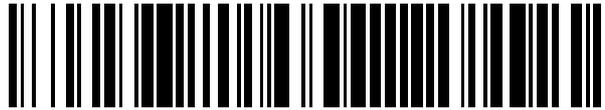


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 937**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/65** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2011 PCT/US2011/062812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12075238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2011 E 11791737 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2646463**

54 Título: **Anticuerpos que bloquean la interacción entre IGFL1 y TMEM149**

30 Prioridad:

**02.12.2010 US 419209 P**

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

**02.12.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LOBITO, ADRIAN;  
OUYANG, WENJUN y  
GONZALEZ, LINO, C., JR.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 592 937 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**

Anticuerpos que bloquean la interacción entre IGFL1 y TMEM149

5 La familia del receptor de TNF se compone principalmente de glicoproteínas integrales de membrana de tipo I que presentan homología de secuencia, particularmente con respecto a las repeticiones ricas en cisteína en sus dominios extracelulares. La familia de receptores de TNF incluye más de 29 miembros (revisado en Bodmer et al. TRENDS in Biochem Sci. 27: 19-26, 2002). TMEM149 es un receptor de TNF putativo (TNFR). Véase, por ejemplo, el documento WO 2002/020762 que describe MK61 y los isotipos. La Id. de Sec. N°: 2 del documento WO  
10 2002/020762 es idéntica a TMEM149 (Id. de Sec. N°: 1) como se describe en el presente documento. Sin embargo, se describe ningún ligando para MK61 (es decir, TMEM149) en el documento WO 2002/020762 (véase también Expert Opin. Ther. Patents (2002) 12 (11): 1737-1739).

15 Recientemente, se identificó una nueva familia de genes similares a IGF (IGFL) que consta de cuatro genes transcritos en los seres humanos (IGFL1-4; Id. de Sec. N°: 6-9, respectivamente) y uno en ratones (mIGFL; Id. de Sec. N°: 10) (Emtage et al, 2006. Genomics. 88: 513-20). Las proteínas IGFL contienen once residuos de cisteína espaciados regularmente, seis de los cuales se conservan dentro de la familia de IGF, y un péptido señal, pero sin dominio transmembrana, lo que indica que probablemente se secreten. Las secuencias de IGFL no están bien conservadas entre humanos y ratones, la identidad entre mIGFL y los IGFL humanos varía entre el 21% para IGFL1 al 38% para IGFL3. Se encontró que los genes IGFL se expresan en raras ocasiones y en niveles bajos en los tejidos humanos, y no tienen ninguna función biológica descrita. En el documento US2005/0202479 se describe el polipéptido IGFL1 así como la forma de producir anticuerpos policlonales contra dicho polipéptido.

25 De este modo, la elucidación del receptor para los miembros de la familia IGFL es un requisito previo necesario para la prevención/tratamiento de las enfermedades/condiciones asociadas con la disfunción de IGFL. En este documento se describe un receptor (es decir, TMEM149) y los métodos y composiciones, tales como agentes de unión selectivos, para modular las interacciones. Específicamente, en este documento se describen nuevos reactivos y métodos basados en la interacción de IGFL1 para la prevención/tratamiento de las enfermedades/condiciones asociadas con la actividad de TMEM149.

30 Breve resumen de la invención

35 La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, caracterizado porque el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, caracterizado porque el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La invención se refiere además a un envase que comprende: (a) un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, caracterizado porque el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149; y (b) instrucciones para su uso para bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149.

50 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, caracterizado porque el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, para su uso en el bloqueo de la interacción entre IGFL1 a TMEM149 en un método de tratamiento por terapia, en particular para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

55 La invención se refiere además a un método para identificar un compuesto capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, comprendiendo dicho método la medición de la unión de IGFL1 a TMEM149 en presencia frente a la ausencia de dicho agente, en el que una menor unión de IGFL1 a TMEM149 en presencia de dicho agente es indicativa de que dicho agente es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, en el que dicho agente no es Fc-TMEM149.

60 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para identificar un compuesto capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, comprendiendo dicho método la medición de una actividad TMEM149 mediada por IGFL1 en presencia o ausencia de dicho agente, en el que una menor actividad de TMEM149 en presencia de dicho agente es indicativa de que dicho agente está bloqueando IGFL1 la interacción entre IGFL1 y TMEM149, en el que dicha actividad de TMEM149 mediada por IGFL1 se selecciona del grupo que consiste en la producción de un mediador inflamatorio y el reclutamiento de citoesqueleto.

65

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1: Alineación de ClustalW2 de TMEM149 humano y de ratón. Los asteriscos indican residuos idénticos, dos puntos indican residuos conservados y los puntos indican residuos semiconservados. El péptido señal está en cursiva, el dominio transmembrana subrayado y las cisteínas conservadas y el dominio extracelular están en negrita. TMEM149 humano (Id. de Sec. N°: 1) es una proteína de 355 aminoácidos que tiene un péptido señal de 22 residuos (Id. de Sec. N°: 2). TMEM149 de ratón (Id. de Sec. N°: 3) es una proteína de 345 aminoácidos que tiene un péptido señal de 22 residuos (Id. de Sec. N°: 4).
- 10 Figura 2: Alineación de ClustalW2 de IGFL1, IGFL2, IGFL3 y IGFL4 humanos. Los asteriscos indican residuos idénticos, dos puntos indican residuos conservados y los puntos indican residuos semiconservados.
- 15 Figura 3: mIGFL se produce como una proteína dimérica soluble y está regulada positivamente en las condiciones inflamatorias de la piel en ratones. Se muestra un gel PAGE teñido con Coomassie de FLAG-mIGFL (izquierda) purificada realizado en condiciones reductoras (Red.) o no reductoras (NR). Se hace referencia en el Ejemplo 3.
- 20 Figura 4: es un gráfico que representa los niveles séricos de FLAG-mIGFL de ratones inyectados con un vector que codifica la FLAG-mIGFL o un vector control. Se analizó el suero con respecto a mIGFL por ELISA a las 6 y 24 h después de la inyección (n = 5, ±DE). Se hace referencia en el ejemplo 4.
- 25 Figura 5: es un gráfico de un análisis de RT-PCR de la expresión de mIGFL en el tejido normal de ratón. El número de copias de mIGFL se determinó mediante la comparación de los valores de Ct de la muestra con los valores de Ct generados con una serie de diluciones de un número de copias conocido de cDNA de mIGFL, normalizados posteriormente a la media de los niveles de expresión de mIGFL (±DE). Se hace referencia en el Ejemplo 5.
- 30 Figura 6: Modelo de ratón de la psoriasis inducida por Imiquimod. Los ratones se trataron una vez al día con una aplicación tópica de crema de Imiquimod en sus espaldas afeitadas y orejas derechas y A) se controlaron las puntuaciones clínicas (arriba) y el grosor de las orejas (parte inferior) cada dos días durante el régimen de tratamiento. B) Fotografía de los ratones tratados y no tratados con Imiquimod en el día 8. Se hace referencia en el ejemplo 5.
- 35 Figura 7: es un gráfico que representa la expresión relativa de mIGFL en un modelo de psoriasis (izquierda) y modelo de herida (derecha). A) expresión de mIGFL, normalizado a los niveles de expresión de la proteína ribosomal L19 (RPL19), en el RNA de la piel de los ratones tratados diariamente durante cinco días con Imiquimod (n = 5 tratado y n = 3 no tratado, ±DE). B) Análisis de microarrays de expresión mIGFL en el día 7 después de una biopsia de piel de grosor completo mediante punzón (n = 5, ±DE). Se hace referencia en los Ejemplos 5 y 6.
- 40 Figura 8: es un gráfico del análisis de RT-PCR de la expresión mTMEM149 en el tejido normal de ratón. El número de copias de mTMEM149 se determinó mediante la comparación de los valores de Ct de la muestra de los valores de Ct generados con una serie de diluciones de un número de copias conocido de DNAc de mIGFL, normalizado posteriormente a la media de los niveles de expresión de mTMEM149 (±DE). Se hace referencia en el Ejemplo 7.
- 45 Figura 9: es un gráfico que representa la expresión relativa de mTMEM149 en un modelo de psoriasis. mTMEM149 no está regulada positivamente en la inflamación de la piel inducida por imiquimod en ratones. El análisis de la expresión de mTMEM149 por RT-PCR, normalizado a los niveles de expresión de RPL19, en el RNA de la piel de los ratones tratados una vez al día con una aplicación tópica de crema de Imiquimod (Aldara®) (n = 5 tratado y n = 3 no tratado, ±DE). No se observa diferencia significativa en ratones Balb/C o B6. Se hace referencia en el Ejemplo 7.
- 50 Figura 10: es un gráfico que muestra los resultados del análisis de RT-PCR de la expresión mTMEM149 en poblaciones de leucocitos purificados. Las poblaciones de leucocitos a partir de bazos fueron clasificados por citometría de flujo basado en la expresión en superficie de los marcadores de linaje. Los niveles relativos de mTMEM149 se determinaron posteriormente mediante RT-PCR mediante RNA aislado de células clasificadas (±DE). Se hace referencia en el Ejemplo 7.
- 55 Figura 11: muestra los resultados de un experimento para determinar la expresión en superficie de mTMEM149. A) se bloquearon suspensiones de células individuales a partir de ganglios linfáticos, el bazo o PBMC durante la unión no específica a anticuerpos y después se marcaron con anti-mTMEM149 en presencia o ausencia de mTMEM149-His recombinante, seguido de un isotipo específico, anticuerpo secundario marcado con PE. Las células se marcaron a continuación con anticuerpos específicos de linaje y se analizaron por citometría de flujo. B) La misma técnica de marcaje se utiliza en las células T CD4+ de tipo salvaje (WT) y ratones knockout TMEM149. No hay tinción en ratones KO. Se hace referencia en el Ejemplo 7.
- 60 Figura 12: muestra la expresión superficial de mTMEM149 en subgrupos aislados de células T de ratón. Expresión de mTMEM149 en subconjuntos de células T de ratón y con activación. A) mTMEM149 se expresa en células T CD4 y CD8, pero a bajos niveles en las células T gamma-delta. B) mTMEM149 se expresa en CD4+ CD25hi (células T reguladoras), a niveles más bajos en las células T con un fenotipo virgen (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) y en los niveles

superiores en las células T con un fenotipo de memoria (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). C) la expresión de mTMEM149 disminuye transitoriamente en las células T CD4<sup>+</sup> activadas con anti-CD3, pero vuelve tras la permitir a las células T descansar. Se bloquearon las suspensiones de células individuales a partir de los ganglios linfáticos o el bazo durante la unión no específica a anticuerpos y luego se marcaron con anti-mTMEM149 seguido de un anticuerpo secundario marcado con APC específico de isotipo. Las células se marcaron a continuación con anticuerpos específicos de linaje y se analizaron por citometría de flujo. En C, las células T CD4<sup>+</sup> purificadas se activaron en placas de cultivo de tejidos recubiertos con 10 µg/ml de anti-CD3 durante los tiempos indicados antes del análisis de expresión de mTMEM149, o se dejaron en reposo durante 7 días en una placa no recubierta fresca, después de 48 horas de la activación de anti-CD3. Se hace referencia en el Ejemplo 7.

Figura 13: muestra la expresión TMEM149 humano en el tejido normal, los leucocitos de sangre periférica y el tejido psoriásico. A) un gráfico de un análisis de RT-PCR de los niveles de expresión TMEM149 humanos en RNA extraído de un panel de tejido humano normal. Los niveles de expresión se normalizaron a la RPL19 gen de control. B) un gráfico que muestra los resultados del análisis de RT-PCR de la expresión TMEM149 en poblaciones de leucocitos purificados. Las poblaciones de leucocitos se ordenaron mediante separación magnética en base a la expresión superficial de los marcadores de linaje. Se generaron MDDC a partir de células CD14<sup>+</sup> purificadas por maduración de las mismas in vitro durante una semana con GM-CSF e IL-4. Los niveles relativos de TMEM149 se determinaron entonces mediante RT-PCR realizado en RNA aislado de células clasificadas (±DE). C) El análisis de RT-PCR de la expresión de TMEM149 en el RNA de muestras de piel normal, psoriásica o piel adyacente no afectada (PSNE), normalizado con RPL19 (n = 4, ±DE). Se hace referencia en el Ejemplo 8.

Figura 14: expresión superficial de TMEM149 en poblaciones de leucocitos humanos. Las células mononucleares de sangre periférica, MDDC o células 293T transfectadas con TMEM149 se bloquearon durante la unión no específica a anticuerpos y luego se marcaron con anti-TMEM149 en presencia o ausencia de TMEM149-His, seguido de un anticuerpo secundario recombinante marcado con PE específico de isotipo. Las células se marcaron a continuación con anticuerpos específicos de linaje y se analizaron por citometría de flujo. Se hace referencia en el Ejemplo 8.

Figura 15: muestra que los IGFL humanos se producen como una proteína dimérica soluble. Geles PAGE teñidos con Coomassie de A) FLAG-IGFL1 B) FLAG-IGFL2, C) FLAG-IGFL3, y D) FLAG-IGFL4 purificadas, realizados en condiciones reductoras (Red.) o no reductoras (NR). Se hace referencia en los Ejemplos 9 y 10.

Figura 16: muestra geles PAGE teñidos con Coomassie de A) FLAG-IGFL1, B) FLAG-IGFL3, y C) FLAG-IGFL4 purificadas, realizados con (+) o sin (-) tratamiento con PNGasa F. IGFL1 e IGFL4 humana están glicosiladas. Se digirieron 5 µg de proteínas purificadas con PNGasaF durante una hora de acuerdo con el protocolo de los fabricantes, se realizaron en geles SDS-PAGE, y se tiñeron con Coomassie. Se hace referencia en el Ejemplo 9.

Figura 17: Identificación de microarrays de proteínas de una nueva interacción de proteínas entre IGFL1 y TMEM149. A) TMEM149 fue identificado como una proteína de unión a IGFL1 mediante microarrays de proteínas. Se utilizaron FLAGIGFL1 (arriba) o TMEM149-Fc (abajo) purificadas marcadas con fluorescencia para usar como sonda en un portaobjetos de microarrays de proteínas. Se muestran las proteínas a partir de los puntos con los valores de intensidad superior a 10. B) Alineación ClustalW2 del gen TMEM149 humano, de macaco, ratón y rata. El péptido señal predicho está en cursiva, se subrayan los dominios transmembrana y DD putativa está en negrita. Los residuos idénticos se indican con un asterisco (\*), residuos conservados por dos puntos (:), y los residuos semiconservados por puntos (.). Se hace referencia en el Ejemplo 10.

Figura 18: IGFL1 interactúa con TMEM149 humana con alta afinidad. A) Anticuerpo monoclonal anti-TMEM149 se une a las células transfectadas con TMEM149. Se transfectaron células HEK293T con TMEM149 o vector y luego se tiñeron con anti-TMEM149 o anticuerpo de control. B) análisis FACS de IFGL1 que se une a células que expresan TMEM149 en superficie. Las células 293T transfectadas con vector de control o los receptores indicados se incubaron con FLAG-IGFL1 y la unión se demostró con el marcador fluorescente anti-FLAG. La expresión de NGFR se determinó usando un anticuerpo anti-NGFR marcado con PE y se detectó la expresión de DR4 con FLAG-TRAIL soluble y anti-FLAG. C) se utilizó ensayo de radioligando para determinar la afinidad de IGFL1 con TMEM149. FLAG-IGFL1 marcado con I<sup>125</sup> se permitió unirse a las células 293T transfectadas con TMEM149 humana con cantidades crecientes de ligando no marcado. Los gráficos son representativos de dos experimentos. D) Los sensogramas de unión de FLAG-IGFL1 a TMEM149-Fc inmovilizada se analizaron mediante SPR (X<sup>2</sup> = 49,2). Se hace referencia en los Ejemplos 10 y 11.

Figuras 19A-D: unión de miembros de la familia IGFL a TMEM149 como se determina por SPR. Los sensogramas de las concentraciones indicadas de FLAG-IGFL2, FLAG-IGFL3 y FLAG-IGFL4 se unen a 7.145 RU de TMEM149-Fc inmovilizado. Se hace referencia en el Ejemplo 11.

Figura 20: IGFL1 interactúa con TMEM149 humana con alta afinidad. A) análisis FACS de IFGL3 que se une a células que expresan TMEM149 en superficie. Las células 293T transfectadas con vector de control o los receptores indicados se incubaron con FLAG-IGFL3 y la unión se demostró con el marcador fluorescente anti-FLAG. B) Los sensogramas de diversas concentraciones de unión de FLAG-IGFL3 a TMEM149-Fc inmovilizada se analizaron mediante SPR (X<sup>2</sup> = 49,2).

