenía 0,5% de BSA que a su vez contenía o no contenía 2 µg/mL de RGMa recombinante a 37°C durante 1 hora. Las células que no se adhirieron se retiraron lavando tres veces con RPMI1640 caliente que contenía 0,5% de BSA. La adhesión se cuantificó usando Spectra MAX (Molecular Devices) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 538 nm. La relación de adhesión se muestra en porcentaje del número total de células sembradas en un pocillo.

Los resultados para los esplenocitos se muestran en la Fig. 5 (A) y los resultados para los linfocitos T CD4⁺ se muestran en la Fig. 5 (B). El gráfico de la relación de adhesión muestra el valor medio y el error típico de tres experimentos independientes, y "" y "" muestran p <0,05 y p <0,01, respectivamente, en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 5 (A), los esplenocitos estimulados con RGMa muestran significativamente mayor relación de adhesión a la fibronectina en comparación con los esplenocitos libres de estimulación por RGMa. Similarmente, como se deduce de la Fig. 5 (B), los linfocitos T CD4⁺ estimulados con RGMa muestran significativamente mayor relación de adhesión a ICAM-1 en comparación con los linfocitos T CD4⁺ libres de estimulación por RGMa. Estos resultados han aclarado que la activación de Rap1 por RGMa aumenta la actividad de adhesión de esplenocitos y linfocitos T CD4⁺.

[Ejemplo 2: Estudio del efecto del anticuerpo neutralizante anti-RGMa en ratón modelo con esclerosis múltiple]

(2-1) Producción del ratón modelo con esclerosis múltiple

Como modelo animal ampliamente aceptado como modelo experimental de características clínicas y patológicas de esclerosis múltiple, se usó un ratón con encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (en lo sucesivo denominada

"EAE") inducida con glicoproteína oligodendrocítica miélnica (en lo sucesivo denominada "MOG"). Específicamente, la EAE fue inducida por administración por vía subcutánea de una emulsión (200 µL) de 100 µL de PBS que contenía el péptido (MOG)₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 5), Greiner Bio-one, 100 µg) y 100 µL de adyuvante completo de Freund que contenía bacilos de la tuberculosis muertos (H37Ra, Difco, 500 µg) en un costado de ratón C57BL/6 (de 8 a 10 semana de edad). Además, se administraron por vía intravenosa 200 ng de toxina de la toserina (List Biological Laboratories) después de la administración de MOG y 48 horas después.

5

(2-2) Observación de los síntomas clínicos causados por la administración del anticuerpo neutralizante anti-RGMA a un ratón modelo con esclerosis múltiple

Los días 7 y 10 después de la administración de MOG, se administró por vía intraperitoneal un anticuerpo neutralizante anti-RGMA producido por los autores de la presente invención (véase el documento no patente 3) o un anticuerpo de control (IgG de conejo, Sigma-Aldrich) (400 µg de cada uno). El grupo al que se había administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMA consistía en 9 ratones con EAE, y el grupo al que se había administrado el anticuerpo de control consistía en 11 ratones con EAE. Los grupos se observaron desde la administración de MOG (día 0) hasta el día 21, y se evaluaron los síntomas clínicos de EAE basándose en los siguientes criterios.

10

15

0 : sin anomalía

0,5 : pérdida de tensión de la cola

1 : pérdida de reflejo de la cola

2 : pérdida de reflejo de la cola, disminución del reflejo de enderezamiento, percepción anómala de una pata

3 : percepción anómala y parálisis de una pata

20

3.5 : parálisis de las dos patas traseras

4 : parálisis de las patas delanteras y las patas traseras

5 : agonizante, muerto

Después de terminada la observación, se sacrificaron los ratones, se les aisló la médula espinal, se fijó con paraformaldehído y se prepararon rodajas incrustadas en parafina que se sometieron a una evaluación histológica. Los trozos se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y se evaluó la inflamación. Desde la médula espinal cervical hasta la médula espinal torácica, se observaron 20-30 rebanadas por ratón, y se evaluó histológicamente en un ensayo ciego la inflamación semicuantitativa (índice de inflamación) basándose en los siguientes criterios. Se evaluaron cinco ratones del grupo al que se había administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMA y 6 ratones del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control.

25

30

0 : sin inflamación

1 : infiltración celular solamente alrededor de los vasos sanguíneos y meninges

2 : leve infiltración celular del parénquima de la médula ósea

3 : moderada infiltración celular del parénquima de la médula ósea

4 : acusada infiltración celular del parénquima de la médula ósea

35

En la Fig. 6 se muestran los cambios en la puntuación de la EAE durante el periodo de observación. Las puntuaciones de la EAE se muestran como valores medios y los errores típicos. Como se deduce de la Fig. 6, las puntuaciones de la EAE del grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizantes anti-RGMA eran notablemente bajas en comparación con las del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control desde el día 14. Aunque no se muestra en la Figura, los resultados de la prueba t de Student revelan unas diferencias estadísticamente significativas de $p < 0,05$ el día 14 y $p < 0,01$ desde el día 15 entre ambos grupos.

40

En la Fig. 7 (A) se muestra la relación de las expresiones de los síntomas clínicos de EAE de cada grupo, en la Fig. 7 (B) se muestra la fecha media de comienzo de la EAE de cada grupo, y en la Fig. 7 (C) se muestra el valor máximo medio de la puntuación de cada ratón en cada grupo y en la Fig. 7 (D) se muestra la puntuación acumulativa media de cada ratón en cada grupo. En las figuras, "n. s." significa que no hay diferencia significativa en la prueba t de Student y "*" y "***" significa $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 7 (A), mientras todos los casos (100%) del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control expresaron el síntoma clínico de la EAE, el 44% los ratones del grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA no expresó ningún síntoma clínico de la EAE. Como se deduce de la Fig. 7 (B), las fechas de comienzo de ambos grupos no fueron diferentes, lo que demuestra que la administración de anticuerpo neutralizante anti-RGMA no retrasa el comienzo de la EAE. Por otro lado, como se deduce de las Figs. 7(C) y (D), tanto la puntuación máxima media como la puntuación acumulativa media fueron significativamente inferiores en el grupo al que se había

45

50

administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA a las del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control. Estos resultados muestran que la administración de anticuerpo neutralizante anti-RGMA es eficaz para la supresión de la expresión de los síntomas de la EAE y la supresión de su progreso.

5 Las muestras histológicas teñidas con HE de la médula espinal cervical se muestran en la Fig. 8, en la que (a) y (b) son muestras histológicas teñidas con HE del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control, (c) y (d) son muestras histológicas teñidas con HE del grupo al que se había administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMA y la barra de la escala representa 250 μm . Como se deduce de las Figs. 8 (a) y (b), están ampliamente presentes células mononucleares inflamatorias y las lesiones inflamatorias están muy extendidas en la médula ósea del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control. Por otro lado, como es evidente de (c) y (d), el número de células mononucleares inflamatorias es notablemente pequeño en la médula ósea del grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA, lo que indica que se ha reducido la lesión inflamación.

10 En la Fig. 9 se muestran los resultados de la evaluación del índice de inflamación, en donde “*” muestra $p < 0,05$ en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 9, el índice de inflamación del grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA mostró un valor significativamente bajo en comparación con el grupo al que se había administrado el anticuerpo de control. Como se ha mostrado antes, los resultados del experimento utilizando ratones modelo con esclerosis múltiple han aclarado que la administración del anticuerpo neutralizante anti-RGMA reduce tanto los síntomas clínicos como la lesión histológica en la EAE.

[Ejemplo 3: Estudio de la activación de linfocitos T en esplenocitos de ratón modelo con esclerosis múltiple al que se ha administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMA]

20 El día 21 después de la administración de MOG, se aisló el bazo del ratón modelo con esclerosis múltiple (ratón con EAE) del Ejemplo 2 después de finalizar la observación de los síntomas clínicos. Se aislaron esplenocitos, se sembraron en una placa de 96 pocillos a 5×10^5 células/pocillo y se cultivaron durante 3 días para analizar la proliferación celular. Como medio, se utilizó medio RPMI1640 que contenía glutamina, piruvato de sodio, penicilina, estreptomocina, 2-ME y 10% de FBS inactivado por calor. Para la re-estimulación de linfocitos T CD4^+ se añadieron cuando comenzó el cultivo 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptido MOG o 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (2C11, BD Biosciences). De acuerdo con el método de Kubo et al., (Kubo, T., et al. *J. Immunol.* 173, 7249-7258 (2. 004)), se evaluó la absorción de [^3H]timidina durante 18 horas antes de la finalización del cultivo.

25 Para la medición de las cantidades de producción de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-17, los esplenocitos antes mencionados se sembraron en una placa de 24 pocillos a 2×10^6 células/pocillo, y se cultivaron en presencia o ausencia de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptido MOG o 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo monoclonal anti-CD3. Se utilizó el líquido sobrenadante del cultivo a las 24 horas del comienzo del cultivo para la medición de IL-2 y se utilizó el líquido sobrenadante de cultivo a las 72 horas desde el comienzo del cultivo para la medición de las otras citoquinas. La medición de las citoquinas se realizó utilizando un kit ELISA (Invitrogen) y de acuerdo con sus instrucciones.

30 Los resultados se muestran en la Fig. 10, en la que (a) muestra los resultados de la medición de la proliferación celular, (b) muestra los resultados de la medición de IL-2, (c) muestra los resultados de la medición de IFN- γ y (d) muestra los resultados de la medición de IL-17. Cada gráfico muestra el valor medio y el error típico ($n = 6$ en el grupo al que se le había administrado el anticuerpo de control, $n = 5$ en el grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA), y “*” y “***” muestran $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 10 (a), la proliferación celular de los esplenocitos obtenidos del ratón del grupo al que se había administrado anticuerpo neutralizante anti-RGMA era significativamente menor que la de los esplenocitos obtenidos a partir del ratón del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control, tanto en los casos de estimulación específica del antígeno por péptido MOG como de estimulación no específica por anticuerpo monoclonal anti-CD3. Además, como se deduce de las Figs. 10 (b), (c) y (d), las cantidades de IL-2, IFN- γ e IL-17 secretadas por los esplenocitos obtenidos del ratón del grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA era significativamente menor que las de los esplenocitos obtenidos del ratón del grupo al que se había administrado anticuerpo de control, tanto en los casos de la estimulación específica de antígeno por el péptido MOG como en los de la estimulación no específica por anticuerpo monoclonal anti-CD3. Aunque los datos no se muestran, la cantidad de secreción de IL-4 no se vio influenciada por la administración de anticuerpos neutralizantes anti-RGMA. Estos resultados han aclarado que la administración de anticuerpo neutralizante anti-RGMA a ratón con EAE atenúa notablemente las activaciones de linfocitos T específicas de antígeno y no específicas en ratón con EAE.

[Ejemplo 4: Estudio del efecto del anticuerpo neutralizante anti-RGMA en ratón modelo con esclerosis múltiple recurrente]

(4-1) Preparación del ratón modelo con esclerosis múltiple recurrente

55 En lugar de MOG, se administró proteína proteolipídica mielínica (en lo sucesivo denominada “PLP”) a ratón SJL/J para preparar un ratón modelo con EAE recurrente. Específicamente, la EAE recurrente se indujo administrando por vía subcutánea una emulsión (200 μL) de 100 μL de PBS que contenía péptido (PLP) $_{139-151}$ (HSLGKWLGHDPKF (SEQ ID NO: 6), Greiner Bio-one, 100 μg) y 100 μL de adyuvante completo de Freund que contenía bacilos de la tuberculosis muertos (H37Ra, Difco, 500 μg) al costado de un ratón SJL/J (8 a 10 semanas de edad). Además, se

administraron por vía intravenosa 200 ng de toxina de la tosferina (List Biological Laboratories) después de la administración de PLP y 48 horas después.

(4-2) Observación de síntomas clínicos por administración de anticuerpo neutralizante anti-RGMA a ratón modelo con esclerosis múltiple recurrente

5 Un anticuerpo neutralizante anti-RGMA producido por los autores de la presente invención (véase el documento no patente 3) o un anticuerpo de control (IgG de conejo, Sigma-Aldrich) se administró intraperitonealmente 400 µg de cada uno los días 25 y 28 después de la administración de PLP. El grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA consistía en 9 ratones con EAE, y el grupo al que se había administrado el anticuerpo de control consistía en 11 ratones con EAE. Los síntomas clínicos de EAE fueron observados desde la administración de PLP (día 0) hasta el día 45, y se evaluaron basándose en los criterios descritos en el Ejemplo 2 antes mencionado.

15 Los cambios en la puntuación de EAE durante el periodo de observación se muestran en la Fig. 11. La puntuación de EAE se muestra como valor medio y error típico, en donde “*” muestra $p < 0,05$ en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 11, la puntuación de EAE del grupo al que se había administrado el anticuerpo neutralizante anti-RGMA después de la administración del anticuerpo fue notablemente menor que la del grupo al que se había administrado el anticuerpo de control. Estos resultados han revelado que la administración del anticuerpo neutralizante anti-RGMA en la última etapa de la primera etapa de expresión de parálisis puede prevenir la recurrencia de EAE.

20 [Ejemplo 5: Estudio del efecto de la expresión reducida del gen RGMA sobre los síntomas clínicos de la EAE en ratones a los que se ha trasplantado BMDC estimuladas por MOG]

(5-1) Preparación de las BMDC con expresión reducida del gen RGMA

Se adquirió y usó un siRNA (Stealth RNAi (nombre comercial), Invitrogen) de la RGMA de ratón que tenía las secuencias de bases mostradas a continuación. Además, se utilizó como siRNA de control, dsRNA no dirigido (Invitrogen).

25 Cadena con sentido: 5'-AAAGAGGCCGCAGUGAGUGUAGUUG-3' (SEQ ID NO: 7)
Cadena antisentido: 5'-CAACUACACUCACUGCGGCCUCUUU-3' (SEQ ID NO: 8).

30 Se utilizaron las BMDC el día 7 después del comienzo del cultivo (véase el Ejemplo 1). Se pusieron en suspensión 1×10^6 BMDC en 100 µL de una solución para la introducción de ácidos nucleicos que contenían 500 pmol de siRNA de RGMA de ratón o siRNA de control. La muestra se transfirió a una cubeta y se introdujo siRNA en las células usando Nucleofector (marca registrada) (Lonza) de acuerdo a la explicación de manipulación del fabricante. Después de la introducción de siRNA, las células se cultivaron en medio RPMI1640 al que se había añadido glutamina, piruvato de sodio, penicilina, estreptomina, 2-ME y 10% de FBS inactivado por calor. La expresión de RGMA en las BMDC introducidas con el siRNA de la RGMA de ratón disminuyó notablemente.

(5-2) Estimulación por MOG y trasplante a un ratón

35 Las BMDC introducidas con el siRNA de la RGMA de ratón o el siRNA de control se añadieron a 100 µg/mL de péptido (MOG)₃₅₋₅₅ y se cultivaron durante 4 - 6 horas para permitir la estimulación de antígenos. Las células viables (6×10^5) después de la estimulación se administraron por vía intravenosa a un ratón receptor (C57BL/6). A continuación, se administró por vía subcutánea el adyuvante completo de Freund (200 µL) que contenía bacilos de la tuberculosis muertos (H37Ra, Difco, 500 µg). 48 horas después, se administraron por vía intravenosa 200 ng de toxina de la tosferina (List Biological Laboratories).

(5-3) Observación de los síntomas clínicos de EAE

Se observaron el grupo con siRNA de RGMA (5 ratones) y el grupo con siRNA de control (5 ratones) desde el trasplante de células (día 0) hasta el día 21 y se evaluaron los síntomas clínicos de la EAE basándose en los criterios descritos en el Ejemplo 2 anterior.