- Figura 21: mIGFL interactúa con TMEM149 murino con alta afinidad. A) anti-mTMEM149 monoclonal se une a células que expresan mTMEM149. Las células 293T se transfectaron con mTMEM149 o vector y luego se tiñeron con anti-TMEM149 o IgG de control. B) Análisis FACS de unión de mIGFL a las células que expresan mTMEM149 en superficie, NGFR o DR4. Las células 293T transfectadas con vector de control o los receptores indicados se incubaron con FLAG-mIGFL y la unión se demostró con el marcador fluorescente anti-FLAG. C) se utilizó radioligando de ensayo para determinar la afinidad de mIGFL1 con mTMEM149. FLAG-mIGFL marcado con  $I^{125}$  se permitió unirse a las células 293T transfectadas con TMEM149 murino con cantidades crecientes de ligando no marcado. Los gráficos son representativos de dos experimentos. D) Sensogramas de FLAG-mIGFL que se une a mTMEM149-Fc inmovilizada se analizó mediante SPR ( $X^2 = 4,9$ ). Se hace referencia en el Ejemplo 11.
- Figura 22: El ECD de TMEM149 tiene características estructurales de un TNFR y un dominio de muerte citoplasmático putativo. A) Alineación ClustalW2 de la ECD de TMEM149 de 9 mamíferos. Los enlaces disulfuro predichos se indican y se basan en el patrón de puentes disulfuro observados en otros miembros de la familia TNFR con módulos CRD similares. El mapeo de disulfuro no fue concluyente, pero apoyó un enlace disulfuro entre C11 y C12. Los aminoácidos con más del 44% de identidad entre las especies se destacan en púrpura. B y C) Alineación de módulos CRD putativos de TMEM149 con módulos CRD de TNFR conocidos. La secuencia de consenso de los módulos de CRD de TNFR y sus estructuras se describen en Naismith y Sprang (1998). Las cisteínas están resaltados en rojo. Se hace referencia en el Ejemplo 11.
- Figura 23: Modelo tridimensional del dominio citoplásmico de TMEM149. El panel superior muestra una estructura completa de todos los átomos de TMEM149 DD humano plegado (aminoácidos 247-335) creado con MODDLER utilizando tres estructuras molde superpuestas de MyD88, Pelle y FADD. Los seis  $\alpha$ -hélices del pliegue DD están etiquetados como A-E; la cadena es una gama de colores a partir de N-(azul) a C-terminal (rojo). El panel inferior muestra la predicción helicoidal derivada de PsiPRED para TMEM149 humana, así como una línea de consenso que marca la conservación de los residuos de ortólogos de TMEM149 (las letras mayúsculas indican residuos casi invariables, mientras que las letras minúsculas son los aminoácidos más frecuentes). Se hace referencia en el Ejemplo 11.
- Figura 24: IGFL1 está regulada positivamente en muestras de piel psoriásica y en los queratinocitos tratados con  $TNF\alpha$ . A) Intensidad media de expresión del miembro de la familia IGFL se determinó a través de microarrays de RNA a partir de RNA de muestras de piel normal y psoriásica afectada o adyacente no afectada (PSNE). \*Test T de Student  $p = 0,003$  en relación con la piel control normal. B) Análisis de RT-PCR de la expresión del miembro de la familia IGFL en RNA de piel a partir de muestras de piel normal, psoriásica o PSNE, normalizado a RPL19 ( $n = 4$ ,  $\pm DE$ ). \*\* Test T de Student  $p = 0,03$ . Se hace referencia en el Ejemplo 12.
- Figura 25: Piel teñida con hematoxilina y eosina (izquierda) e hibridada in situ con IGFL1 (derecha) en muestras normales y psoriásicas de piel. Se hace referencia en el Ejemplo 12.
- Figura 26: Análisis de RT-PCR de la expresión de IGFL1 en cultivos de queratinocitos primarios tratados con las citoquinas indicadas durante 6 o 24 h. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes ( $\pm DE$ ). \* test T de Student  $p < 0,05$ . Se hace referencia en el Ejemplo 13.
- Figura 27: ilustra que ciertos anticuerpos anti-TMEM149 monoclonales pueden bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149 en la superficie de las células 293T. Las células 293T transfectadas con TMEM149 se incubaron con inmunoglobulinas de ratón o de control de los clones de anticuerpos monoclonales anti-TMEM149 indicadas seguido de una incubación con FLAG-IGFL1. Las células se marcaron a continuación con el marcador fluorescente anti-FLAG y se analizaron por citometría de flujo. Las células de control negativo fueron transfectadas con un vector de control y se dejaron interactuar con FLAG-IGFL1. Se hace referencia en el Ejemplo 14.
- Figura 28: ilustra que ciertos anticuerpos anti-TMEM149 monoclonales pueden bloquear la interacción entre IGFL3 y TMEM149 en la superficie de las células 293T. Las células 293T transfectadas con TMEM149 se incubaron con inmunoglobulinas de ratón o de control de los clones de anticuerpos monoclonales anti-TMEM149 indicadas seguido de una incubación con FLAG-IGFL3. Las células se marcaron a continuación con el marcador fluorescente anti-FLAG y se analizaron por citometría de flujo. Las células de control negativo fueron transfectadas con un vector de control y se dejaron interactuar con FLAG-IGFL3. Se hace referencia en el Ejemplo 15.
- Figura 29: muestra un gráfico de un análisis de RT-PCR de niveles de expresión de IGFL1 en RNA extraído de un panel de tejido humano normal. Los niveles de expresión se normalizaron a los del gen control RPL19. El nivel de expresión en todos los tejidos es relativo al nivel de expresión en la piel. Se hace referencia en el Ejemplo 19.
- Figura 30: es un gráfico de un análisis de RT-PCR de los niveles de expresión de IGFL2 humanos en RNA extraído de un panel de tejido humano normal. Los niveles de expresión se normalizaron a los del gen control RPL19. El nivel de expresión en todos los tejidos es relativo al nivel de expresión en la piel. Se hace referencia en el Ejemplo 19.
- Figura 31: es un gráfico de un análisis de RT-PCR de los niveles de expresión de IGFL3 humanos en RNA extraído de un panel de tejido humano normal. Los niveles de expresión se normalizaron a los del gen control RPL19. El nivel

de expresión en todos los tejidos es relativo al nivel de expresión en la piel. Se hace referencia en el Ejemplo 19.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton, et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención. Aunque se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, se describen los métodos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en sentido 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente. Se remite a los practicantes particularmente a Sambrook et al., 1989, y Ausubel FM et al., 1993, para definiciones y términos de la técnica. Se ha de entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos, ya que estos pueden variar.

Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el rango.

A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en sentido 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente.

Los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que se puede tener por referencia a la especificación como un todo. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación están más completamente definidos por referencia a la especificación como un todo.

En los siguientes ejemplos, se analizó el perfil de expresión génica de mIGFL y se descubrió que se expresa principalmente en la piel normal en ratones. Curiosamente, la expresión de mIGFL está sobrerregulada aún más durante las respuestas inflamatorias en la piel y heridas en la piel. De los cuatro miembros de la familia IGFL humanos, sólo IGFL1 está regulada positivamente en muestras de piel psoriásica humana. In vitro, IGFL1 se produce por los queratinocitos y TNF $\alpha$  potencia su expresión. Finalmente, se encontró que tanto mIGFL e IGFL1 interactúan específicamente con alta afinidad con un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral putativo (TNFR), designado aquí como TMEM149. TMEM149 murino se expresa de forma más abundante en las células T de ratón, lo que sugiere que mIGFL e IGFL1 producidos en la piel potencialmente pueden ejercer funciones de regulación de respuestas de células T.

Tal como se describe en el presente documento, los solicitantes han demostrado que TMEM149 es un receptor funcional para miembros de la familia IGFL. Además, los solicitantes han demostrado que ciertos miembros de la familia IGFL afectan a la proliferación de células T.

Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de los términos utilizados en la presente descripción, se proporcionan una serie de definiciones a continuación. Por otra parte, a menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "anticuerpo" en este documento se usa en el sentido más amplio y se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y cualquier fragmento, mutante, variante o derivación del mismo, siempre y cuando muestre la actividad biológica deseada (por ejemplo, la actividad de unión a epítipo). Ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales o partes de los mismos tal como se definen en las reivindicaciones.

En los estudios descritos en el presente documento, los solicitantes han demostrado que TMEM149 es un receptor funcional para miembros de la familia IGFL. Además, los solicitantes han demostrado que ciertos miembros de la familia IGFL afectan a la proliferación de células T.

Como se usa en este documento, TMEM149 se refiere a un receptor de superficie celular ampliamente distribuido. El TMEM149 humano (Id. de Sec. N°: 1) y el TMEM149 murino (Id. de Sec. N°: 3) se muestran en la Figura 1.

Los términos "gen TMEM149" o "molécula de ácido nucleico de TMEM149" o "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos como se establece en US7153669 para el gen, molécula de ácido nucleico o polinucleótido de MK61.

El término "polipéptido TMEM149" se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se define en US7153669 para el polipéptido MK61. Los polipéptidos relacionados incluyen: las variantes alélicas del polipéptido TMEM149, ortólogos de polipéptidos TMEM149, variantes de corte y empalme de polipéptidos

TMEM149, variantes de polipéptidos TMEM149 y derivados de polipéptidos TMEM149. Los polipéptidos TMEM149 pueden ser polipéptidos maduros, como se define en el presente documento, y pueden presentar o no un residuo de metionina en amino terminal, dependiendo del método por el cual se preparan.

5 El término "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a un agente de unión selectivo, tal como un anticuerpo, y adicionalmente capaz de ser utilizado en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a una epítipo de cada antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

10 El término "polipéptidos TMEM149 biológicamente activos" se refiere a polipéptidos TMEM149 que tienen al menos una característica de actividad del polipéptido TMEM149 como se ha definido anteriormente.

15 IGFL tal como se usa en este documento generalmente se refiere a cualquier miembro de la familia de las proteínas representadas en la Figura 2. Los miembros de la familia IGFL humanos (Id. de Sec. N°: 6-9) fueron identificados por el método descrito en Tang et al. *Genomics* 83: 727-734 (2004) y caracterizados por Emtage et al. (2006, *Genomics*. 88: 513-20).

20 El polipéptido IGFL1 (Id. de Sec. N°: 6) es una proteína de aproximadamente 110 aminoácidos con una masa molecular predicha de aproximadamente 12,1 kDa no glicosilada. Un péptido señal de 23 residuos se predice a partir del residuo 1 al residuo 23, inclusive, de la Id. de Sec. N°: 6. La porción extracelular, o la proteína madura, es útil por sí misma. La proteína madura (es decir, sin el péptido señal) es Id. de Sec. N°: 25. Un experto en la técnica reconocerá que el sitio de escisión real puede ser diferente del predicho por el programa de ordenador.

25 Los anticuerpos monoclonales (MAb) se pueden preparar por uno de los varios procedimientos disponibles para un experto en la técnica, por ejemplo, mediante la fusión de células productoras de anticuerpos con células inmortalizadas y haciendo de este modo un hibridoma. La metodología general para la fusión de células productoras de anticuerpos B a una línea celular inmortal está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. Otro ejemplo es la generación de anticuerpos monoclonales a partir de RNAm extraídos de la médula ósea y células de bazo de animales inmunizados usando tecnología de biblioteca de anticuerpos combinatoria. Un inconveniente de los MAb derivados de animales o de líneas celulares derivadas es que a pesar de que se pueden administrar a un paciente para fines de diagnóstico o terapéuticos, a menudo son reconocidas como antígenos extraños por el sistema inmunitario y no son adecuados para su uso continuado. Los anticuerpos que no son reconocidos como antígenos extraños por el sistema inmune humano tienen un mayor potencial para el diagnóstico y el tratamiento. Los métodos para generar anticuerpos humanos y humanizados son ahora bien conocidos en la técnica.

35 Los anticuerpos se pueden originar por ejemplo, a partir de un ratón, rata o de cualquier otro mamífero. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humano que se puede obtener, por ejemplo, de un mamífero transgénico no humano capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humanizado que puede comprender, por ejemplo, una o más regiones determinantes de complementariedad de origen no humano. También puede comprender un residuo de la superficie de un anticuerpo humano y/o regiones marco de un anticuerpo humano. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico que puede comprender, por ejemplo, los dominios variables de un anticuerpo no humano y dominios constantes de un anticuerpo humano. Los anticuerpos adecuados pueden incluir también, por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno, un fragmento Fab; un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, y el fragmento Fv; o un anticuerpo de cadena única que comprende un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, una única cadena Fv). Un anticuerpo abarcado en la presente invención puede ser un anticuerpo de unión específica a TMEM149. En una realización, un anticuerpo abarcado en la presente invención puede ser un anticuerpo de una unión específica a IGFL.

50 Los agentes anti-TMEM149 (por ejemplo anticuerpos) pueden analizarse experimentalmente y validarse utilizando ensayos in vivo e in vitro. Los ensayos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ensayos de actividad y ensayos de unión. Por ejemplo, los ensayos para probar una actividad IGFL para TMEM149 incluye ensayos de proliferación de células T.

55 La actividad de una interacción IGFL con TMEM149 puede, entre otros medios, medirse mediante los métodos siguientes:

60 Ensayos adecuados para la citotoxicidad de timocitos o de esplenocitos incluye, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Ed por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley Interscience (Capítulo 3, Ensayos in vitro para la función de linfocitos de ratón 3.1-3.19; Capítulo 7, estudios inmunológicos en humanos); Herrmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 2488-2492 (1981); Herrmann, et al., *J. Immunol.* 128: 1968-1974 (1982); Handa, et al., *J. Immunol.* 135: 1564-1572 (1985); Takai, et al., *J. Immunol.* 137: 3494 hasta 3500 (1986); Takai, et al., *J. Immunol.* 140: 508-512 (1988); . Bowman, et al., *J. Virology* 61: 1992-1998; Bertagnolli, et al., *Cellular Immunology* 133: 327-341 (1991); Brown, et al., *J. Immunol.* 153: 3079-3092 (1994).

65 Los ensayos para células T dependientes de respuestas de inmunoglobulina y cambio de isotipo (que identificarán, entre otros, proteínas que modulan las respuestas de anticuerpos dependientes de células T y que afectan los

perfiles Th1/Th2) incluyen, sin limitación, los descritos en: Maliszewski, J. *Immunol.* 144: 3028-3033 (1990); y ensayos para la función de las células B: producción de anticuerpos in vitro, Mond, J. J. y Brunswick, M. en *Current Protocols in Immunology*. J. E. E. A. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

5 Los ensayos de reacción mixta de linfocitos (MLR) (que identificarán, entre otras, las proteínas que generan predominantemente respuestas Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, editado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, pub. Greene Publishing Associates y Wiley Interscience (Capítulo 3, ensayos in vitro para la función de los linfocitos de ratón 3.1 a 3.19; Capítulo 7, estudios inmunológicos en humanos); Takai, et al., *J. Immunol.* 137: 3494-3500 (1986); Takai, et al., *J. Immunol.* 140: 508-512 (1988); Bertagnolli, et al., *J. Immunol.* 149: 3778-3783 (1992).

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

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

20 Los ensayos para proteínas que influyen en los primeros estadios de compromiso y el desarrollo de las células T incluyen, sin limitación, los descritos en: Antica et al., *Blood* 84: 111-117 (1994); Fine, et al., *Cell. Immunol.* 155: 111-122, (1994); Galy, et al., *Blood* 85: 2770-2778 (1995); Toki, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88: 7548-7551 (1991).

25 Los ensayos para proteínas que influyen en los primeros estadios de compromiso y el desarrollo de las células T incluyen, sin limitación, los descritos en: Antica et al., *Blood* 84: 111-117 (1994); Fine, et al., *Cell. Immunol.* 155: 111-122, (1994); Galy, et al., *Blood* 85: 2770-2778 (1995); Toki, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88: 7548-7551 (1991).

30 Tal como se utiliza aquí, el término "bloquea" o "inhibe" se refiere a una disminución en una o más actividad medible en al menos un 10% respecto a una referencia y/o control. Cuando se desea la inhibición, tal inhibición es preferiblemente de al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, hasta el 100%, es decir, la inhibición completa o ausencia de la actividad determinada. Tal como se utiliza aquí, el término "inhibe/bloquea sustancialmente" se refiere a una disminución en una actividad medible determinada en al menos 50% con respecto a una referencia. Por ejemplo, "inhibe sustancialmente" se refiere a una disminución en una actividad medible determinada de al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% y hasta un 100% con respecto a una referencia. Como se usa en este documento, "bloquea/impide/inhibe/menoscaba/reduce la interacción", con referencia a la unión de un IGFL que se une a TMEM149 se refiere a una disminución en la unión en al menos un 10% con respecto a una referencia. Un agente puede bloquear la unión de un IGFL a células que expresan TMEM149. "Inhibe la interacción" y/o "bloquea la unión" se refiere preferentemente a una disminución en la unión de al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, hasta e incluyendo el 100%.

35 Una "composición" de la invención puede fabricarse de una manera convencional. En particular, se formula con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua o una solución salina tal como solución salina de tampón fosfato. En general, un diluyente o vehículo se selecciona sobre la base del modo y vía de administración, así como la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, puede ser preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Por otra parte, un anticuerpo monoclonal de la invención o una parte de unión a antígeno del mismo se pueden administrar en una formulación de liberación en el tiempo, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los agentes activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el agente contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos poliglicólicos (PLG). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. La presente invención se refiere a composiciones que pueden comprender un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, caracterizado porque el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149 capaz de modular la actividad IGFL y un farmacológicamente vehículo aceptable. En una realización, tales composiciones incluyen un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, caracterizado porque

el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149 para tratar una enfermedad relacionada con IGFL (por ejemplo una enfermedad inmune y/o inflamatoria relacionada).

5 Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o excipiente incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. En una realización, el vehículo es adecuado para administración parenteral. Alternativamente, el portador puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, sublingual u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen 10 soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional es incompatible con el agente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

15 La "administración" de una composición se puede realizar mediante cualquier ruta adecuada. Tales rutas pueden incluir la ruta parenteral, pulmonar, nasal y/u oral. En una realización, la composición farmacéutica puede ser intramuscular (IM), subcutánea (SC), intradérmica (ID), intravenosa (IV) y/o intraperitoneal (IP) utilizando cualquier medio adecuado.

20 El término "cantidad eficaz" pretende significar una cantidad de un agente suficiente para bloquear sustancialmente la interacción entre un IGFL y TMEM149. Una cantidad eficaz también puede abarcar cualquiera de los dos "cantidad terapéuticamente eficaz" y/o "cantidad profilácticamente eficaz". Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado, tal como una reducción en la progresión de la enfermedad y/o alivio de los síntomas asociados 25 con una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz de los moduladores de una actividad IGFL puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del agente para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado, tal como prevenir y/o inhibir (reducir) la velocidad de aparición de la enfermedad o la progresión. Una cantidad profilácticamente eficaz puede determinarse como se ha descrito anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz. Para cualquier individuo particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de 35 la persona administradora de las composiciones.

Durante la inflamación, diversas moléculas puede ser secretadas por las células. Tales moléculas pueden referirse como "mediadores inflamatorios". Como se apreciará por un experto en la técnica, estos mediadores inflamatorios pueden ser, por ejemplo y sin limitación, aminas, eicosanoides, factores de crecimiento, las especies reactivas al 40 oxígeno, enzimas (por ejemplo, una proteinasa), quimiocinas, citoquinas, etc.

Un método para identificar un compuesto capaz de bloquear la interacción entre un IGFL y TMEM149 puede comprender la medición de la unión de un IGFL a TMEM149 en presencia frente a la ausencia de un agente, en el que una menor unión de un IGFL a TMEM149 en presencia del agente puede ser indicativo de que el agente es 45 capaz de bloquear la interacción entre un IGFL y TMEM149.

Los métodos para identificar un compuesto (método de cribado) mencionados en este documento pueden emplearse ya sea con un compuesto de prueba única o una pluralidad o la biblioteca (por ejemplo, una biblioteca combinatoria) de los compuestos de ensayo. En este último caso, los efectos sinérgicos proporcionados por las combinaciones de 50 compuestos también pueden ser identificados y caracterizados.

La medición de la unión de un IGFL a TMEM149 puede realizarse usando (sin limitación) los ensayos adecuados de este tipo como comparaciones cuantitativas que comparan constantes de unión en equilibrio y cinéticas. La tasa de asociación cinética ( $k_{on}$ ) y la tasa de disociación ( $k_{off}$ ), y las constantes de unión en equilibrio ( $K_d$ ) se pueden 55 determinar usando resonancia de plasmón superficial en un instrumento BIAcore™ siguiendo el procedimiento estándar en la literatura. Las propiedades de unión de estas interacciones también pueden ser evaluadas mediante citometría de flujo y/o por ensayo de unión en fase sólida.

La presente invención también se refiere a un método de identificación de un compuesto capaz de bloquear la interacción entre un IGFL y TMEM149; el procedimiento puede comprender la medición de una actividad TMEM149 60 mediada por IGFL en presencia o ausencia del agente, en el que una actividad TMEM149 inferior en presencia del agente puede ser indicativa de que el agente bloquea la interacción entre un IGFL y TMEM149, en el que dicho actividad TMEM149 mediada por IGFL1 se selecciona del grupo que consiste en la producción de un mediador inflamatorio y el reclutamiento por citoesqueleto.

65 Tal como se usa en el presente documento, "una actividad mediada por un IGFL" o "una actividad TMEM149

mediada por IGFL" es una actividad que involucra o resulta de la unión de un IGFL a TMEM149, e incluye, pero no se limita a, la unión a TMEM149, la inducción de células T para producir y secretar citoquinas (por ejemplo IL-2, IL-10, IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ ), la síntesis de moléculas inflamatorias (mediadores de la inflamación), tales como IL-6, IL-8 y metaloproteinasas y la proliferación de células T (o inhibición de las mismas), etc. Se entenderá que la actividad mediada por IGFL puede depender de IGFL específico, por ejemplo, IGFL1 o IGFL3, siendo evaluados.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto capaz de inhibir o disminuir la inflamación; el procedimiento puede comprender la medición de la unión de IGFL1 a TMEM149 en presencia frente a la ausencia del agente. A menor unión de un IGFL1 a TMEM149 en presencia del agente puede ser indicativo de que el agente es capaz de inhibir o disminuir la inflamación.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto capaz de inhibir o disminuir la inflamación; el procedimiento puede comprender la medición de una actividad TMEM149 mediada por IGFL en presencia frente a la ausencia del agente, en el que una actividad TMEM149 inferior en presencia del agente puede ser indicativa de que el agente es capaz de inhibir o disminuir la inflamación.

En diversas realizaciones, un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, que se caracteriza porque el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149 puede ser utilizado terapéuticamente en formulaciones o medicamentos para prevenir o tratar trastornos relacionados con IGFL. Los trastornos relacionados con IGFL generalmente se relacionan con diversas enfermedades/condiciones inmunomediadas y/o relacionados con la inflamación. Los moduladores de una actividad IGFL pueden encontrar uso en condiciones de enfermedad para la que el antagonismo de la activación de células inmunes, y más particularmente una activación inmune mediada por IGFL1, es deseable, incluyendo una variedad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a: el lupus eritematoso sistémico (LES), artritis, psoriasis, esclerosis múltiple, encefalitis alérgica, enfermedad de Crohn, diabetes, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin (NHL), insuficiencia renal crónica, síndrome nefrótico, tiroiditis de Hashimoto, anemia de células falciformes, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Hodgkin, vasculitis reumatoide, leucemia linfocítica crónica, miastenia grave, preeclampsia y afecciones cardiovasculares incluyendo aterosclerosis, trombocitopenia (Purpura) y trombosis. Los agentes de bloqueo pueden encontrar uso particular en la psoriasis.

En la descripción experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar);  $\mu$ M (micromolar); N (normal); mol (moles); mmol (milimoles);  $\mu$ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos);  $\mu$ g (microgramos); L (litros); ml (mililitros);  $\mu$ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros);  $\mu$ m (micrómetros); nm (nanómetros);  $^{\circ}$ C (grados centígrados); h (horas); min (minutos); seg (segundos); ms (milisegundos); SDS-PAGE (dodecil sulfato de sodio - electroforesis en gel de poliacrilamida); CRD (dominio rico en cisteína); ECD (dominio extracelular); HVEM (mediador de entrada del virus del herpes); IGF (factor de crecimiento tipo insulina); IGFL (similares a IGF); NGFR (receptor de factor de crecimiento nervioso); NHEK (queratinocitos epidérmicos humanos normales); SPR (resonancia de plasmón de superficie); TNFR (receptor de TNF); RPL19 (proteína ribosomal L19);

## Ejemplos

Las células y los reactivos utilizados en los Ejemplos fueron los siguientes: los queratinocitos epidérmicos humanos normales neonatales fueron adquiridos de Lonza (Walkersville, MD), queratinocitos-SFM con suplementos eran de Invitrogen (Carlsbad, CA) y el colágeno IV se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todas las transfecciones se realizaron con Fugene 6 (Roche) según el protocolo de los fabricantes. El panel de RNA total de ratón de tejido adulto se adquirió de Zyagen (San Diego, CA). Las citoquinas humanas recombinantes eran de Peprotech (Rocky Hill, NJ). Los siguientes anticuerpos anti-ratón se utilizaron para la citometría de flujo: anti-B220, anti-CD3, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-DX5, anti-GR1, anti-NKG2D y anti-F4/80 todos de BD Biosciences (San Jose, CA), anticuerpo monoclonal anti-FLAG (M2) se adquirió de Sigma-Aldrich y se marcó con el equipo de marcaje de anticuerpos monoclonales Alexa Flour-647 de Invitrogen, y el anti-IgG1-PE de ratón era de Jackson Immunoresearch (West Grove, PENNSILVANIA).

### Ejemplo 1

#### Producción recombinante de IGFL y/o TMEM149

Este ejemplo ilustra la preparación de formas potencialmente glicosiladas de las proteínas IGFL o TMEM149 deseadas (cualquiera de las cuales se hace referencia en este ejemplo como una proteína deseada) mediante expresión recombinante en células de mamífero.

El vector, pRK5 (ver PE 307.247, publicado 15 de marzo 1989), se empleó como vector de expresión en todos los casos. Opcionalmente, el DNA que codifica la proteína deseada se ligó a pRK5 con enzimas de restricción seleccionados para permitir la inserción de dicho DNA usando procedimientos de ligación tal como se describe en

Sambrook et al., Supra. Las variantes de epítipo marcados de la proteína deseada también se pueden expresar en las células. El DNA que codifica la proteína deseada se ligó a pRK5 que contiene el marcaje de epítipo deseado (poli-His, FLAG, IgG<sub>1</sub> Fc humana) en el marco con el epítipo marcado deseado.

- 5 Los dominios extracelulares predichos de TMEM149 humano y de ratón se clonaron sin el dominio transmembrana en el vector pRK5 que contiene un IgG<sub>1</sub>-Fc humana o marcaje 8x-His en C-terminal, o con el dominio transmembrana en el vector pRK5 que contiene un marcaje GFP en C-terminal.

10 Las formas solubles de estas proteínas se producen en una transfección transitoria de células CHO y se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando gel de afinidad de agarosa anti-FLAG (M2) (Sigma-Aldrich) para las proteínas marcadas con FLAG, Ni-NTA agarosa (Qiagen) para proteínas marcadas 8x-His, o Sepharose proteína-A (Amersham Pharmacia) para proteínas de fusión IgG<sub>1</sub>-Fc. Las proteínas fueron separadas además de los agregados y los contaminantes con una columna Superdex 200 de filtración en gel y/o columnas de intercambio iónico MonoQ/S (Amersham). La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE seguido de tinción  
15 SimplyBlue (Invitrogen) y las proteínas purificadas se alicuotaron y se congelaron a -80 ° C hasta que se necesitaron.

20 Las células huésped seleccionadas pueden ser células HEK293T. Las células humanas 293 (ATCC CCL 1573) se hicieron crecer hasta 50-80% de confluencia en placas de cultivo de tejido en medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutrientes y/o antibióticos. Se introdujo 1 a 10 µg de DNA que codifica la proteína deseada ligada a pRK5 en células HEK293T utilizando reactivos de transfección disponibles comercialmente Superfect® (Qiagen), Lipofectamine® (Invitrogen) o Fugene® (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 18-24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retiró y se analizó en  
25 bioensayos seleccionados o células se recogió usando EDTA 10 mM en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 7,4, y se analizó en bioensayos seleccionados.

30 La expresión estable de TMEM149 se logró en células HEK293T mediante la clonación de DNA que codifica la proteína deseada en el vector pRK5 con un marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico Geneticina®. Para la expresión estable de las proteínas deseadas, se transfectaron las células como se describe y se dejaron crecer en DMEM con una concentración de Geneticina® que permite el crecimiento de las células en las que el vector deseado se había integrado en el genoma (1-0,5 µg/ml).

35 Las versiones marcadas de epítipo de la proteína deseada puede expresarse en células huésped CHO. Doce microgramos del DNA plasmídico deseado se introdujo en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección disponibles comercialmente Superfect® (Qiagen), Dospers®, Lipofectamine® (Invitrogen) o Fugene® (Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivan como se describe en Lucas et al. (Nucl Acids Res. (1996) 24:9 1774-1779). Aproximadamente 3x10<sup>7</sup> células se congelaron en una ampolla para su posterior crecimiento y producción tal como se describe a continuación.

40 Las ampollas que contienen el DNA plasmídico se descongelaron colocándolas en un baño de agua y se mezclaron mediante agitación con vórtex. Los contenidos se pipetearon en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 10 ml de medio selectivo (0,2 µm de PS20 filtrado con 5% de suero bovino fetal diafiltrado a 0,2 µm). Las células se dividen en alícuotas en un matraz de agitación de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1-2  
45 días, las células se transfieren a un matraz de agitación de 250 mL lleno con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incubaron a 37 °C. Después de otros 2-3 días, matraces de agitación de 250 ml, 500 ml y 2000 ml se sembraron con 30x10<sup>5</sup> células/ml. El medio celular se intercambió por medio fresco mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque se puede emplear cualquier medio CHO adecuado, se utilizó un medio de producción descrito en la patente de EE.UU. N° 5.122.469, depositada el 16 de Junio de 1992. Un matraz de agitación de producción de 3L se sembró a 1,2x10<sup>6</sup> células/ml. En el día 0, se determinó el número de células y el pH. En el día 1, el matraz de agitación se muestrea y se burbujea con aire filtrado. En el día 2, el matraz de agitación se muestrea, la temperatura cambió a 33 °C, y se toman 30 ml de 500 g/L de glucosa y 0,6 ml de antiespumante al 10% (por ejemplo, 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). A lo largo de la producción, se ajustó el pH para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Después de 10 días, o hasta que la  
50 viabilidad cayó por debajo de 70%, el cultivo celular se recogió mediante centrifugación y filtrado a través de un filtro de 0,22 µm. El filtrado se almacenó a 4 °C o se cargó inmediatamente en columnas para la purificación.

55 Para las construcciones marcadas con poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombeó en una columna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada a 4 °C, en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. Después de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrado adicional y la proteína se eluyó con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. A continuación, la proteína purificada se pasó sobre una columna de filtración en gel Superdex S200 y/o una columna de intercambio iónico MonoQ/S (Applied Biosystems) para eliminar la proteína agregada o  
60 proteolizada o cualquier contaminante y, posteriormente, se concentró y se dializó en PBS. La homogeneidad se evaluó mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminal mediante

degradación de Edman. Las proteínas se almacenaron a -80 °C hasta que se usaron en los bioensayos.

Para las construcciones de epítipo marcados con FLAG, las proteínas se purifican utilizando una columna de agarosa anti-FLAG (M2) (Sigma). El medio acondicionado se bombeó sobre una columna de 6 ml anti-FLAG equilibrada a 4 °C con tampón de fosfato Na 20 mM, pH 7,4. Después de la carga, la columna se lavó extensamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se pasó posteriormente por cromatografía de exclusión por tamaño, se dializó, se analizó, y se almacenó como anteriormente para las proteínas marcadas con poli-His.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir de los medios acondicionados como sigue. El medio acondicionado se bombeó sobre una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón fosfato Na 20 mM, pH 7,4. Después de la carga, la columna se lavó extensamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se pasó posteriormente por una cromatografía de exclusión por tamaño, se dializó, se analizó, y se almacenó como anteriormente para las proteínas marcadas con poli-His.