45 Los cambios en las puntuaciones de EAE durante el periodo de observación se muestran en la Fig. 12. Las puntuaciones de EAE se expresan en valores medios y los errores típicos, en donde “*” y “***” muestran $p < 0,05$ y $Pp < 0,01$, respectivamente, en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 12, la puntuación de la EAE del grupo con siRNA de la RGMA fue notablemente menor que la del grupo con siRNA de control. Los resultados han aclarado la eficacia de siRNA de RGMA para la profilaxis o el tratamiento de esclerosis múltiple.

50

[Ejemplo 6: Estudio del efecto del anticuerpo neutralizante anti-RGMA sobre los síntomas clínicos de la EAE en ratones a los que se ha trasplantado linfocitos T CD4⁺ estimulados por MOG]

(6-1) Preparación de linfocitos T CD4⁺ de ratón donante

5 Se administraron por vía intraperitoneal a un ratón donante (C57BL/6) (día -2) 400 µg de un anticuerpo neutralizante anti-RGMA producido por los autores de la presente invención (véase el documento no patente 3) o un anticuerpo de control (IgG de conejo, Sigma-Aldrich). Dos días más tarde (día 0) se administró por segunda vez el anticuerpo neutralizante anti-RGMA o el anticuerpo de control, y luego se administró por vía subcutánea una emulsión (200 µL) de 100 µL de PBS que contenía péptido (MOG)₃₅₋₅₅ (100 µg) y 100 µL de adyuvante completo de Freund que contenía bacilos de la tuberculosis muertos (H37Ra, Difco, 500 µg).
 10 Se administró por tercera vez el anticuerpo neutralizante anti-RGMA o el anticuerpo de control. El décimo (10º) día de la administración de MOG, se sacrificó el ratón y se aislaron el bazo y los ganglios linfáticos de drenaje. Se aislaron las células y se preparó una suspensión celular. Para re-estimulación de linfocitos T CD4⁺, las células (1×10⁶ células/mL) se cultivaron durante 3 días en un medio que contenía 40 µg/mL de péptido (MOG)₃₅₋₅₅. Después de completado el cultivo, las células se recogieron y los linfocitos T CD4⁺ se separaron usando un kit de separación de linfocitos T CD4⁺ (Miltenyi Biotec).
 15

(6-2) Trasplante al ratón receptor y observación de los síntomas clínicos de la EAE

El ratón receptor (C57BL/6) se irradió con antelación con una cantidad sub-lethal de radiación (500 Gy). Al ratón receptor se administraron por vía intravenosa linfocitos T CD4⁺ (células viables, 6 x 10⁵). Se observaron los ratones a los que se había trasplantado linfocitos T CD4⁺ procedentes de un ratón donante al que se había administrado un anticuerpo neutralizante anti-RGMA (grupo con anticuerpo neutralizante anti-RGMA, 7 ratones) y los ratones a los que se había trasplantado linfocitos T CD4⁺ procedentes de un ratón donante al que se había administrado un anticuerpo de control (grupo de anticuerpo de control, 7 ratones) desde el trasplante de células (día 0) hasta el día 21, y se evaluaron los síntomas clínicos de la EAE basándose de los criterios descritos en el Ejemplo 2 anterior.
 20

En la Fig. 13 se muestran los cambios en las puntuaciones de la EAE durante el periodo de observación. Las puntuaciones de la EAE se presentan como los valores medios y los errores típicos, en donde “*” y “***” muestran p<0,05 y p <0,01, respectivamente, en la prueba t de Student. Como se deduce de la Fig. 13, la puntuación de la EAE del grupo con anticuerpos neutralizantes anti-RGMA era notablemente menor que la del grupo con anticuerpo de control. Los resultados han aclarado que el efecto profiláctico o terapéutico de un anticuerpo neutralizante anti-RGMA para la esclerosis múltiple se basa en la supresión de la activación de los linfocitos T específicos de antígenos y la diferenciación de los linfocitos T autorreactivos por el anticuerpo neutralizante anti-RGMA.
 25
 30

Los resultados anteriores han aclarado que la RGMA está implicada en el comienzo de la EAE causado por respuestas inmunitarias potenciadas, tales como infiltración de células mononucleares en la médula espinal y activación de los linfocitos T, por ejemplo, proliferación de los linfocitos T, y producción de las citoquinas relacionadas con la EAE, IL-2, IL-17 e IFN-γ. Por otra parte, muestran que un anticuerpo neutralizante anti-RGMA y siRNA de la RGMA inhiben la activación de linfocitos T y son eficaces para la profilaxis o el tratamiento de la esclerosis múltiple.
 35

La presente invención no se limita a las realizaciones y ejemplos respectivos antes mencionados, y se puede modificar de varias maneras dentro del alcance definido por las reivindicaciones. Por lo tanto, las realizaciones obtenidas combinando apropiadamente los medios técnicos descritos respectivamente en diferentes realizaciones están también incluidas en el alcance técnico de la presente invención. Además, todos los documentos académicos y documentos de patentes descritos en la presente memoria descriptiva se citan como referencia en la presente memoria.
 40

Aplicabilidad Industrial

La presente invención tiene un valor de utilidad extremadamente alto en la industria de productos farmacéuticos.

Listado de secuencias

<110> Osaka University National University Corporation Chiba University

5 <120> Inhibidor de la activación de linfocitos T, composición farmacéutica que lo contiene y método de cribado de sustancias inhibitoras de la activación de linfocitos T

<130> O11F3660

10 <150> JP 2009-279189
<151> 2009-12-09

<160> 8

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1299

<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggggagag gggcaggacg ttcagccctg ggattctggc cgaccctcgc cttccttctc      60
tgcagcttcc ccgcagccac ctccccgtgc aagatcctca agtgcaactc tgagttctgg      120
agcgccacgt cgggcagcca cgccccagcc tcagacgaca cccccgagtt ctgtgcagcc      180
ttgcgcagct acgccctgtg cacgcggcgg acggcccgca cctgccgggg tgacctggcc      240
taccactcgg ccgtccatgg catagaggac ctcatgagcc agcacaactg ctccaaggat      300
ggccccacct cgcagccacg cctgcgcacg ctcccaccgg ccggagacag ccaggagcgc      360
tcggacagcc ccgagatctg ccattacgag aagagcttcc acaagcactc ggccaccccc      420
aactacacgc actgtggcct cttcggggac ccacacctca ggactttcac cgaccgcttc      480
cagacctgca aggtgcaggg cgcctggccg ctcatcgaca ataattacct gaacgtgcag      540
gtcaccaaca cgctgtgct gcccggctca gcgccactg ccaccagcaa gctcaccatc      600
atcttcaaga acttccagga gtgtgtggac cagaaggtgt accaggctga gatggacgag      660
ctcccgcccg ccttcgtgga tggctctaag aacggtgggg acaagcacgg ggccaacagc      720
ctgaagatca ctgagaaggt gtcaggccag cacgtggaga tccaggccaa gtacatcggc      780
accaccatcg tgggtgcgca ggtgggccgc tacctgacct ttgccgtccg catgccagag      840
gaagtggtea atgctgtgga ggactgggac agccagggtc tctacctctg cctgcggggc      900
tgccccctca accagcagat cgacttocag gccttcaca ccaatgctga gggcaccggt      960
gcccgcaggc tggcagccgc cagccctgca cccacagccc ccgagacctt cccatacgag     1020
acagccgtgg ccaagtgcaa ggagaagctg ccggtggagg acctgtacta ccaggcctgc     1080
gtcttcgacc tcctcaccac gggcgacgtg aacttcacac tgccgccta ctacgcgttg     1140
gaggatgtca agatgctcca ctccaacaaa gacaaactgc acctgtatga gaggactcgg     1200
gacctgccag gcagggcggc tggggggctg ccctggccc cccggccctt cctggggcgc     1260
ctcgtcccgc tcctggccct gctcctgtg ttctgctag                                1299

```

25

<210> 2

<211> 432

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 555 060 T3

Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro Thr Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys Lys Ile
 20 25 30

Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser His Ala
 35 40 45

Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Ser Tyr
 50 55 60

Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu Ala