#### Ejemplo 2

##### Generación de anticuerpos Anti-TMEM149

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos monoclonales para TMEM149.

Se inmunizaron ratones B6 mediante inyecciones repetidas en la almohadilla plantar de TMEM149-Fc humana recombinante o TMEM149-His de ratón resuspendidas en adyuvante monofosforil lípido A/ micolato de trehalosa (Corixa Corp., Seattle, WA). Tres días después del refuerzo final, los ganglios linfáticos y el bazo extraídos se fusionaron con células de mieloma SP2/0 (ATCC, Manassas, VA) utilizando el aparato Cyto pulse CEEF-50 (cyto pulse Sciences, Glen Burnie, MD). Después de 7-10 días se recogieron los clones de hibridoma individuales mediante ClonePix (Genetix, Reino Unido) y 2-3 días más tarde los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se seleccionaron por ELISA para la unión específica a TMEM149 murino o recombinante humano. Los hibridomas seleccionados fueron clonados por dilución limitante y los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo de hibridoma mediante cromatografía de afinidad.

#### Ejemplo 3

mIGFL es un homodímero

Este ejemplo ilustra que mIGFL recombinante es un homodímero unido por disulfuro.

El mIGFL-FLAG recombinante se expresa como se describió anteriormente y se purificó a partir de sobrenadantes de CHO. El mIGFL-FLAG expresado se pasó por un gel de SDS-PAGE en condiciones tanto reductoras como no reductoras (Figura 3). En condiciones no reductoras, mIGFL-FLAG migró como una banda principal a aproximadamente ~ 30 kDa, el doble del peso molecular predicho basado en su secuencia de aminoácidos. El paso de la proteína en condiciones reductoras causó que la banda se desplazase a aproximadamente 16 kDa, lo que indica que mIGFL recombinante es un homodímero unido por disulfuro.

#### Ejemplo 4

mIGFL es una citoquina soluble

Este ejemplo ilustra que mIGFL se produce probablemente como una proteína dimérica soluble secretada.

Para determinar si mIGFL puede ser producida como una proteína soluble in vivo, se utilizó un sistema de transfección basado en la inyección hidrodinámica en la vena de la cola para expresar un transgén mIGFL con epítipo marcado con FLAG en N-terminal. La técnica para expresar los genes exógenos en ratones mediante la inyección rápida de DNA disuelto en una solución salina igual a 8-12% del peso del cuerpo a través de la vena de la cola del animal fue adaptado de Liu et al. (Gene Ther. (1999). 6: 1258-1266). Para la expresión inducida por inyección hidrodinámica de mIGFL en la vena de la cola (HTV), los ratones Balb/c de 8-10 semanas de edad, fueron colocados bajo una lámpara de calor durante 5 minutos antes de la inyección para dilatar las venas de la cola. Los ratones se encerraron entonces en una cámara acrílica para permitir el acceso a sus colas y se inyectó en la vena de la cola durante 5-8 segundos 50 µg de pRK5 vacío o pRK5 con mIGFL marcado con FLAG en N-terminal en un volumen de solución de Ringer estéril igual a 10% del peso corporal del ratón. Los ratones se sangraron 6 horas después de las inyecciones y se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> a las 24 horas después de las inyecciones y se recogió sangre mediante punción ventricular.

Se detectó mIGFL en el suero por medio de ELISA tipo sándwich. Para capturar mIGFL, se recubrieron placas de 384 pocillos con mTMEM149-Fc durante la noche a 4 °C. Después de 3 lavados, las placas se bloquearon para la unión no específica con BSA al 0,5% en PBS durante 1 h. Las placas se lavaron de nuevo y se añadió a las placas suero de ratón diluido con tampón de ensayo 50% (PBS con 0,5% de BSA y 0,05% Tween 20) o una serie de diluciones de los estándares mIGFL-FLAG purificadas en tampón de ensayo con suero de ratón al 50%, se incubaron durante 2 horas a TA, y se lavaron 6 veces. Para detectar mIGFL-FLAG, las placas se incubaron con anti-FLAG-HRP conjugado con HRP, se lavaron y se incubaron con solución de sustrato Moss para el desarrollo. La reacción se paró después con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y las placas se leyeron a 450/650 nM.

mIGFL-FLAG se detectó mediante ELISA en el suero de los ratones inyectados con el transgén mIGFL, pero no se pudo detectar el vector control, tan pronto como 6 horas después de la inyección y persistió en el suero durante al menos 24 horas (Figura 4).

#### Ejemplo 5

mIGFL se sobregula en la piel con inflamación

Este ejemplo ilustra que mIGFL está más altamente expresado en la piel y su expresión se potencia durante la inflamación.

Se determinó la distribución tisular de la expresión de mIGFL por RT-PCR en un panel de tejidos normales de ratón y se encontró que el RNAm de mIGFL tenía alta expresión relativa en la piel (Figura 5). Los niveles más bajos de las transcripciones mIGFL también eran detectables en el colon, timo, glándula mamaria, los ganglios linfáticos y pulmón. Ya que mIGFL se expresa predominantemente en la piel, hemos probado si la expresión mIGFL podría estar regulada por estímulos inflamatorios en la piel.

Imiquimod es un agonista de TLR7/8 que se puede aplicar por vía tópica para inducir lesiones en la piel que comparten muchas de las características fenotípicas y características histológicas de la psoriasis, incluyendo alteraciones epidérmicas, tales como acantosis, una infiltración inflamatoria que incluye las células T, neutrófilos y células dendríticas y neoangiogénesis (van der Fits et al. (2009) J. Immunol. 182: 5836-45).

El modelo similar a la psoriasis inducida por imiquimod se llevó a cabo en ratones C57B/6 de 8-12 semanas de edad (Charles River). Tres días antes del tratamiento, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y el pelo en sus cuartos traseros se eliminó con crema depilatoria. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y se administró diariamente 62,5 mg de crema de imiquimod sobre al lomo afeitado y en la oreja derecha. El grosor de la oreja se monitorizó y se valoraron los ratones para detectar signos clínicos de inflamación cada dos días de acuerdo a la siguiente escala: 0 = sin enfermedad; 1 = eritema muy suave con un engrosamiento muy leve y descamación que implica un área pequeña; 2 = eritema leve con engrosamiento leve y descamación (irregular y desigual) que implica un área pequeña; 3 = eritema moderado con engrosamiento moderado y escalado (irregular y desigual) que involucra un área moderada; 4 = eritema severo con marcado engrosamiento y descamación (irregular y desigual) que involucra un área grande. Un día después del último tratamiento con imiquimod, los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub> y la piel que cubre el área tratada se recogió para la purificación de RNA.

En ratones B6, las alteraciones inflamatorias alcanzaron su punto máximo después de cinco días de aplicación diaria de imiquimod (Figura 6A y 6B). El RNA de la piel aislada en el día cinco de los ratones tratados con imiquimod tenía niveles de mIGFL que se incrementaron 35 veces más que en la piel no tratada tal como se analizó por RT-PCR (Figura 7A). Los niveles de mIGFL volvieron a la normalidad al día 8, a medida que la inflamación se resolvía (no mostrado).

#### Ejemplo 6

mIGFL se sobregula en la piel herida

El siguiente ejemplo demuestra que mIGFL está más altamente expresado en la piel y su expresión se potencia durante la lesión.

Los ensayos de heridas en la piel fueron llevados a cabo en ratones B6 de 8-10 semanas de edad. Brevemente, los ratones se pusieron bajo anestesia leve y, usando condiciones estériles, se afeitó la región dorsal de los ratones, se eliminó el exceso de pelo con loción de depilación, y la región se preparó con betadine seguido por alcohol. Entonces se perforó y extrajo una zona de 6 mm de diámetro de grosor la piel en la línea media entre la escápula y un marco de silicona de 0,5 mm con de 10 a 12 mm de diámetro se colocó alrededor de cada herida, que después se cubrió. Los apósitos se cambiaron cada dos días. Los ratones se sacrificaron 7 días después de la herida y la piel de la zona de la herida se recogió para la purificación del RNA.

Los niveles de RNA se determinaron utilizando cebadores y sondas mIGFL adquiridos de Applied Biosystems, Inc., miembro de Life Sciences, Carlsbad, CA.

Los niveles de RNAm de mIGFL aumentaron en muestras de piel tomadas de la curación de las heridas de la piel dorsal (Figura 7B).

Ejemplo 7

mTMEM149 está altamente expresado en células T de ratón

Este ejemplo ilustra la distribución tisular de mTMEM149 usando RT-PCR en el RNA aislado a partir de ratones normales.

El RNA total fue purificado utilizando RNeasy (células) de Qiagen (Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes con DNasa Digest. Se realizó una RT-PCR en un solo paso en 25 o 50 ng de RNA total usando TaqMan Gold con el equipo de Tampón A en un sistema Mx3000P Stratagene (La Jolla, CA). Se determinó el número de copias de mTMEM149 en el panel de tejido de ratón utilizando una serie de diluciones de cDNA de mTMEM149 y luego se normalizó al nivel medio de expresión de todos los tejidos examinados. Mediante la RT-PCR realizada sobre los leucocitos, los resultados se normalizaron al gen de mantenimiento RPL19 utilizando el método comparativo  $C_t$ . Los cebadores y sondas de mTMEM 149 fueron:

Directo GCCCTGATTGAGATGGTTGT  
 Reverso CCAAATATGTGCCGAATTGA  
 Sonda CAGAGTAGCAGAAGGCTCCCTTGCC

El RNA de mTMEM149 se expresa de forma ubicua en todo el panel de tejido, con los niveles más altos de expresión observados en el ganglio linfático (Figura 8).

También se encontró que los niveles de expresión de TMEM149 de ratón no estaba alterado en los modelos de psoriasis (Figura 9).

Para analizar más de cerca el patrón de expresión de mTMEM149 dentro del sistema inmunológico, se analizaron los RNA de poblaciones de leucocitos clasificados de bazos de ratones y se encontró que mTMEM149 estaba más altamente expresado en células T y monocitos, aunque se expresó en todos los tipos de células analizadas (Figura 10). La tinción de anticuerpos de leucocitos confirmó la expresión de superficie de mTMEM149 en las células T, pero no en otros leucocitos examinados o en células T de ratones knockout de mTMEM-149 (Figuras 11A, 11B y 12A-C).

También enfrentamos la tinción de la superficie de las células T anti-mTMEM149 con mTMEM149-His recombinante soluble. Estos resultados indican que las células T de ratón podrían ser la población de células diana para mIGFL producida en la piel.

Ejemplo 8

Perfil de expresión de TMEM149 humano

Este ejemplo ilustra el perfil de expresión de TMEM149 humano.

El RNA total de tejidos humanos normales se obtuvieron de Clontech (Mt. View, CA). Se obtuvo el RNA total a partir de poblaciones de leucocitos humanos utilizando RNeasy (células) de Qiagen (Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes con DNasa Digest. Todo el RNA se diluyó a 10 ng/ml en agua libre de RNAasa. Se realizó RT-PCR en un solo paso en 25 a 50 ng de RNA total usando TaqMan Gold con equipo de Tampón A en un sistema Mx3000P Stratagene (La Jolla, CA). Los niveles relativos de expresión de TMEM149 humana Se determinaron mediante la normalización al gen de mantenimiento RPL19 utilizando el método comparativo  $C_t$ . Los cebadores y sondas de TMEM 149 fueron:

Directo ATGGCCCATGGCACTACT  
 Reverso TCAGCGAATAGGCAAAGGT  
 Sonda CAGCAGGCAGCCCATATCTTGC

El RNA para TMEM149 se expresa de forma ubicua en todo el panel de tejido, con los niveles más altos de expresión observados en el hígado, el hígado fetal y tejidos linfoides (Figura 13A).

También se encontró que el nivel de expresión de TMEM149 humano no se alteró en las muestras de los pacientes con psoriasis en comparación con los controles normales (Figura 13C).

Para analizar más de cerca el patrón de expresión de TMEM149 humano dentro del sistema inmunológico, se analizó el RNA a partir de leucocitos clasificados de sangre periférica humana y se encontró que TMEM149 humana estaba más altamente expresado en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC), macrófagos, y células

dendríticas mieloides (MDC), a pesar que el RNA para TMEM149 humano fue detectable en todos los tipos de células analizadas (Figura 13B).

5 Para la citometría de flujo, las células se lavaron y se tiñeron en PBS que contenía 2% de BSA y  $\text{NaN}_3$  0,1 mM, y se mantuvo a 4 °C durante todo el procedimiento. Se utilizaron células HEK293T transfectadas de manera estable con TMEM149 humano marcado con GFP como un control positivo. Los leucocitos de sangre periférica humanos primarios se purificaron por centrifugación a través de un gradiente de ficoll (GE Lifesciences, Piscataway, NJ). MDDC se maduró de leucocitos de sangre periférica purificadas CD14+ por separación magnética de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Miltenyi, Auburn, CA) durante una semana en 100 ng/ml de GM-CSF y 6,7 ng/ml de IL-4  
10 (Peprotech, Rock Hill, NJ). La unión de anticuerpo no específica se bloqueó con un anticuerpo anti-receptor de Fc. Las células fueron incubadas con anti-TMEM149 humano en presencia o ausencia de TMEM149 humana recombinante marcada con His, se lavaron y después se incubaron con un anticuerpo anti-IgG-PE de ratón o anticuerpo secundario marcado con APC (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Las células se marcaron a continuación con anticuerpos específicos de linaje marcados fluorescentemente: CD3, CD4, y CD8 para poblaciones  
15 de células T, B220 para las células B, DX5 para las células NK, CD11c para mDC, y CD14 para monocitos (BD Biosciences, San Jose, CA), y se analizaron por FACS.

La tinción de leucocitos con anticuerpos indicó que TMEM149 humano se expresa en la superficie de todos los tipos de células analizadas (Figura 14). También podríamos comparar la tinción de la superficie con anti-TMEM149 humano de todos los tipos de células con TMEM149-His recombinante soluble humana.  
20

Estos resultados indican que todas las poblaciones de leucocitos humanos podrían ser poblaciones de células diana para IGFL1.

#### 25 Ejemplo 9

caracterización de IGFL humana

Este ejemplo caracteriza a los diversos miembros de la familia IGFL.  
30

IGFL1 humana se expresó en células CHO y se purificó como se ha descrito anteriormente. IGFL1-FLAG expresado se pasó por un gel de SDS-PAGE en condiciones tanto reductoras como no reductoras (Figura 15A). En condiciones no reductoras, IGFL1-FLAG migró como una banda principal a aproximadamente ~36 kDa, doblando el peso molecular predicho de 9,7 kDa basado en su secuencia de aminoácidos. El paso de la proteína en condiciones reductoras causó el desplazamiento de la banda a ~ 18 kDa, lo que indica que IGFL1 recombinante es un homodímero unido por disulfuro.  
35

Se expresó cada uno de IGFL2, IGFL3 e IGFL4 como homodímeros, también cuando se expresan en células CHO. (Figura 15B-D).  
40

Además, IGFL1 parecía ser más grande que mIGFL. Esto puede deberse a la glicosilación. Con el fin de confirmar que los miembros IGFL están glicosilados los polipéptidos fueron tratados con una glicosidasa (PNGasa F; New England Biolabs, Ipswich, MA) y se pasaron por un gel de SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la Figura 16.  
45

#### Ejemplo 10

Unión de IGFL1 a TMEM149

Este ejemplo ilustra la unión de IGFL1 a TMEM149.  
50

Para identificar una pareja de unión para IGFL1, se analizó un microarray de proteínas que contiene ~700 proteínas únicas mayoritariamente humanas que están secretadas o tienen dominios transmembrana (Clark, et al. 2003. Genome Res. 13: 2265-70; Ramani et al., Identifying Extracellular Protein Interactions using a Secreted Protein Microarray Platform.) e identificado el mejor como TMEM149 (Figura 17A).  
55

Las proteínas de la biblioteca Genentech SPDI (Clark, et al. 2003, supra) fueron impresas y se inmovilizaron por duplicado en portaobjetos derivados de epoxi (Schott, Elmsford, NY), utilizando un microarrayer NanoPrint (Arrayit). Los portaobjetos se bloquearon en leche 5% PBST y se tiñó con IGFL-1 marcado con Cy-5 o TMEM149-Fc durante 20 min. (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) seguido de lavados 3 x 5 min. con PBST, utilizando una estación de hibridación A-Hyb (Miltenyi, Auburn, CA). Se midió la intensidad de fluorescencia a 635 nm menos la señal de fondo local para cada proteína y las puntuaciones se normalizaron por la intensidad media sobre todo el portaobjetos.  
60

En un cribado inverso, TMEM149 solo se unió a 5 preparaciones de proteínas individuales de IGFL1 en la biblioteca (Figura 17B). El gen TMEM149 codifica una proteína transmembrana de tipo 1a que se conserva en las especies de mamíferos y peces. La homología de secuencia entre las especies de mamíferos fue moderada en el dominio extracelular que contenía 12 cisteínas conservadas entre humanos, macacos, ratones, y ratas (Figura 17C).  
65

También había una región altamente conservada de ~ 100 aminoácidos en el dominio citoplásmico predicho, con una identidad entre 75% -99% entre todas las especies analizadas.