 65 70 75 80

Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His Asn
 85 90 95

Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr Leu Pro
 100 105 110

Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys His
 115 120 125

Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr Thr His
 130 135 140

Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp Arg Phe
 145 150 155 160

Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn Tyr
 165 170 175

Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala Ala
 180 185 190

Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu Cys
 195 200 205

Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ala Ala
 210 215 220

ES 2 555 060 T3

Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln Ala
 245 250 255

Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu
 260 265 270

Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu Asp
 275 280 285

Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro Leu Asn
 290 295 300

Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly Thr Gly
 305 310 315 320

Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro Glu Thr
 325 330 335

Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro Val
 340 345 350

Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly
 355 360 365

Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Val Lys
 370 375 380

Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg Thr Arg
 385 390 395 400

Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro Arg Pro
 405 410 415

Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val Phe Cys
 420 425 430

<210> 3
 <211> 1296
 5 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 3

atggggagag gggcaggacg ttcagccctg ggattgtggc cgaccctcgc cttccttctc 60
 tgcagctttc ccgcagctat ctctccctgc aagatcctca agtgcaactc tgagttctgg 120
 10 agcgccacgt cgtcaggcag ccacgccctt gcctctgacg acgtgcccgga gttctgtgct 180

ES 2 555 060 T3

gccctgcgca cctacgccct gtgcacgcca cggacagccc gcacctgccg gggcgacctg 240
gcttaccact cggctgtcca tggcatagag gacctcatga gccagcacia ctgctccaag 300
gatggcccca cctcacagcc tcgagtgcgc acgctcccgc cagctgggga cagccaggag 360
cgctcagata gccccgagat ctgccactat gagaagagtt tccacaagca ctcagctgcc 420