Para caracterizar mejor la interacción entre TMEM149 e IGFL1, se analizó la unión de IGFL1 recombinante a las células HEK293T que expresan TMEM149 u otros miembros de la familia TNFR. Un anticuerpo generado contra el dominio extracelular de TMEM149 se utilizó para demostrar la expresión en superficie de TMEM149 en las células transitoriamente transfectadas (Figura 18A). A continuación, se analizó la capacidad de los IGFL1 recombinantes para interactuar con TMEM149 de superficie celular. Como mIGFL, la mayoría de IGFL1 humano recombinante parece ser un dímero unido por disulfuro (Figura 15A). Encontramos la unión específica de IGFL1 a células que expresan TMEM149, pero no los otros miembros de la familia TNFR del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) o DR4 (Figura 18B). Se observaron resultados similares para IGFL3 (Figura 20A).

Ejemplo 11

Miembros de la familia IGFL que se unen a TMEM149

Este ejemplo demuestra que TMEM149 se une a ciertos miembros de la familia IGFL.

Para determinar la afinidad de IGFL con TMEM149, los ligandos se yodaron con  $^{125}\text{I}$  utilizando el método de la lactoperoxidasa y el  $^{125}\text{I}$ -Na libre se retiró de la proteína marcada por filtración en gel utilizando una columna NAP-5. Mezclas de reacción competitivas de 50  $\mu\text{l}$  que contienen una concentración fija de ligando yodado y concentraciones decrecientes diluidas en serie de ligando no marcado se colocaron en placas de 96 pocillos por triplicado. En cada pocillo, se añadieron células HEK293T que expresan establemente TMEM149 humano o de ratón a una densidad de 100.000 células en 0,2 ml de tampón de unión (medio Eagle modificado por Dulbecco con 1% de albúmina de suero bovino, 50 mM HEPES pH 7,2 y azida de sodio 2 mM). La concentración final del ligando yodado con células en cada reacción de competición fue de 100 pM (100.000 cpm por 0,25 ml). La concentración final del ligando no marcado con las células de la reacción de competición varió, a partir de 500 nM y luego disminuyó de 1 a 2 veces la dilución de diez concentraciones, e incluyó una muestra de tampón solo. Las reacciones de competición se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, después se transfirió a una placa de filtro Millipore Multiscreen (Billerica, MA) y se lavaron 4 veces con tampón de unión para separar el anticuerpo yodado libre del unido. Los filtros se contaron en un contador gamma 1470 Asistente Wallac (PerkinElmer Life y Analytical Sciences Inc.; Wellesley, MA). Los datos de unión se evaluaron usando el programa NewLigand (Genentech), que utiliza el algoritmo de ajuste de Munson y Robard para determinar la afinidad de unión del anticuerpo (Munson, P.J., y D. Rodbard. 1980. *Anal Biochem.* 107: 220-39).

Un ensayo de unión de radioligando realizado utilizando células que expresan IGFL1 y TMEM149 revelaron una interacción de alta afinidad con una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) de 0,31 nM (Figura 18C). Esta interacción también se analizó mediante SPR.

La resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizó en un BiaCore 3000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) a 25 °C utilizando anti-IgG F(ab')<sub>2</sub> humano acoplado a amina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a chips sensores BiaCore CM5. Para el análisis cinético de la interacción de proteínas, se capturaron primero las proteínas de fusión Fc a 25  $\mu\text{g/ml}$  en chips sensores mediante la inyección durante 3 min a 5  $\mu\text{l/min}$ . Entonces, las proteínas de ensayo se diluyeron a sus concentraciones indicadas en tampón HBS-P (Hepes 0,01 M, pH 7,4 NaCl 0,15 M surfactante P20 0,005%) se inyectaron durante 3 min a 30  $\mu\text{l/min}$ . La disociación en tampón HBS-P solo se midió entonces a una tasa de flujo de 30 ml/min. Las superficies de chips sensores se regeneraron mediante la inyección de glicina 10 mM pH 1,5 durante 30 s después de cada ciclo. Los parámetros cinéticos se determinaron ajustando los datos a un modelo 1:1 de Langmuir usando el programa de evaluación Biacore 3000 (GE Healthcare). Para el cribado de TNF, se compró EDA-A1, OX40L, FasL, 4-1 BBL, CD30L de R+D y GITRL, ApoL, RANKL, TNF $\alpha$ , APRIL, LT $\alpha$ , LT $\beta$ , TL1A, TNFSF14, TRAIL, C40L, BAFF, y CD27L de producción propia.

SPR resultó en una  $K_D$  de 1,2 nM (Figura 18D y 19A). Puesto que los otros miembros de la familia IGFL humano no estaban presentes en el microarray de proteínas, se utilizó SPR para determinar si interactúan con TMEM149 y se encontró que IGFL3 también se une estrechamente al receptor (Figura 19C). IGFL2 mostró una baja respuesta y una disociación rápida, mientras que IGFL4 no parece interactuar con TMEM149 (Figura 19B y 19D). Utilizamos SPR para determinar la afinidad para IGFL3 a TMEM149 y se encontró una  $K_D$  de 0,08 nM (Figura 20B).

Para determinar si esta interacción se conserva entre las especies, se analizó la capacidad de los mIGFL para interactuar con el ratón TMEM149 (mTMEM149). El uso de un anticuerpo dirigido contra mTMEM149, podríamos demostrar la expresión en superficie de mTMEM149 en las células transfectadas (Figura 21A). También mIGFL no era capaz de unirse específicamente a las células que expresan mTMEM149, pero no a NGFR o DR4 (Figura 21B). Se observó unión de mIGFL a mTMEM149 de alta afinidad a través de ensayo de unión de radioligando ( $K_D$  0,73 nM) y SPR ( $K_D$  0,15 nM) (Figura 21C y D).

Un análisis de la secuencia del ectodominio (ECD) de TMEM149 humano demostró homología de proteínas a la familia de TNFR (Zhang, 2004). El ECD de TNFR se compone de dominios ricos en cisteína (CRD) que pueden

dividirse además en subdominios modulares con registros conservados de cisteína, enlaces disulfuro, y estructuras generales (Naismith y Sprang, 1998). La alineación de la ECD de TMEM149 con estos módulos reveló que el primer CRD potencial fue similar a los módulos CRD A1-B2 que se observan comúnmente en otros miembros de la familia TNFR (Figura 22A y B). Un segundo CRD potencial en TMEM149 tiene similitud de secuencia con el módulo A2 (Figura 22C). Fue difícil determinar qué módulo CRD podría representar las últimas dos cisteínas, pero, aunque inconcluyente, el mapeo de disulfuros de TMEM149 recombinante reveló un enlace disulfuro entre estas dos cisteínas. Mediante el programa sensible de reconocimiento de plegamientos HHPred (Soding, 2005) encontramos que la estructura de TMEM149 está más estrechamente adaptada a la estructura de NGFR ECD humano. (Figura 22A). También se detectó un dominio de muerte (DD) en la secuencia citoplasmática conservada de TMEM149 humana a través del programa PROFIT, (Flockner, et al. 1995. *proteins* 23: 376-86). Las herramientas de reconocimiento de plegamiento HHPRED (Soding (2005), supra) e i-TASSER (Roy, et al. 2010. *Nat Protoc* 5: 725-38) se utilizaron para designar más precisamente el módulo DD en TMEM149. Los 23 principales resultados de una búsqueda de plegamiento por HHPRED por el dominio citoplásmico TMEM149 humano son uniformemente miembros de la familia DD (con una puntuación máxima de 97, y el valor de probabilidad adjunto de 99,3, E-valor de  $1,6 \times 10^{-13}$  y valor P de  $7,1 \times 10^{-18}$ ), lo que indica una coincidencia muy significativa. El uso de estructuras MyD88, Pelle y FADD como plantillas, se construyó un modelo en tres dimensiones teórica del dominio citoplásmico de TMEM149 (Figura 22B).

Ya que TMEM149 es un miembro de la familia TNFR no reconocido, se buscaron ligandos similares a TNF por la unión a través de TMEM149 SPR. No había unión significativa entre 18 miembros de la familia de TNF cribados y TMEM149 (no mostrado). Por lo tanto, hemos identificado positivamente una interacción proteína específica y de alta afinidad entre mIGFL/IGFL1 y TMEM149 con un DD citoplásmico putativo. Esta interacción no se ha descrito previamente.

#### Ejemplo 12

IGFL1 humano está sobrerregulado en la piel psoriásica

Este ejemplo ilustra la expresión de IGFL1 en los queratinocitos.

Como la identidad de secuencia entre mIGFL y los genes IGFL humanos es baja, no existe un ortólogo humano claro para mIGFL. Por lo tanto, hemos tratado de determinar si la expresión de cualquier gen IGFL humano fue alterado durante la inflamación de la piel.

Se realizaron microarrays de RNA en dos series de muestras de control normales y de pacientes con psoriasis. Las muestras de piel normal, piel psoriásica o la piel no lesionada adyacente se analizaron en HGU133A y HGU133B Genechips (Affymetrix, Santa Clara, CA) o chips de microarray WHG 44 x 44k (Agilent Technologies, Foster City, CA). Se utilizaron las siguientes sondas: 239430\_at para IGFL1, 231148\_at para IGFL2, y P\_A51261\_at para IGFL3 en chips de microarray HGU33 o HuGenen1 Affymetrix (n = 5 normal y n = 11 psoriasis/PSNE,  $\pm$ DE), y A\_23\_P119407 para IGFL4 en un microarray Agilent WHG 4 x 44k (n = 7 normal y n = 15 psoriasis/PSNE,  $\pm$ DE). Los valores de expresión se midieron por la intensidad de la señal de Affymetrix Microarray Analysis Suite versión 5 y las muestras se normalizaron además mediante el uso de normalización por Robust Multi-chip Average quantil.

En primer lugar, el análisis de microarrays de RNA de la piel aislado de la piel afectada o no afectada de los pacientes con psoriasis o controles normales reveló que IGFL1 se sobrerreguló en la piel afectada (Figura 24A). Una disminución en la expresión de IGFL2 también se asoció con la psoriasis, mientras que la expresión de IGFL3 y 4 no se alteró de manera significativa.

Para confirmar los datos de microarrays, se realizó RT-PCR con cebadores específicos para cada uno de los genes humanos IGFL en muestras de RNA de la piel de pacientes con psoriasis. El RNA total se purificó usando Qiagen (Valencia, CA) RNeasy Fibrous Tissue de acuerdo con el protocolo del fabricante con digestión de DNasa. Los conjuntos de cebador y sonda para IGFL2 y IGFL4 fueron adquiridos de ABI (Foster City, CA) y el cebador y sondas para IGFL1 y 3 fueron de síntesis propia. Se realizó RT-PCR Onestep sobre 25 o 50 ng de RNA total usando TaqMan Gold con equipo de Tampón A en un sistema Mx3000P Stratagene (La Jolla, CA). Para la RT-PCR realizada en la piel los resultados se normalizaron al gen de mantenimiento RPL19 utilizando el método comparativo Ct.

Una vez más, IGFL1 fue altamente regulada positivamente e IGFL2 regulada negativamente (Figura 24B), mientras que no hubo cambios significativos en los niveles de expresión de IGFL3 o 4. La hibridación in situ en muestras de piel psoriásica, utilizando una sonda para IGFL1 no reveló hibridación detectable de IGFL1 en la piel normal, mientras que en la piel psoriásica había una distribución irregular de hibridación IGFL1 en las células epiteliales (Figura 25). Por lo tanto, los niveles de expresión de IGFL1 y mIGFL se potenciaron de manera similar durante la inflamación de la piel y por lo tanto pueden representar ortólogos funcionales.

## Ejemplo 13

TNF $\alpha$  induce la expresión de IGFL1 en queratinocitos primarios en cultivo

- 5 Este ejemplo ilustra que TNF $\alpha$  producido en la lesión psoriásica podría contribuir a los niveles de expresión IGFL1 observados en la piel del paciente.

10 La piel psoriásica se caracteriza por hiperplasia epidérmica de queratinocitos y la infiltración de leucocitos y la activación. Tanto las poblaciones de leucocitos infiltrantes y de los queratinocitos son fuentes cruciales para la producción de factores que potencian esta inflamación tisular (Tonel y Conrad (2009) Int J Biochem Cell Biol. 41: 963-8).

15 Para identificar adicionalmente la fuente de IGFL1, se analizaron los niveles de expresión de RNAm mediante RT-PCR y se encontró que IGFL1 se expresó en queratinocitos primarios pero no en células mononucleares de sangre periférica (PBMC; no mostrado). Además, la activación de las PBMC humanas o esplenocitos de ratón por ConA, fitohemaglutanina, o lipopolisacárido no indujo expresión de IGFL1 o mIGFL (no mostrados).

20 Para hacerse una idea a la regulación de IGFL1 en la piel se utilizó queratinocitos humanos primarios en cultivo para determinar si alguna de las citoquinas que se sabe que juegan un papel importante en la psoriasis alteran la expresión de IGFL1. Los queratinocitos humanos primarios se cultivaron en queratinocitos-SFM complementado en matraces de cultivo de tejido recubiertos con 0,67  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de colágeno IV en una incubadora a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se sustituyó cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron un 70-80% de confluencia en ese momento las células se subcultivaron o se utilizaron para los experimentos. Para estimulaciones, se añadieron 3-5x10<sup>5</sup> células a placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos recubiertas de colágeno IV en 1 ml de queratinocitos-SFM y se dejaron adherir durante la noche. El día siguiente se añadieron citoquinas a una concentración final de 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 50 ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 ng/ml de IFN $\alpha$ , 40 ng/ml de IL-17A o 50 ng/ml de IL-22. Tras 6 h y 24 h se recogieron las células, se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C para la purificación de RNA. El tratamiento de queratinocitos cultivados con TNF $\alpha$  6 h dio como resultado una sobrerregulación de cinco veces de mIGFL que se mantuvo elevado después de 24 h de la estimulación (Figura 26). El tratamiento de las células con IL-1 $\beta$ , IFN $\alpha$ , IL-17A o IL-22 no indujo ningún cambio significativo en los niveles de RNAm de IGFL1.

30

## Ejemplo 14

Anti-TMEM149 bloquea la unión de hIGFL1

- 35 Este ejemplo ilustra que la unión de hIGFL1 a TMEM149 puede ser bloqueada por anticuerpos dirigidos contra TMEM149.

40 Este ensayo se realizó en células HEK293T transfectadas con DNA de TMEM149-GFP humano como se describe anteriormente. Las células se levantaron de las placas de 6 pocillos se transfectaron y se lavaron con tampón FACS (PBS con 2% de FBS y 0,1% NaN<sub>3</sub>). Las células fueron incubadas con anticuerpos anti-TMEM149 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o controles de isotipo durante 15 minutos a 4 °C. Entonces FLAG-IGFL1 se añadió a las células a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y se dejó incubar durante 30 min a 4 °C. A continuación, se lavaron los anticuerpos/IGFL1 con tampón FACS y se añadió el marcaje fluorescente anti-FLAG a las células para detectar la unión de IGFL1 durante 30 min a 4 °C. Después, las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo.

45

Los resultados indican que ciertos anticuerpos o impiden la unión de IGFL3 mediante competición directa o induciendo un cambio conformacional de tal manera que la IGFL3 ya no se une más. Ver Figura 27. Los clones 1 F11 y 4A7, fracasaron en el bloqueo de la unión o bloqueo parcial de la interacción.

50

## Ejemplo 15

Anti-TMEM149 afecta la unión sobre IGFL3

- 55 Este ejemplo ilustra que la unión de hIGFL3 a TMEM149 puede ser bloqueada por anticuerpos dirigidos contra TMEM149.

Este ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 14, anterior, excepto que se usó IGFL3 en lugar de IGFL1.

60 Véase la Figura 28. Los resultados indican que ciertos anticuerpos o bien impiden la unión de IGFL3 por competición directa o induciendo un cambio conformacional de tal manera que la IGFL3 ya no se puede unir. Los clones 1 F11 y 4A7 fracasaron en el bloqueo de la unión o bloqueo parcial de la interacción.

## Ejemplo 16

## Actividad estimuladora en ensayo de reacción de linfocitos mezclada (MLR)

5 Este ejemplo muestra que IGFL1 es activo como un estimulador de la proliferación de linfocitos T. Los compuestos que estimulan la proliferación de los linfocitos son terapéuticamente útiles cuando el aumento de una respuesta inmune es beneficiosa. Un agente terapéutico también puede adoptar la forma de antagonistas de IGFL1, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra el polipéptido, que se espera que inhiba la proliferación de linfocitos T.

10 El protocolo básico para este ensayo se describe en Current Protocols in Immunology, unidad 3.12; editado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons, Inc.

15 Más específicamente, en una variante de ensayo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de individuos mamíferos, por ejemplo, un voluntario humano, por leucoféresis (un donante suministrará PBMC estimuladores, el otro donante suministrará PBMC respondedores). Si se desea, las células se congelan en suero bovino fetal y DMSO tras el aislamiento. Las células congeladas pueden descongelarse durante la noche en medio de ensayo (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) y luego se lavaron y se resuspendieron a 3 x 10<sup>6</sup> células/ml de medio de ensayo (RPMI; suero bovino fetal al 10%, 1% de penicilina/estreptomocina, 1% glutamina, 1% HEPES, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato).

20 Las PBMC estimuladoras se preparan mediante la irradiación de las células (alrededor de 3000 Rads). El ensayo se prepara poniendo en los pocillos de una placa por triplicado una mezcla de: 100 µl de muestra de ensayo diluida al 1% o al 0,1%; 50 µl de células estimuladoras irradiadas y 50 µl de células PBMC respondedoras. 100 microlitros de medio de cultivo celular o 100 microlitros de CD4-IgG se utiliza como control. Los pocillos se incuban a continuación a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 días. En el día 5 cada pocillo se pulsó con timidina tritiada (1,0 µCi/pocillo; Amersham). Después de 6 horas las células se lavaron 3 veces y a continuación se evalúa la absorción del marcador

25 En otra variante de este ensayo, las PBMC se aíslan de los bazos de ratones Balb/c y ratones C57B6. Las células se probaron de bazos recién recogidos en medio de ensayo (RPMI; 10% de suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomocina, 1% de glutamina, 1% HEPES, aminoácidos no esenciales al 1%, 1% de piruvato) y las PBMC se aislaron mediante la superposición de estas células sobre Lympholyte M (Organon Teknika), centrifugando a 2000 rpm durante 20 minutos, recogiendo y lavando la capa de células mononucleares en medio de ensayo y resuspendiendo las células a 1 x 10<sup>7</sup> células/ml de medio de ensayo. El ensayo se lleva a cabo a continuación, como se describe anteriormente. IGFL1 a una concentración de 58,32 nM estimuló la proliferación de células T en un 230,1% en comparación con los controles. Los incrementos positivos sobre el control se consideran positivos con aumentos mayores o iguales a 180% preferiblemente. Sin embargo, cualquier valor mayor que el control indica un efecto estimulante para la proteína de prueba.

## Ejemplo 17

## Actividad inhibitoria en el ensayo de reacción de linfocitos mezclada (MLR)

45 Este ejemplo muestra que IGFL3 es activo como inhibidor de la proliferación de linfocitos T estimulados. Los compuestos que inhiben la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando la supresión de una respuesta inmune es beneficiosa.

50 El protocolo básico para este ensayo se describe en Current Protocols in Immunology, unidad 3.12; editado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons, Inc.

55 Más específicamente, en una variante de ensayo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de individuos mamíferos, por ejemplo, un voluntario humano, por leucoféresis (un donante suministrará PBMC estimuladores, el otro donante suministrará PBMC respondedores). Si se desea, las células se congelan en suero bovino fetal y DMSO tras el aislamiento. Las células congeladas pueden descongelarse durante la noche en medio de ensayo (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) y luego se lavaron y se resuspendieron a 3x10<sup>6</sup> células/ml de medio de ensayo (RPMI; suero bovino fetal al 10%, 1% de penicilina/estreptomocina, 1% de glutamina, 1% HEPES, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato). Los PBMC estimuladores son preparados por irradiación de las células (alrededor de 3000 Rads).

60 El ensayo se prepara poniendo en placas de pocillos por triplicado una mezcla de:  
 65 100:1 de muestra de ensayo diluida al 1% o al 0,1%,  
 50:1 de células estimuladoras irradiadas, y  
 50:1 de células PBMC respondedoras.

100 microlitros de medio de cultivo celular o 100 microlitros de CD4-IgG se utiliza como control. Los pocillos se incuban a continuación a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 días. En el día 5, cada pocillo se pulsa con timidina tritiada (1,0 µCi/pocillo; Amersham). Después de 6 horas las células se lavan 3 veces y a continuación se analiza la absorción de marcador.

En otra variante de este ensayo, las PBMC se aíslan de los bazos de ratones Balb/c y ratones C57B6. Las células se analizan de bazos recién recogidos en medio de ensayo (RPMI; 10% de suero bovino fetal, 1% penicilina /estreptomomicina, 1% de glutamina, 1% HEPES, aminoácidos no esenciales al 1%, 1% de piruvato) y las PBMC se aíslan mediante la superposición de estas células sobre Lympholyte M (Organon Teknika), centrifugando a 2000 rpm durante 20 minutos, recogiendo y lavando la capa de células mononucleares en medio de ensayo y resuspendiendo las células a 1x10<sup>7</sup> células/ml de medio de ensayo. Se lleva a cabo a continuación el ensayo como se ha descrito anteriormente.

Cualquier descenso por debajo del control se considera que es un resultado positivo para un compuesto inhibidor, con disminuciones inferiores o iguales a 80%, siendo preferido. Sin embargo, cualquier valor menor que el control indica un efecto inhibidor de la proteína de prueba. IGFL3 a una concentración de 244 nM inhibe la proliferación de células T en un 58,9% en comparación con el control.

#### Ejemplo 18

##### Inhibición de la proliferación de células T estimuladas

Este ejemplo ilustra que IGFL3 humano es activo como inhibidor de la estimulación de los linfocitos enriquecidos CD4<sup>+</sup>. Los compuestos que inhiben la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando la supresión de una respuesta inmune inflamatoria es beneficiosa. Este ensayo es una variación del ensayo de MLR anterior en la que el IGFL3 fue analizado por su efecto inhibidor sobre la coestimulación de los linfocitos enriquecidos CD4<sup>+</sup> tanto con anti-CD3 y anti-CD28. Se propone que la inhibición del efecto estimulador de la anti-CD3 y anti-CD28 en las PBMC se correlaciona con un efecto antiproliferativo en general similar a la participación del TCR con una señal coestimuladora.

El protocolo básico para el aislamiento de PBMC utilizado en este ensayo se describe en Current Protocols in Immunology, unidad 3.12; editado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons, Inc.

Más específicamente, en una variante de ensayo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aíslan de individuos mamíferos, por ejemplo, un voluntario humano, por leucoféresis. Las células se aíslan y se enriquecen mediante selección negativa. Si se desea, las células enriquecidas se congelan en 90% de suero bovino fetal y 10% de DMSO. Las células congeladas pueden descongelarse durante la noche en medio de ensayo (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) y luego se lavan y se resuspenden a 1x10<sup>6</sup> células/ml de medio de ensayo (RPMI; suero bovino fetal al 10%, 1% de penicilina/estreptomomicina, 1% de glutamina, 1% HEPES, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato).

El ensayo se prepara poniendo en placas de pocillos por triplicado una mezcla de:

100 µl de muestra de ensayo diluido a la concentración indicada

100 µl de células

50 µl de anti-CD3 (50 ng/ml, Amac 0178) y 50 µl anti-CD28 (100 ng/ml, Biodesign P42235M) se añaden a una placa de 96 pocillos para una capa durante la noche a 4 °C antes de la adición de las células y muestra de ensayo.

100 microlitros de tampón de control celular o 100 microlitros de Hu-IgG se utiliza como control en lugar de la muestra de ensayo.

Los pozos se incuban a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 días. En el día 4, cada pozo es pulsado con timidina tritiada (1,0 µCi/pocillo; Amersham). Después de 6 horas, la placa se recogió y a continuación se analizó la absorción del marcador.

Un resultado que muestra un efecto inhibidor (es decir, <sup>3</sup>[H]-timidina) inferior al 70% de lo observado en el control se considera que es un resultado positivo.

En otra variante de este ensayo, los esplenocitos CD4<sup>+</sup> se aíslan de los bazos de ratones Balb/c. Las células se analizan de bazos recién recogidos en medio de ensayo (RPMI; 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomomicina, 1% de glutamina, 1% HEPES, aminoácidos no esenciales al 1%, 1% de piruvato) y los esplenocitos son aislados mediante la superposición de estas células sobre Lympholyte M (Organon Teknika), centrifugando a 2000 rpm durante 20 minutos, recogiendo y lavando la capa de células mononucleares en medio de ensayo, selección negativa y resuspendiendo las células a 1x10<sup>7</sup> células/ml de medio de ensayo. Se lleva a cabo a continuación el ensayo como se ha descrito anteriormente.

IGFL3 humano a una concentración de 8,44 nM mostró un efecto inhibitor.

Ejemplo 19

5 Perfil de expresión de IGFL humana

Este ejemplo ilustra la distribución tisular de IGFL1 humano, IGFL2 e IGFL3 usando RT-PCR.

10 Se realizaron estos ensayos como se describe en el Ejemplo 8 usando el mismo panel de RNA de tejido humano normal, pero con los conjuntos específicos cebador/sonda para IGFL1, IGFL2 e IGFL3.

Los cebadores y sondas de IGFL1 fueron:

15 Directo CTAGAATTCTGGACAGCATGAGAT  
Reverso GTTGGCCATAGGGGTCAT  
Sonda CCCAGGGACTCTGAACCCTCCTG

Las sondas de IGFL2 se adquirieron de Applied Biosystems, Inc., miembro de Life Sciences, Carlsbad, CA.

20 Los cebadores y sondas de IGFL3 fueron:

25 Directo GCACGTCCTGTACCCATAAA  
Reverso AGTTCAACTGTAGTCTCCGATGTC  
Sonda CAGCTGCTTCGTCTTCTCCCCT

IGFL1 humano parece tener la expresión más alta en las amígdalas, riñones, testículos y timo. También había alguna expresión de IGFL1 evidente en retina, estómago, piel, vejiga y glándula mamaria, pero no en otros tejidos examinados. Véase la Figura 29.

30 IGFL2 humano parece tener la expresión más alta en los testículos y la piel, con un poco de expresión evidente en timo, próstata, cerebro y la médula espinal. Véase la Figura 30.

IGFL3 humano parece tener la expresión más alta en los testículos y el cerebro. Piel, riñón, médula espinal, retina, glándula mamaria y el timo también expresaron IGFL3. Véase la Figura 31.

35 Estos datos demuestran que en tejidos humanos normales, los miembros de la familia IGFL se expresan diferentemente. También se demuestra que la expresión de estos genes se limita a tejidos específicos y que todos los genes examinados de IGFL se expresan en la piel.

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC. et al.  
 <120> NUEVA INTERACCIÓN RECEPTOR-LIGANDO Y USOS DE LA MISMA  
 5 <130> P4549R1-WO  
 <141> 2011-12-01  
 <150> US 61/419,209  
 <151> 2010-02-12  
 <160> 33  
 10 <210> 1  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

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

15

ES 2 592 937 T3

Thr Pro Ser Ser Ser His Leu Ser Ser Pro Gly Ala Leu Glu Thr  
 215 220 225

Gly Asp Thr Trp Lys Glu Ala Ser Leu Leu Pro Leu Leu Ser Arg  
 230 235 240

Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg Leu Leu Asp  
 245 250 255

Glu Leu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp Pro Glu  
 260 265 270

Pro Gly Pro Gly Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His Leu  
 275 280 285

Ala Ala Arg Tyr Gly Leu Pro Ala Ala Trp Ser Thr Phe Ala Tyr  
 290 295 300

Ser Leu Arg Pro Ser Arg Ser Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met  
 305 310 315

Val Val Ala Arg Glu Pro Ser Ala Ser Leu Gly Gln Leu Gly Thr  
 320 325 330

His Leu Ala Gln Leu Gly Arg Ala Asp Ala Leu Arg Val Leu Ser  
 335 340 345

Lys Leu Gly Ser Ser Gly Val Cys Trp Ala  
 350 355

<210> 2  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

5

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Ala Pro Pro Pro Glu Ala  
 20

<210> 3  
 <211> 345  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 3

10

ES 2 592 937 T3

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

Ser Gly Ser Thr Ala Tyr Gly Thr Thr Arg His Leu Ala Ala Arg  
 275 280 285

Tyr Gly Leu Pro Ala Thr Trp Ser Thr Phe Ala Tyr Ser Leu Arg  
 290 295 300

Pro Ser Arg Ser Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met Val Val Ala  
 305 310 315

Arg Glu Pro Ser Ala Thr Leu Gly Gln Phe Gly Thr Tyr Leu Ala  
 320 325 330

Gln Leu Gly Arg Thr Asp Ala Leu Gln Val Leu Ser Lys Leu Gly  
 335 340 345

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 4

5 Met Gly Pro Ser Trp Leu Leu Trp Thr Val Ala Val Ala Val Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Thr Arg Ala Ala Ser  
 20

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 5

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

Leu Leu Thr Arg Ala  
 20

<210> 6  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

15 Met Ala Pro Arg Gly Cys Ile Val Ala Val Phe Ala Ile Phe Cys  
 1 5 10 15

Ile Ser Arg Leu Leu Cys Ser His Gly Ala Pro Val Ala Pro Met  
 20 25 30

Thr Pro Tyr Leu Met Leu Cys Gln Pro His Lys Arg Cys Gly Asp  
 35 40 45

Lys Phe Tyr Asp Pro Leu Gln His Cys Cys Tyr Asp Asp Ala Val  
 50 55 60

Val Pro Leu Ala Arg Thr Gln Thr Cys Gly Asn Cys Thr Phe Arg  
 65 70 75

Val Cys Phe Glu Gln Cys Cys Pro Trp Thr Phe Met Val Lys Leu  
 80 85 90

20

Ile Asn Gln Asn Cys Asp Ser Ala Arg Thr Ser Asp Asp Arg Leu  
 95 100 105

Cys Arg Ser Val Ser  
 110

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Met Arg Thr Asp Tyr Pro Arg Ser Val Leu Ala Pro Ala Tyr Val  
 1 5 10 15

Ser Val Cys Leu Leu Leu Leu Cys Pro Arg Glu Val Ile Ala Pro  
 20 25 30

Ala Gly Ser Glu Pro Trp Leu Cys Gln Pro Ala Pro Arg Cys Gly  
 35 40 45

Asp Lys Ile Tyr Asn Pro Leu Glu Gln Cys Cys Tyr Asn Asp Ala  
 50 55 60

Ile Val Ser Leu Ser Glu Thr Arg Gln Cys Gly Pro Pro Cys Thr  
 65 70 75

Phe Trp Pro Cys Phe Glu Leu Cys Cys Leu Asp Ser Phe Gly Leu  
 80 85 90

Thr Asn Asp Phe Val Val Lys Leu Lys Val Gln Gly Val Asn Ser  
 95 100 105

Gln Cys His Ser Ser Pro Ile Ser Ser Lys Cys Glu Ser Arg Arg  
 110 115 120

Arg Phe Pro

10

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 8

Met Arg Pro Arg Cys Cys Ile Leu Ala Leu Val Cys Trp Ile Thr  
 1 5 10 15

Val Phe Leu Leu Gln Cys Ser Lys Gly Thr Thr Asp Ala Pro Val  
 20 25 30

Gly Ser Gly Leu Trp Leu Cys Gln Pro Thr Pro Arg Cys Gly Asn  
 35 40 45

Lys Ile Tyr Asn Pro Ser Glu Gln Cys Cys Tyr Asp Asp Ala Ile  
 50 55 60

Leu Ser Leu Lys Glu Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr Cys Thr Phe  
65 70 75