cccaactaca ctcactgcgg cctctttggg gacccacacc tcaggacttt cacagaccac 480
ttccagacat gtaaggtgca aggcgcttgg cctctcatcg acaataatta cctgaacgtg 540
caggtcacca atacacctgt gctgccgggc tctgccgcca ctgccaccag caagctcacc 600
atcatcttca agaacttcca agagtgtgtg gaccagaaag tataccaagc cgagatggac 660
gagcttccgt ccgcctttgc cgatggctcc aaaaacggtg gagataaaca cggagccaac 720
agcctgaaga tcacagagaa ggtgtcaggc cagcacgtgg agatccaggc caagtacatc 780
ggcaccacca tcgtggtgag acaggtgggc cgctacctga ccttcgccgt ccggatgccc 840
gaggaggtag tcaacgccgt ggaggaccgt gacagccaag gcctctacct ctgcctgcgg 900
ggctgcccgc tcaaccagca gatcgacttc caggctttcc gtgccaacgc cgagagccct 960
cgcaggccag cagctgccag cccctctcct gtggtccccg agacatttcc gtacgagaca 1020
gctgtggcca agtgcaaaga gaagctgcct gtagaagact tgtactacca ggcctgtgtc 1080
ttcgacctcc tcacgactgg cgacgtgaac ttcacgctgg ccgcctacta tgctttggag 1140
gatggcaaga tgctccactc caacaaggac aagctacacc tgtttgaaag gactcgggag 1200
ctgcctggcg ctgtggccgc tgcagcattt cccttggccc ccgagatgct cccgggcacc 1260
gtcacacttc tggctctgct gcctctgttc tggtag 1296

<210> 4
<211> 431
5 <212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Leu Trp Pro Thr Leu
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Ile Ser Pro Cys Lys Ile
20 25 30

Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser His
35 40 45

Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Thr
50 55 60

Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly Asp Leu
65 70 75 80

10

ES 2 555 060 T3

Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His
85 90 95

Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg Thr Leu
100 105 110

Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys
115 120 125

His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Thr
130 135 140

His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp His
145 150 155 160

Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn
165 170 175

Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala
180 185 190

Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln Glu
195 200 205

Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ser
210 215 220

Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn
225 230 235 240

Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln
245 250 255

Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr
260 265 270

Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu
275 280 285

Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro Leu
290 295 300

Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu Ser Pro
305 310 315 320

Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu Thr Phe
325 330 335

ES 2 555 060 T3

Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro Val Glu
340 345 350

Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp
355 360 365

Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly Lys Met
370 375 380

Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr Arg Glu
385 390 395 400

Leu Pro Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Phe Pro Leu Ala Pro Glu Met
405 410 415

Leu Pro Gly Thr Val Thr Leu Leu Val Leu Leu Pro Leu Phe Trp
420 425 430

<210> 5
<211> 21
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Fragmento de MOG
<400> 5

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys
20

15 <210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Fragmento de PLP
<400> 6

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

25 <210> 7
<211> 25
<212> RNA
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadenas sentido de siRNA de RGMA de ratón
35 <400> 7

aaagaggccg cagugagugu aguug 25

40 <210> 8
<211> 25

<212> RNA
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cadenas antisentido de siRNA de RGMa de ratón

<400> 8

10 caacuacacu cacugcggcc ucuuu 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sustancia inhibidora de una molécula de orientación repulsiva a (RGMa) como ingrediente activo para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, tales como enfermedad autoinmunitaria celular, reumatismo, esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunitarias del sistema nervioso, tales como síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de neuro-Behçet, anemia maligna, diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), síndrome de Sjogren, dermatitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedades de Grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, glomerulonefritis, miastenia grave, enfermedades de Hashimoto.