Trp Pro Cys Phe Glu Leu Cys Cys Pro Glu Ser Phe Gly Pro Gln  
80 85 90

Gln Lys Phe Leu Val Lys Leu Arg Val Leu Gly Met Lys Ser Gln  
95 100 105

Cys His Leu Ser Pro Ile Ser Arg Ser Cys Thr Arg Asn Arg Arg  
110 115 120

His Val Leu Tyr Pro  
125

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Val Pro Arg Ile Ser Ala Ala Ile Phe Ile Phe Glu Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Ser Asn Ser Glu Gly Val Thr Asp Leu Arg Leu Trp Leu Cys  
20 25 30

Gln Pro Ala Pro Arg Cys Gly Glu Trp Thr Tyr Asn Pro Leu Glu  
35 40 45

Gln Cys Cys Asp Asp Gly Val Ile Leu Asp Leu Asn Gln Thr Arg  
50 55 60

Leu Cys Gly Ser Ser Cys Thr Phe Trp Pro Cys Phe Gln His Cys  
65 70 75

Cys Leu Glu Ser Leu Gly Ser Gln Asn Gln Thr Val Val Arg Phe  
80 85 90

Lys Val Pro Gly Met Lys Pro Asp Cys Lys Ser Ser Pro Ile Thr  
95 100 105

Arg Ile Cys Ala Gln Glu Tyr His Pro Lys Ser Pro Val Ser Arg  
110 115 120

Ser Asp Leu Ile

10

<210> 10

<211> 140

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 10

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

5 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 atggcccatg gcactact 18

10 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 tcagcgaata ggcaaaggt 19

15 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 cagcaggcag cccatatctt gc 22

20 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 14  
 gccctgattg agatggttgt 20

25 <210> 15

ES 2 592 937 T3

```

<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 15
5  ccaaatatgt gccgaattga 20
   <210> 16
   <211> 25
   <212> DNA
   <213> Mus musculus
10  <400> 16
   cagagtagca gaaggctccc ttgcc 25
   <210> 17
   <211> 24
   <212> DNA
15  <213> Homo sapiens
   <400> 17
   ctagaattct ggacagcatg agat 24
   <210> 18
   <211> 18
   <212> DNA
20  <213> Homo sapiens
   <400> 18
   gttggccata ggggtcat 18
   <210> 19
25  <211> 23
   <212> DNA
   <213> Homo sapiens
   <400> 19
   cccagggact ctgaaccctc ctg 23
30  <210> 20
   <211> 20
   <212> DNA
   <213> Homo sapiens
   <400> 20
35  gcacgtcctg taccataaa 20
   <210> 21
   <211> 24
   <212> DNA
   <213> Homo sapiens
40  <400> 21
   agttcaactg tagtctccga tgtc 24
   <210> 22
   <211> 24
   <212> DNA
45  <213> Homo sapiens
   <400> 22
   cagctgcttc gtctcttc ccct 24
   <210> 23
   <211> 138
50  <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <400> 23
Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp Asn Pro Asp Asn Lys
   1 5 10 15

Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro Pro Pro Cys Pro
   20 25 30

Asp Tyr Glu Phe Arg Glu Asn Cys Gly Leu Asn Asp His Gly Asp
   35 40 45

Phe Val Thr Pro Pro Phe Arg Lys Cys Ser Ser Gly Gln Cys Asn
   50 55 60

```

Pro Asp Gly Ala Glu Leu Cys Ser Pro Cys Gly Gly Gly Ala Val  
 65 70 75  
 Thr Pro Thr Pro Ala Ala Gly Gly Gly Arg Thr Pro Trp Arg Cys  
 80 85 90  
 Arg Glu Arg Pro Val Pro Ala Lys Gly His Cys Pro Leu Thr Pro  
 95 100 105  
 Gly Asn Pro Gly Ala Pro Ser Ser Gln Glu Arg Ser Ser Pro Ala  
 110 115 120  
 Ser Ser Ile Ala Trp Arg Thr Pro Glu Pro Val Pro Gln Gln Ala  
 125 130 135

Trp Pro Asn

5 <210> 24  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24

Met Ala Pro Arg Gly Cys Ile Val Ala Val Phe Ala Ile Phe Cys  
 1 5 10 15

Ile Ser Arg Leu Leu Cys Ser His  
 20

10 <210> 25  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25

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

Pro His Lys Arg Cys Gly Asp Lys Phe Tyr Asp Pro Leu Gln His  
 20 25 30

Cys Cys Tyr Asp Asp Ala Val Val Pro Leu Ala Arg Thr Gln Thr  
 35 40 45

Cys Gly Asn Cys Thr Phe Arg Val Cys Phe Glu Gln Cys Cys Pro  
 50 55 60

Trp Thr Phe Met Val Lys Leu Ile Asn Gln Asn Cys Asp Ser Ala  
 65 70 75

Arg Thr Ser Asp Asp Arg Leu Cys Arg Ser Val Ser  
 80 85

15 <210> 26  
 <211> 29  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Arg Thr Asp Tyr Pro Arg Ser Val Leu Ala Pro Ala Tyr Val  
 1 5 10 15

Ser Val Cys Leu Leu Leu Leu Cys Pro Arg Glu Val Ile Ala  
 20 25

<210> 27

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Ala Gly Ser Glu Pro Trp Leu Cys Gln Pro Ala Pro Arg Cys  
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Ile Tyr Asn Pro Leu Glu Gln Cys Cys Tyr Asn Asp  
 20 25 30

Ala Ile Val Ser Leu Ser Glu Thr Arg Gln Cys Gly Pro Pro Cys  
 35 40 45

Thr Phe Trp Pro Cys Phe Glu Leu Cys Cys Leu Asp Ser Phe Gly  
 50 55 60

Leu Thr Asn Asp Phe Val Val Lys Leu Lys Val Gln Gly Val Asn  
 65 70 75

Ser Gln Cys His Ser Ser Pro Ile Ser Ser Lys Cys Glu Ser Arg  
 80 85 90

Arg Arg Phe Pro

<210> 28

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Arg Pro Arg Cys Cys Ile Leu Ala Leu Val Cys Trp Ile Thr  
 1 5 10 15

Val Phe Leu Leu Gln Cys Ser Lys  
 20

<210> 29

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

<210> 30  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 30

Met Val Pro Arg Ile Ser Ala Ala Ile Phe Ile Phe Glu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Asn Ser

10 <210> 31  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31

Glu Gly Val Thr Asp Leu Arg Leu Trp Leu Cys Gln Pro Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Cys Gly Glu Trp Thr Tyr Asn Pro Leu Glu Gln Cys Cys Asp  
 20 25 30  
 Asp Gly Val Ile Leu Asp Leu Asn Gln Thr Arg Leu Cys Gly Ser  
 35 40 45  
 Ser Cys Thr Phe Trp Pro Cys Phe Gln His Cys Cys Leu Glu Ser  
 50 55 60  
 Leu Gly Ser Gln Asn Gln Thr Val Val Arg Phe Lys Val Pro Gly  
 65 70 75  
 Met Lys Pro Asp Cys Lys Ser Ser Pro Ile Thr Arg Ile Cys Ala  
 80 85 90

15

Gln Glu Tyr His Pro Lys Ser Pro Val Ser Arg Ser Asp Leu Ile  
 95 100 105

<210> 32  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 32

5

Met Lys Ile Arg Asn Ala Cys Ala Val Leu Ile Glu Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Phe Ile Leu Glu Gly Val Thr  
 20

<210> 33  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 33

10

Gly Ala Arg Lys Ile Ser Thr Phe Ser Gly Pro Gly Ser Trp Pro  
 1 5 10 15

Cys Asn Pro Lys Cys Asp Gly Arg Thr Tyr Asn Pro Ser Glu Glu  
 20 25 30

Cys Cys Val His Asp Thr Ile Leu Pro Phe Lys Arg Ile Asn Leu  
 35 40 45

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

Pro Glu Ser Tyr Ser Pro Lys Lys Lys Phe Ile Val Lys Leu Lys  
 65 70 75

Val His Gly Glu Arg Ser His Cys Ser Ser Ser Pro Ile Ser Arg  
 80 85 90

Asn Cys Lys Ser Asn Lys Ile Phe His Gly Glu Asp Ile Glu Asp  
 95 100 105

15

Asn Gln Leu Ser Leu Arg Lys Lys Ser Gly Asp Gln Pro  
 110 115

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a cualquiera de IGFL1 o TMEM149, caracterizado porque el anticuerpo es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149.
2. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo como se define en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un envase que comprende: (a) un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo tal como se define en la reivindicación 1; y (b) instrucciones para su uso para bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149.
- 15 4. Un anticuerpo monoclonal o una parte de unión a antígeno del mismo tal como se define en la reivindicación 1 para su uso en el bloqueo de la interacción entre IGFL1 a TMEM149 en un método de tratamiento por terapia.
5. El anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
- 20 6. Un método para identificar un compuesto capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, comprendiendo dicho método la medición de la unión de IGFL1 a TMEM149 en presencia frente a la ausencia de dicho agente, en el que una menor unión de IGFL1 a TMEM149 en presencia de dicho agente es indicativa de que dicho agente es capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, en el que dicho agente no es Fc-TMEM149.
- 25 7. Un método para identificar un compuesto capaz de bloquear la interacción entre IGFL1 y TMEM149, comprendiendo dicho método la medición de una actividad TMEM149 mediada por IGFL1 en presencia o ausencia de dicho agente, en el que una menor actividad TMEM149 en presencia de dicho agente es indicativa de que dicho agente está bloqueando IGFL1 la interacción entre IGFL1 y TMEM149, en el que dicha actividad TMEM149 mediada por IGFL1 se selecciona del grupo que consiste en la producción de un mediador inflamatorio y un reclutamiento de citoesqueleto.
- 30



ES 2 592 937 T3

```

IGFL1  --MAPRGCIVAVFAIFCISRLLCSHGAPVAPMTPYLMLCQPHKRCGDKFYDPLQHCCYDD 58
IGFL2  -MRTDYPRSVLAPAYVSVCLLLCPREVIAPAGSEPWLCQPAPRCGDKIYNPLEQCCYND 59
IGFL3  -MRPR-CCILALVCWITVFLQCSKGTTDAPVGSGLWLCQPTPRCGNKIYNPSEQCCYDD 58
IGFL4  MVPRISAAIFIFELLGSNSEGVTDLR-----LWLCQPAPRCGEWTYNPLEQCCDDG 51
mIGFL  -MKIRNACAVLIEVLLFILEGVTGARKISTFSGPGSWPCN--PKCDGRTYNPSECCVHD 57
          .
          *:  :*.  *:*  :.**  ..

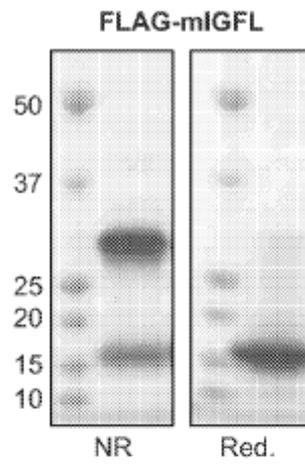
IGFL1  AVVPLARTQTTCG-NCTFRVCFEQCCPWF-----MVKLINQNCDSARTSDDRLCRSV 109
IGFL2  AIVSLSETRQCGPPCTFWPCFELCCLDSEFGLTNDFFVVKLVQGVNSQCHSSPISSKCESR 119
IGFL3  AILSLKETRRCGSTCTFWPCFELCCPESFGPQQKFLVKLRVLMKMSQCHLSPISRSCTRN 118
IGFL4  VILDNLQTRLCGSSCTFWPCFQHCLESLSQNTVVRFKVPGMKPCCKSSPITRICAQE 111
mIGFL  TILPFKRINLCGPSCTYRPFELCCPESYSPKKKFIKLVHGERSHCSSSPISRNCKSN 117
.: : . . ** **: **: * : . : . . . : . *

IGFL1  S----- 110 Longitud maduro 87 a.a.)
IGFL2  RRFP----- 123 Longitud maduro 95 a.a.)
IGFL3  RRHVLYP----- 125 Longitud maduro 102 a.a.)
IGFL4  YHPKSPVSRSDLI----- 124 Longitud maduro 106 a.a.)
mIGFL  KIFHGEDIEDNQLSLRKKSGDQP 140 Longitud maduro 118 a.a.)

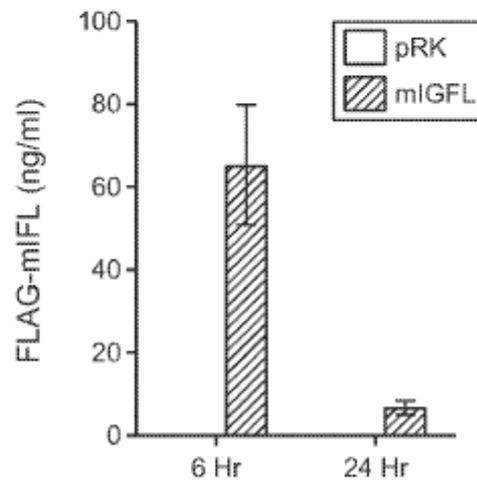
```

SecA	Nombre	Lon (aa)	SecB	Nombre	Lon (aa)	Puntuación
1	IGFL1	110	2	IGFL2	123	34
1	IGFL1	110	3	IGFL3	125	39
1	IGFL1	110	4	IGFL4	124	22
1	IGFL1	110	5	mIGFL	140	20
2	IGFL2	123	3	IGFL3	125	54
2	IGFL2	123	4	IGFL4	124	39
2	IGFL2	123	5	mIGFL	140	38
3	IGFL3	125	4	IGFL4	124	41
3	IGFL3	125	5	mIGFL	140	40
4	IGFL4	124	5	mIGFL	140	28