- 10 2. La sustancia inhibidora de la RGMa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sustancia inhibidora de RGMa es un anticuerpo neutralizante anti-RGMa.
3. La sustancia inhibidora de la RGMa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sustancia inhibidora de la RGMa es siRNA de RGMa.
4. La sustancia inhibidora de la RGMa para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.
- 15 5. La sustancia inhibidora de la RGMa para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple recurrente.
6. Un método *in vitro* para inhibir la activación de linfocitos T, que comprende una etapa de poner en contacto una sustancia inhibidora de la RGMa con una célula que expresa RGMa.
- 20 7. El método para inhibir la activación de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la sustancia inhibidora de la RGMa es un anticuerpo neutralizante anti-RGMa.
8. El método para inhibir la activación de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la sustancia inhibidora de la RGMa es un siRNA de RGMa.
- 25 9. Un método de cribado de una sustancia inhibidora de la activación de linfocitos T, que comprende una etapa de poner en contacto una sustancia de ensayo con RGMa, una etapa de medir el nivel de actividad de la RGMa antes mencionada, una etapa de comparar el nivel de actividad antes mencionada con el de RGMa libre de contacto con una sustancia de ensayo, y una etapa de seleccionar una sustancia de ensayo que reduce el nivel de actividad de RGMa.

FIG. 1

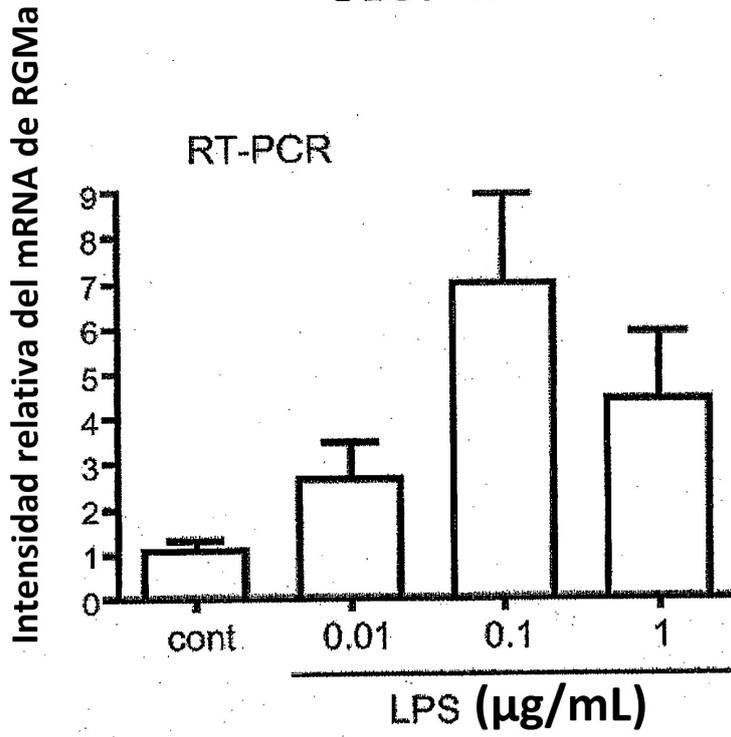


FIG. 2

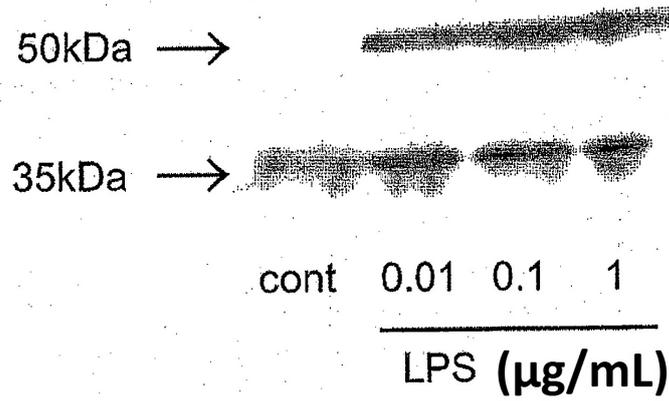


FIG. 3

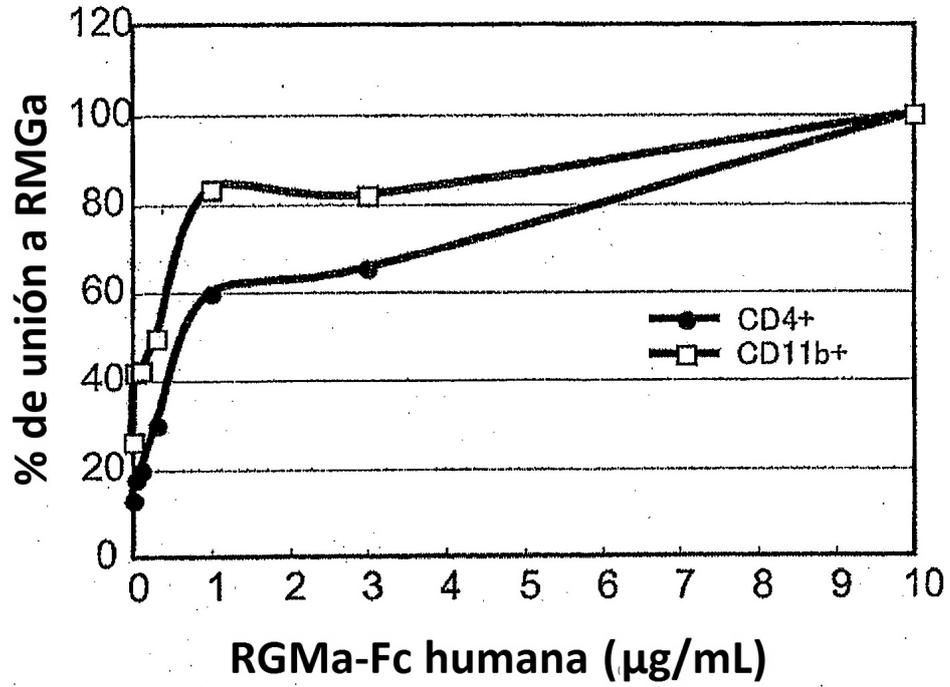


FIG. 4 (A)

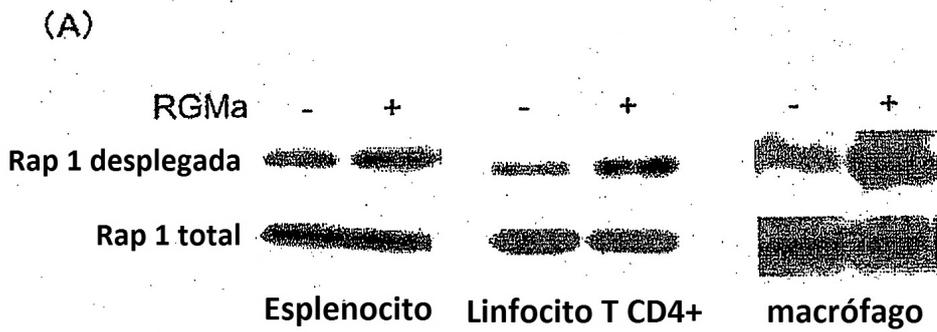


FIG. 4 (B)

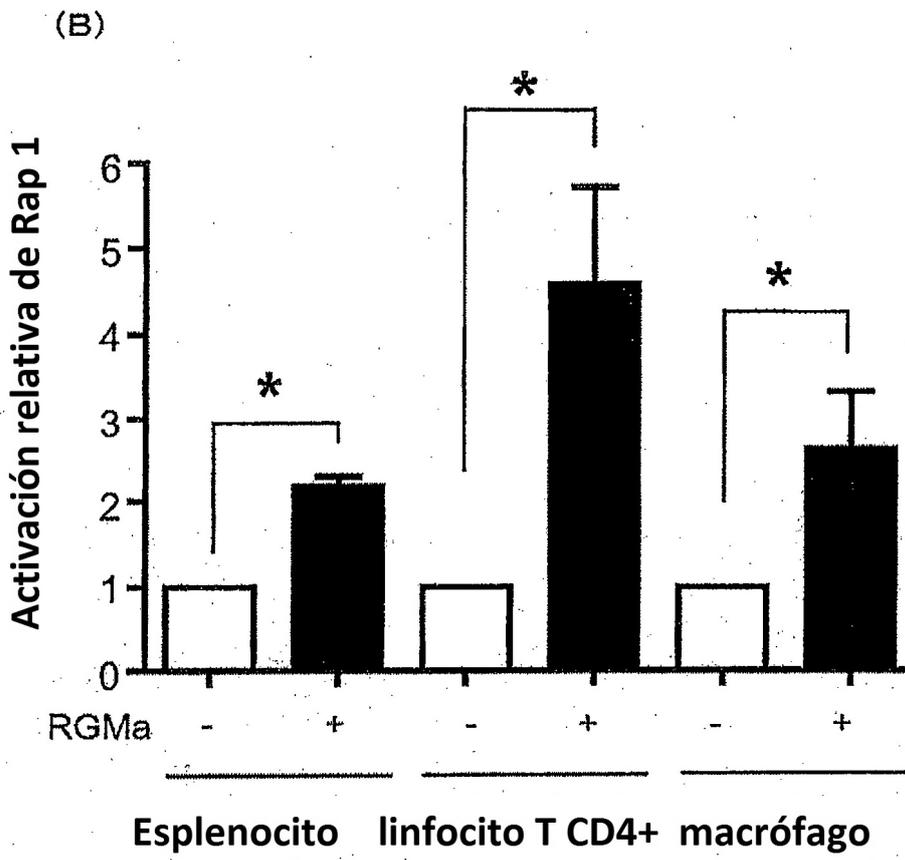


FIG. 5 (A)

(A)

Fibronectina-esplenocito

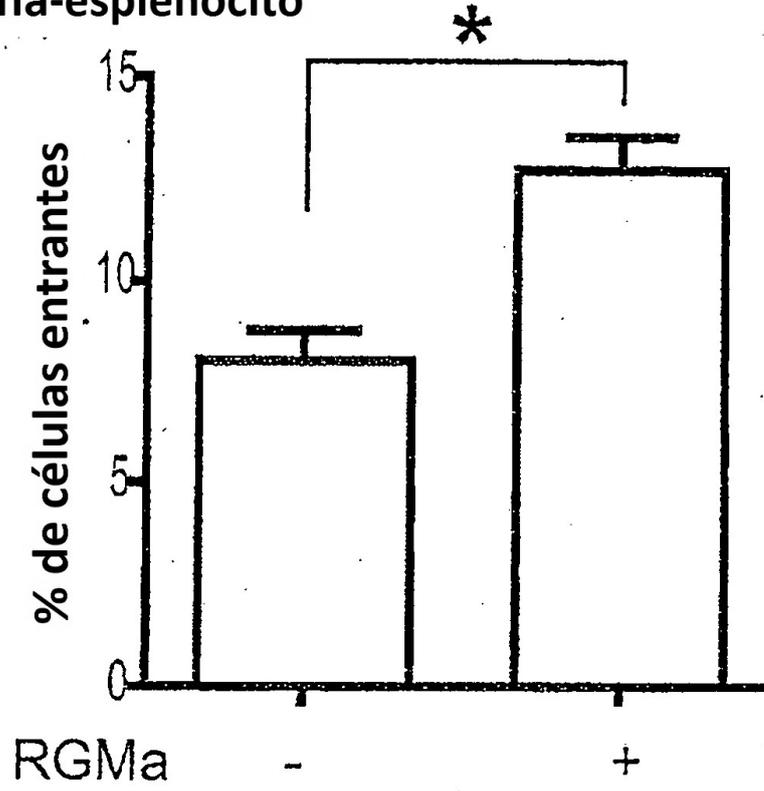


FIG. 5 (B)

(B)

ICAM1-CD4+ T

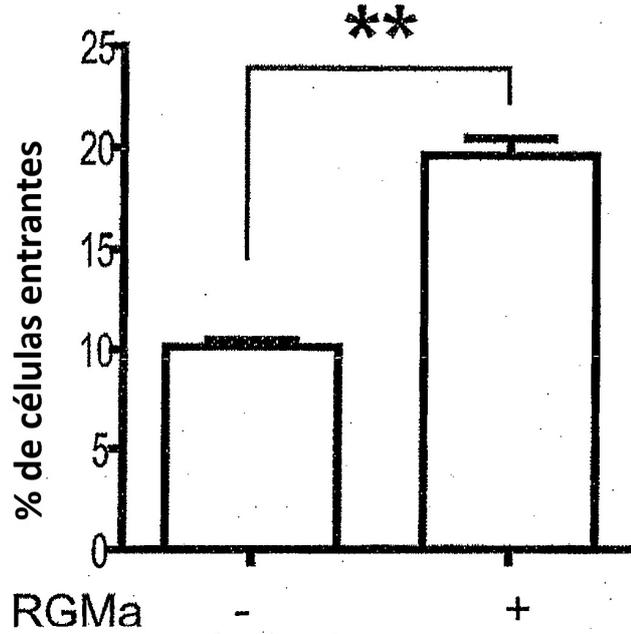


FIG. 6

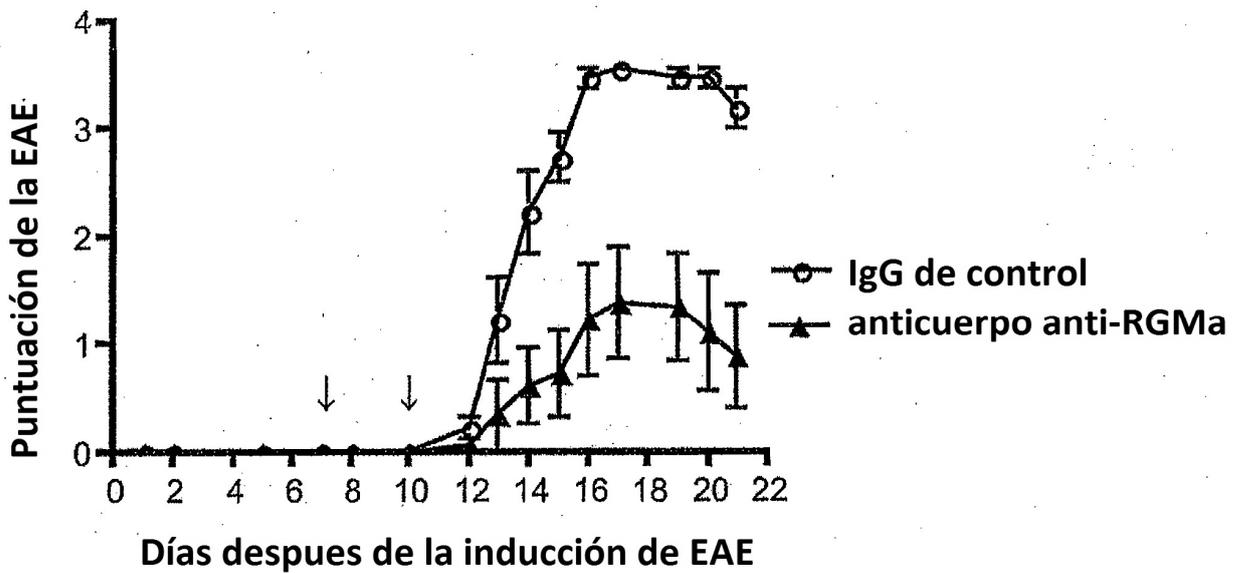


FIG. 7

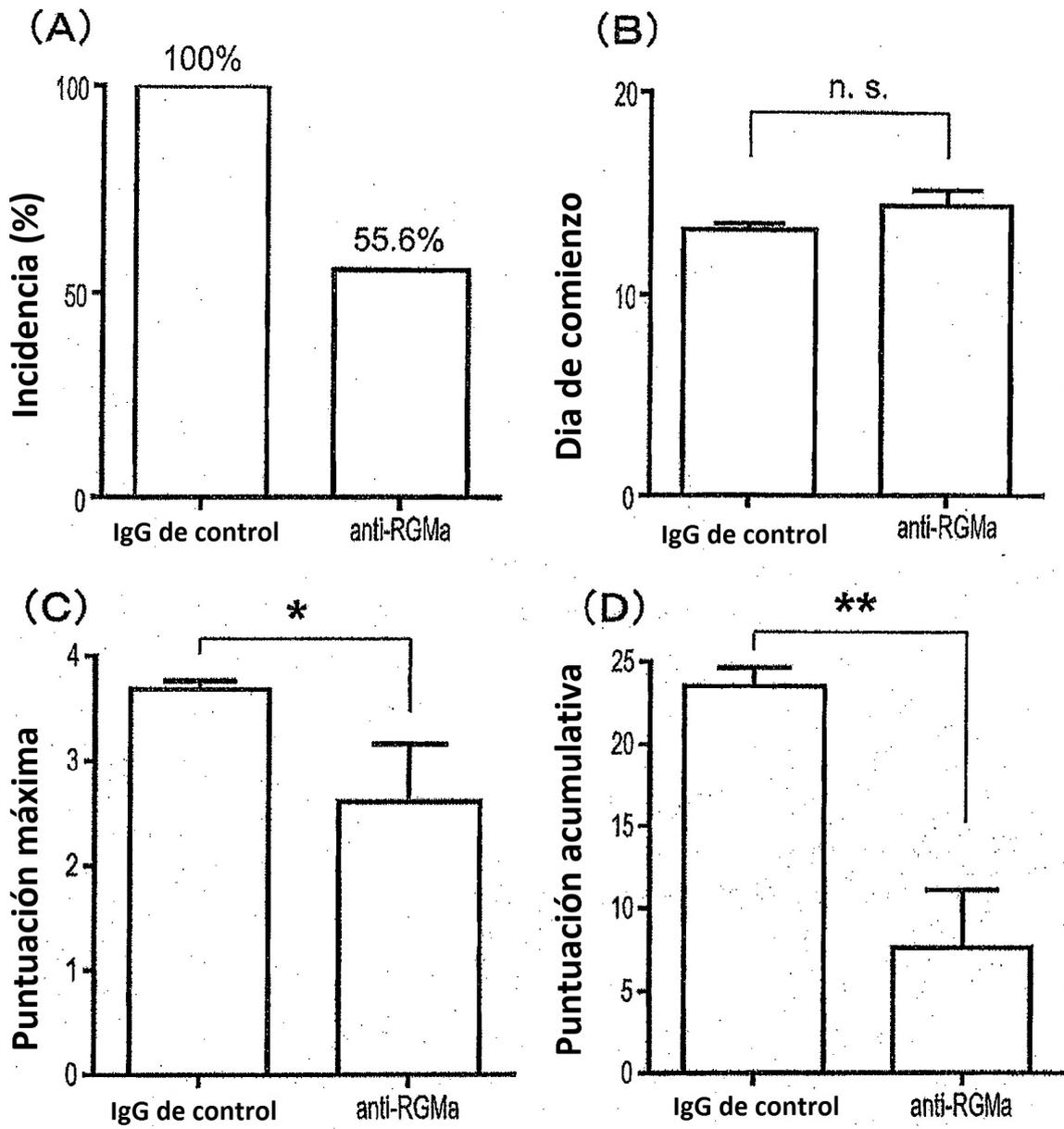


FIG. 8

IgG de control

anti-RGMA

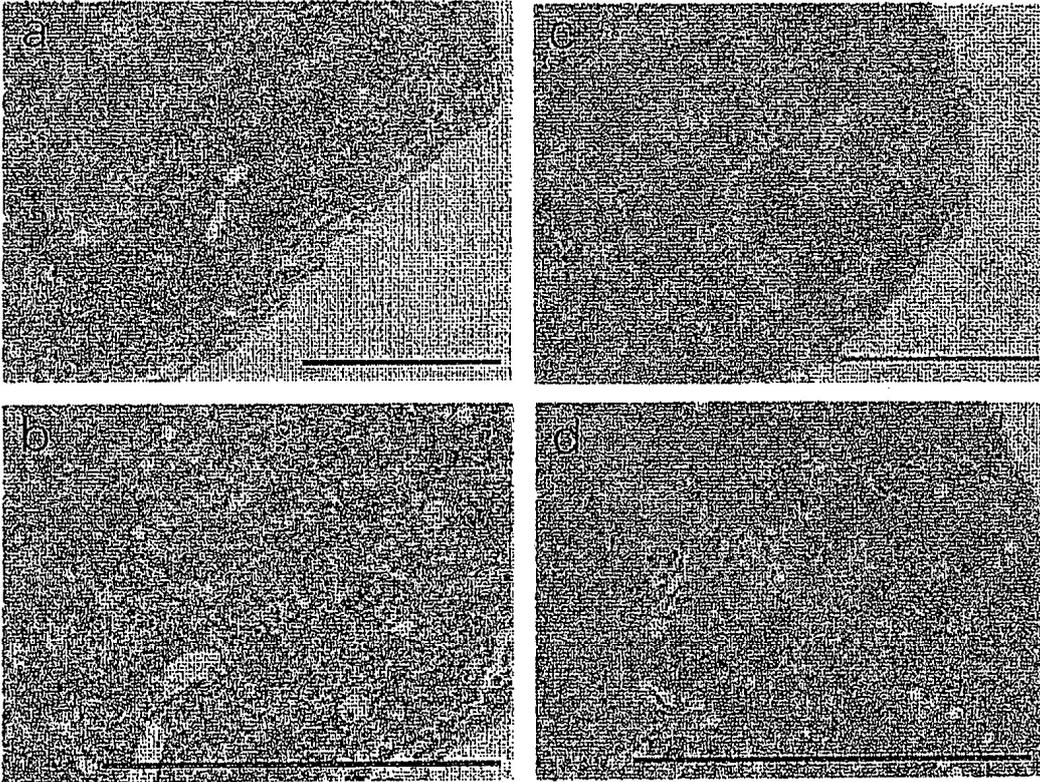


FIG. 9

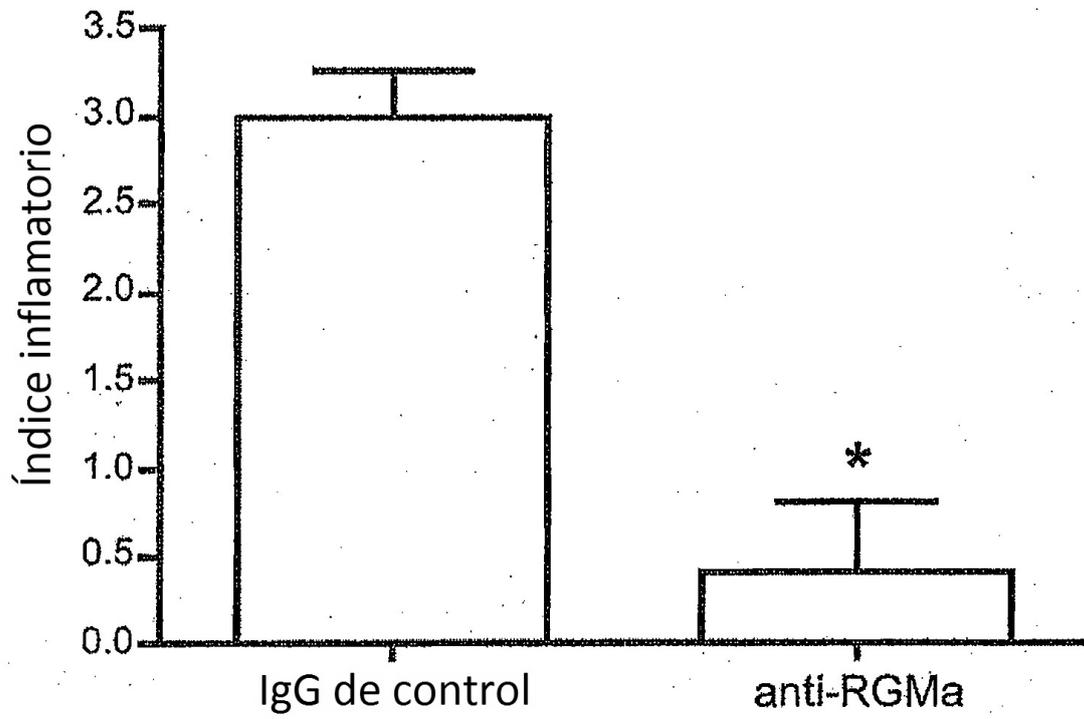


FIG. 10

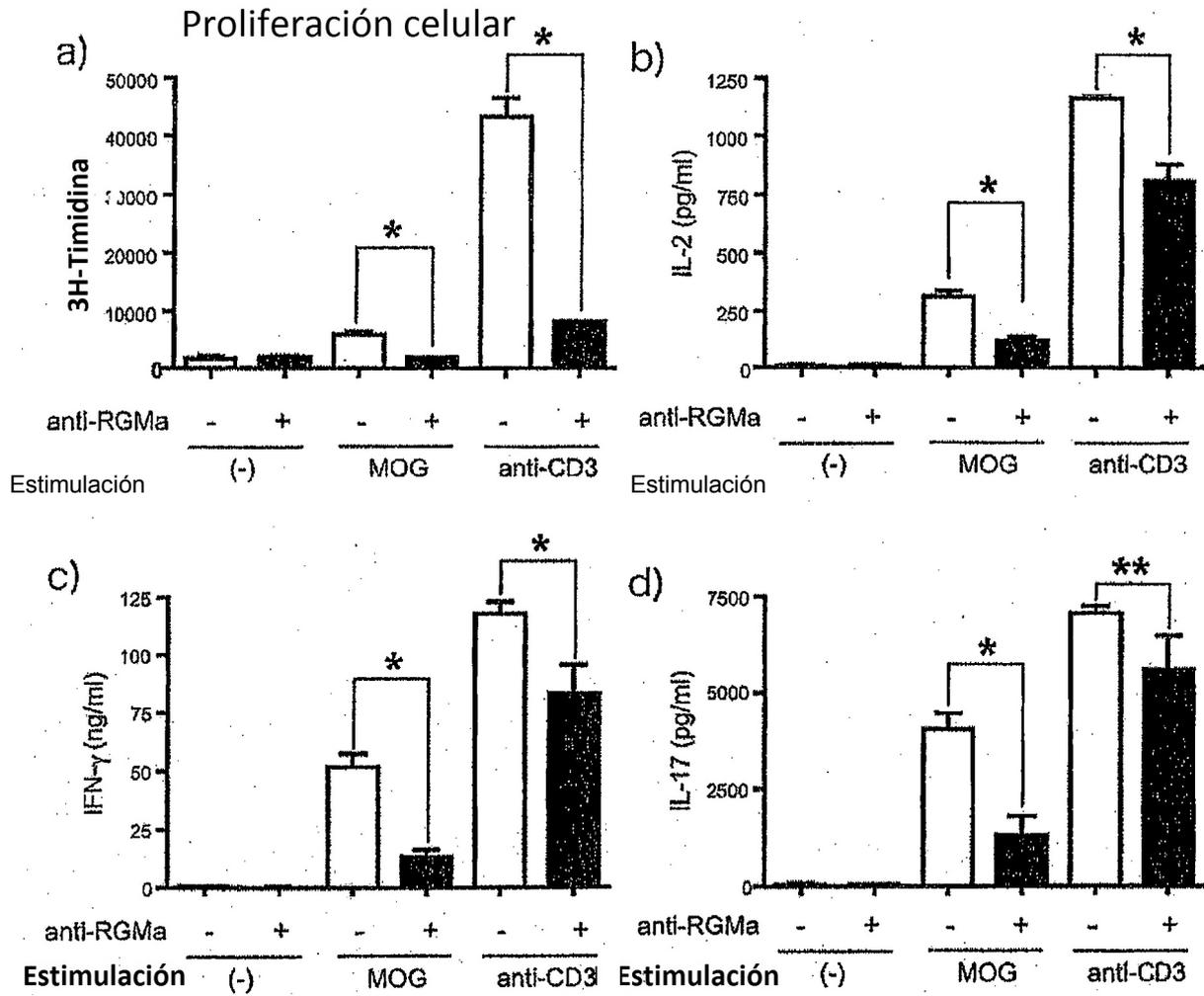


FIG. 11

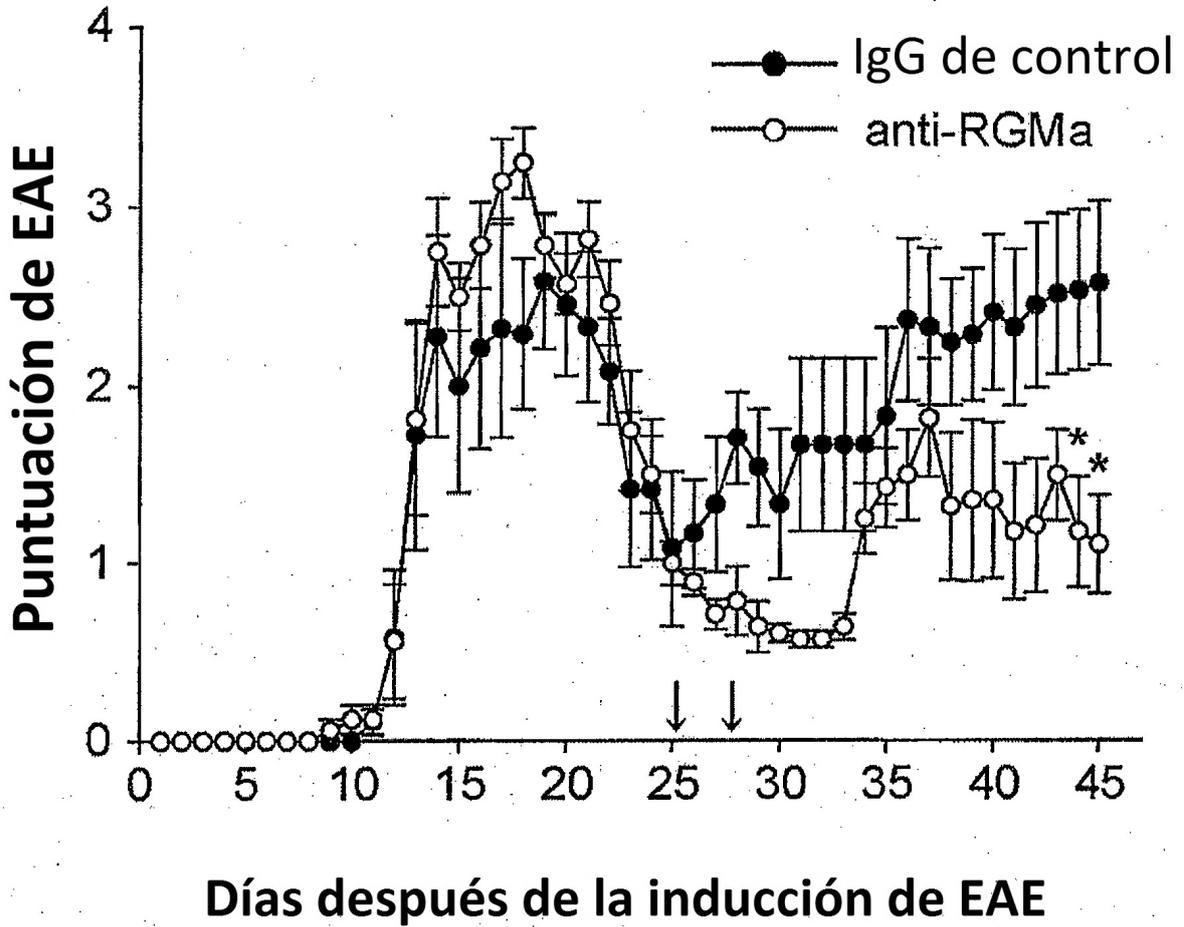


FIG. 12

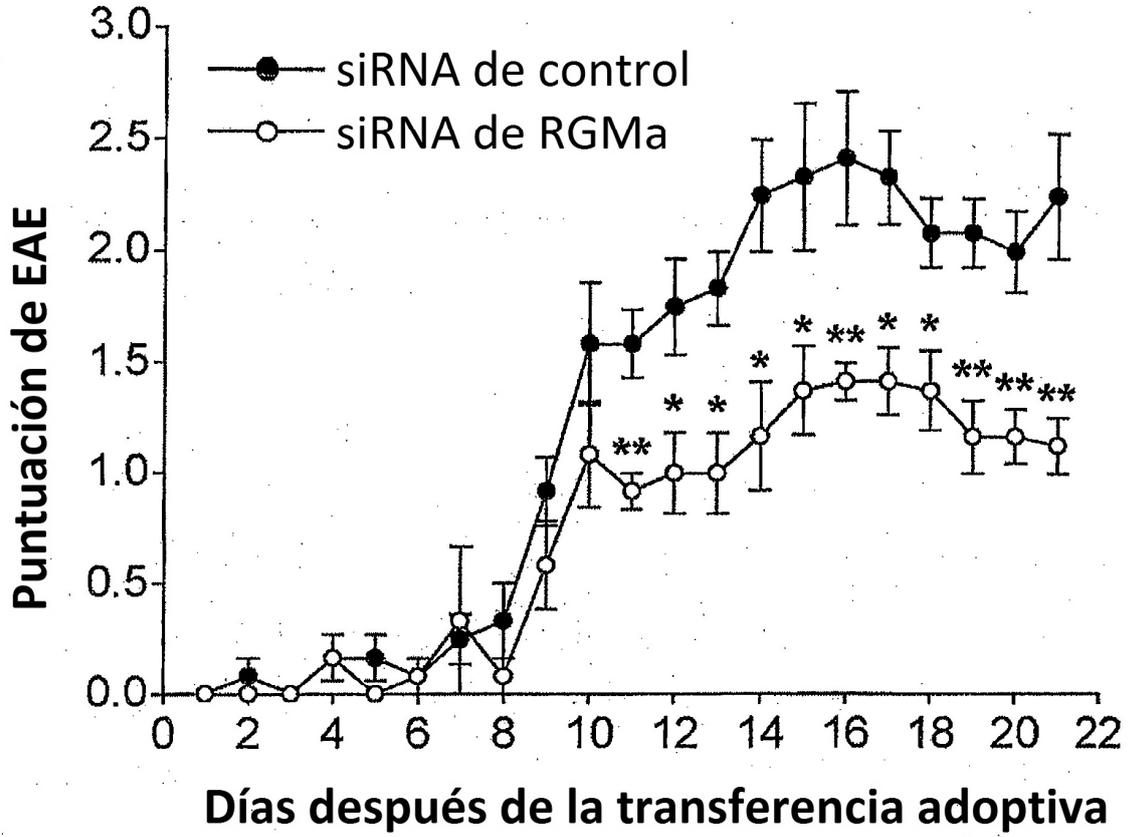


FIG. 13