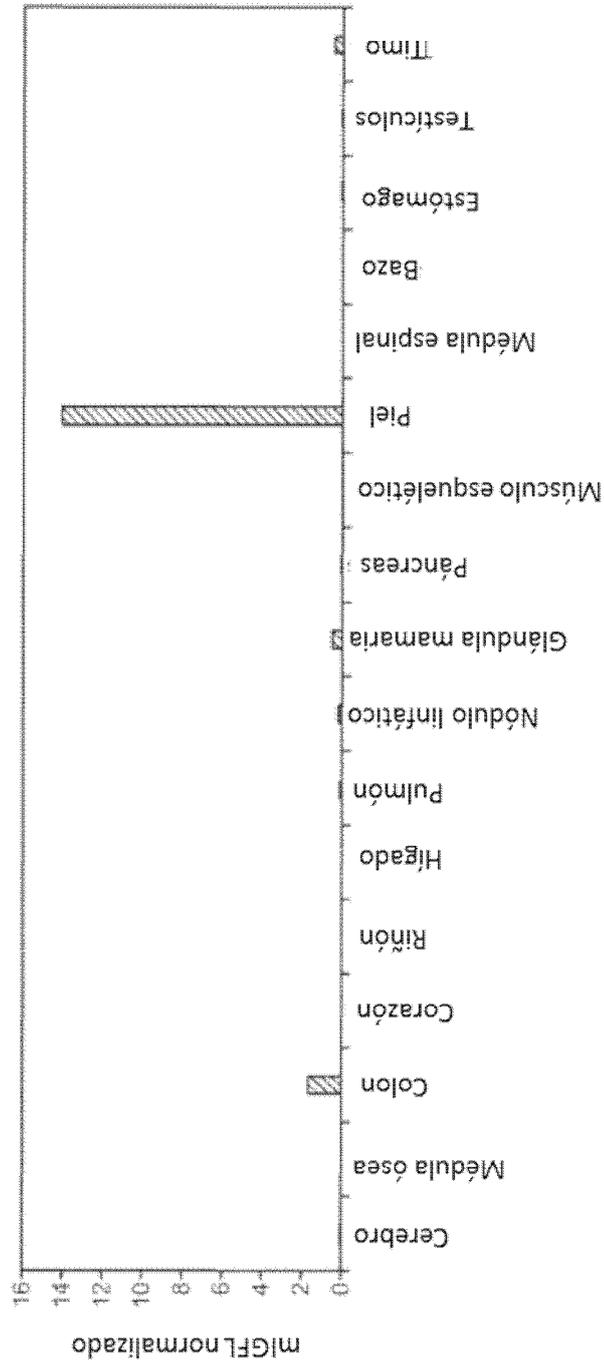
**FIG. 2**



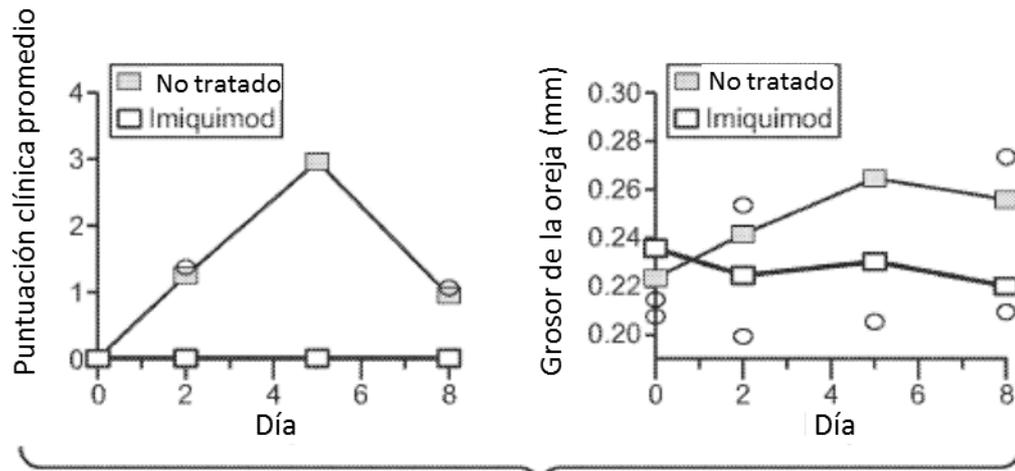
**FIG. 3**



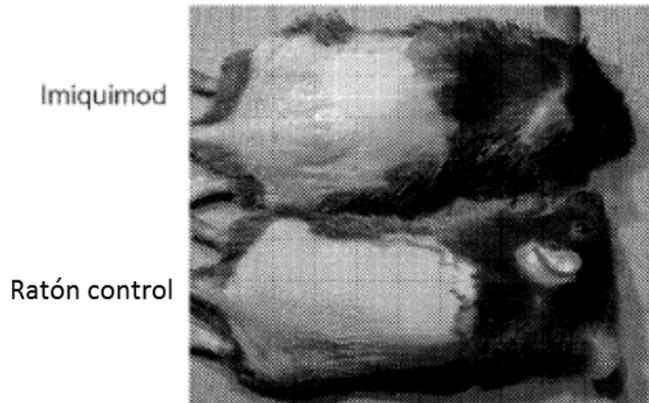
**FIG. 4**



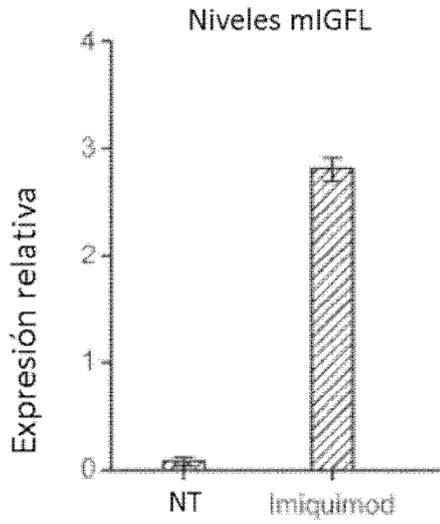
**FIG. 5**



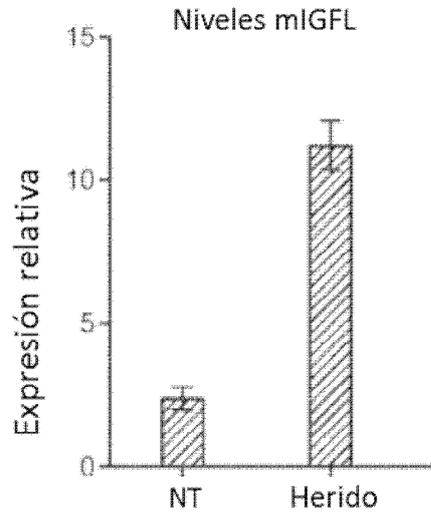
**FIG. 6A**



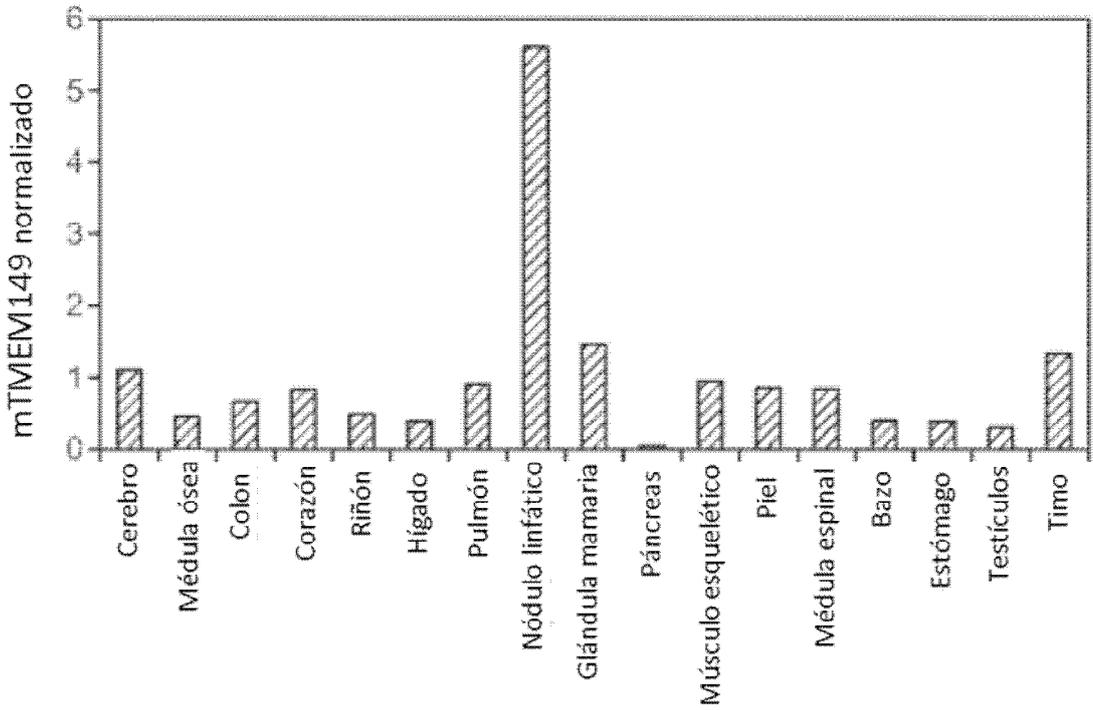
**FIG. 6B**



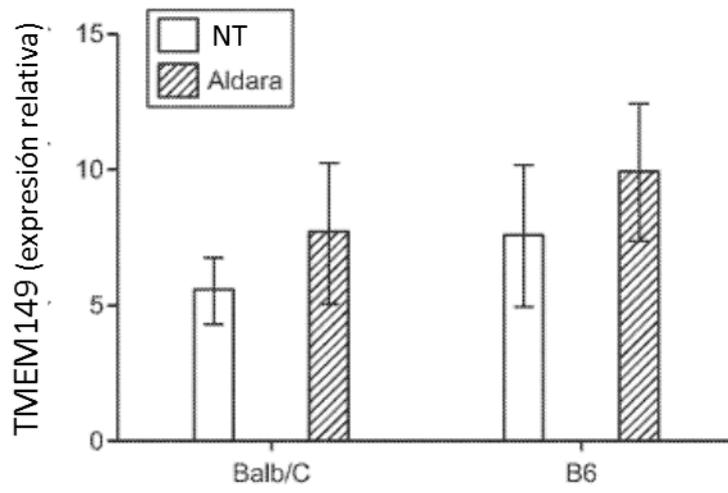
**FIG. 7A**



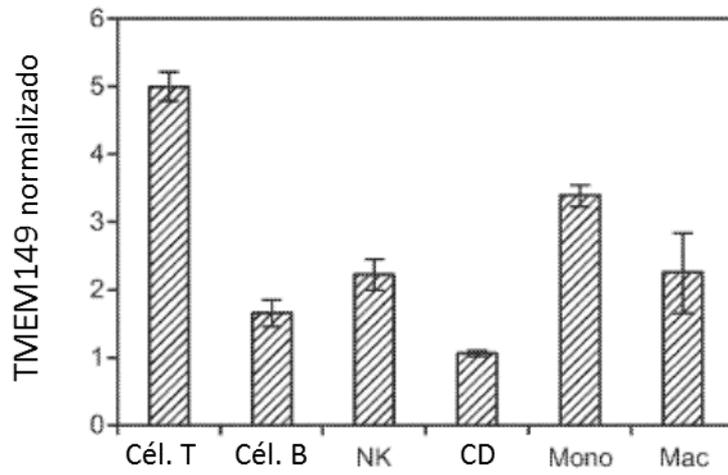
**FIG. 7B**



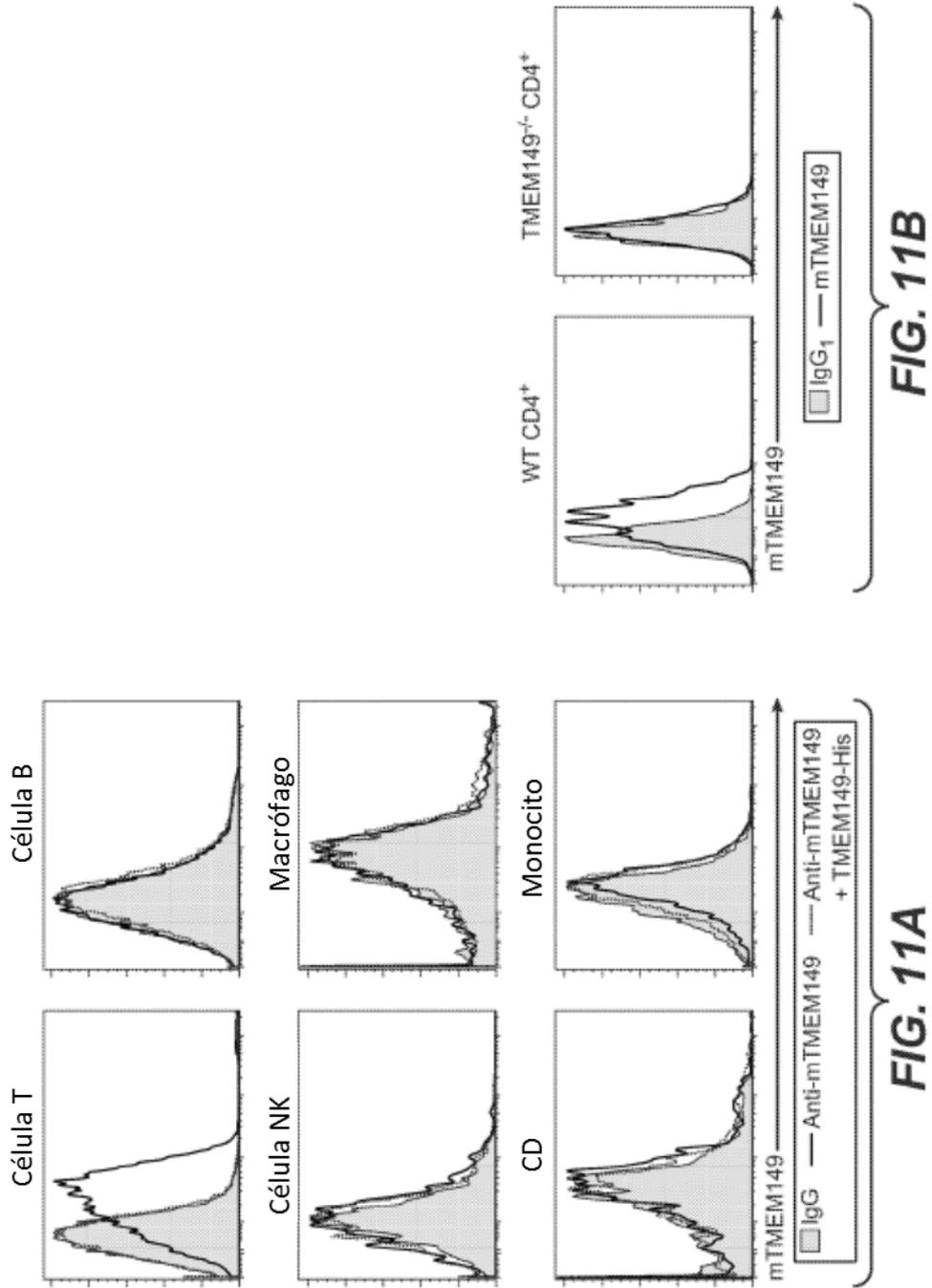
**FIG. 8**

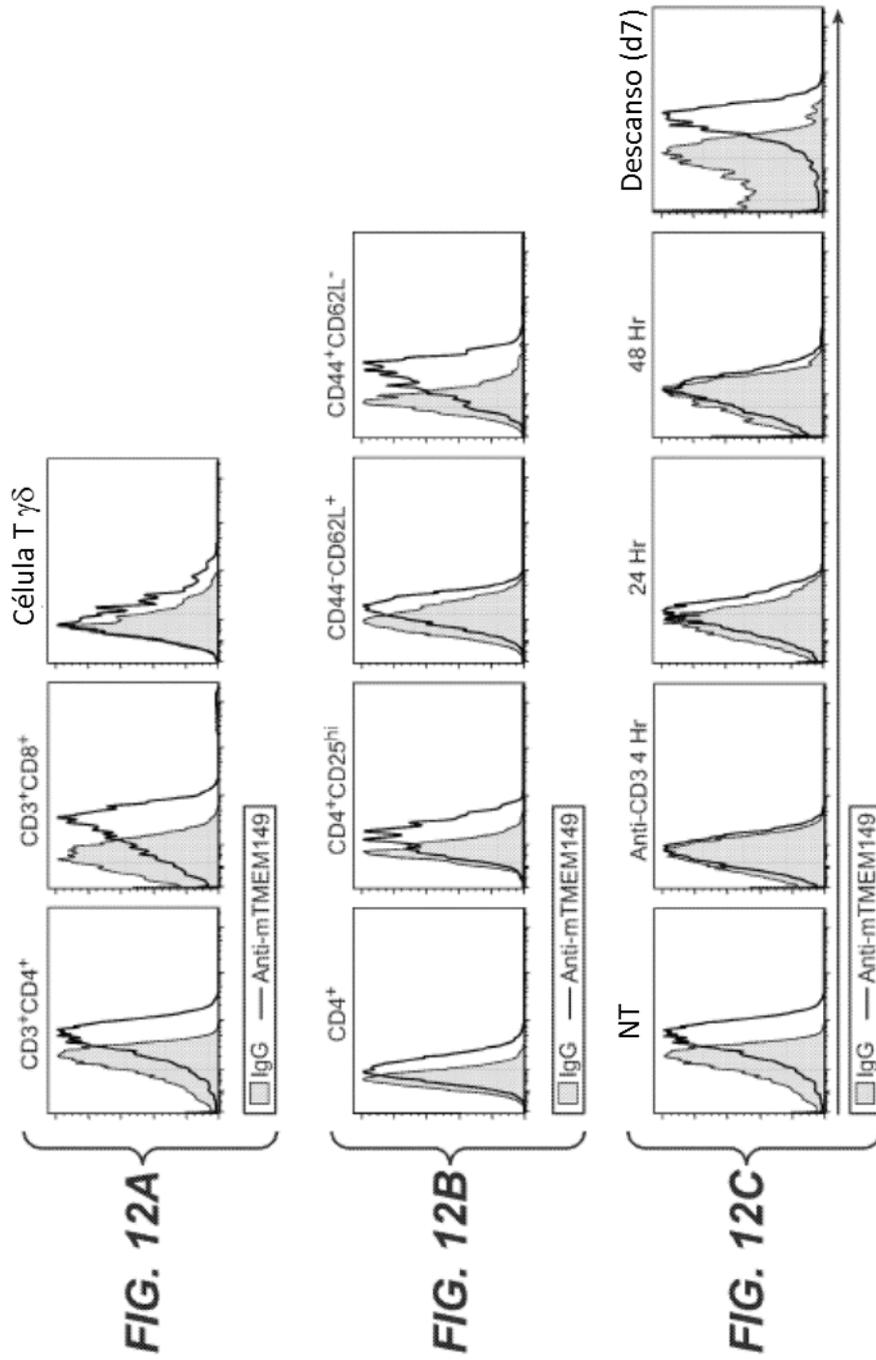


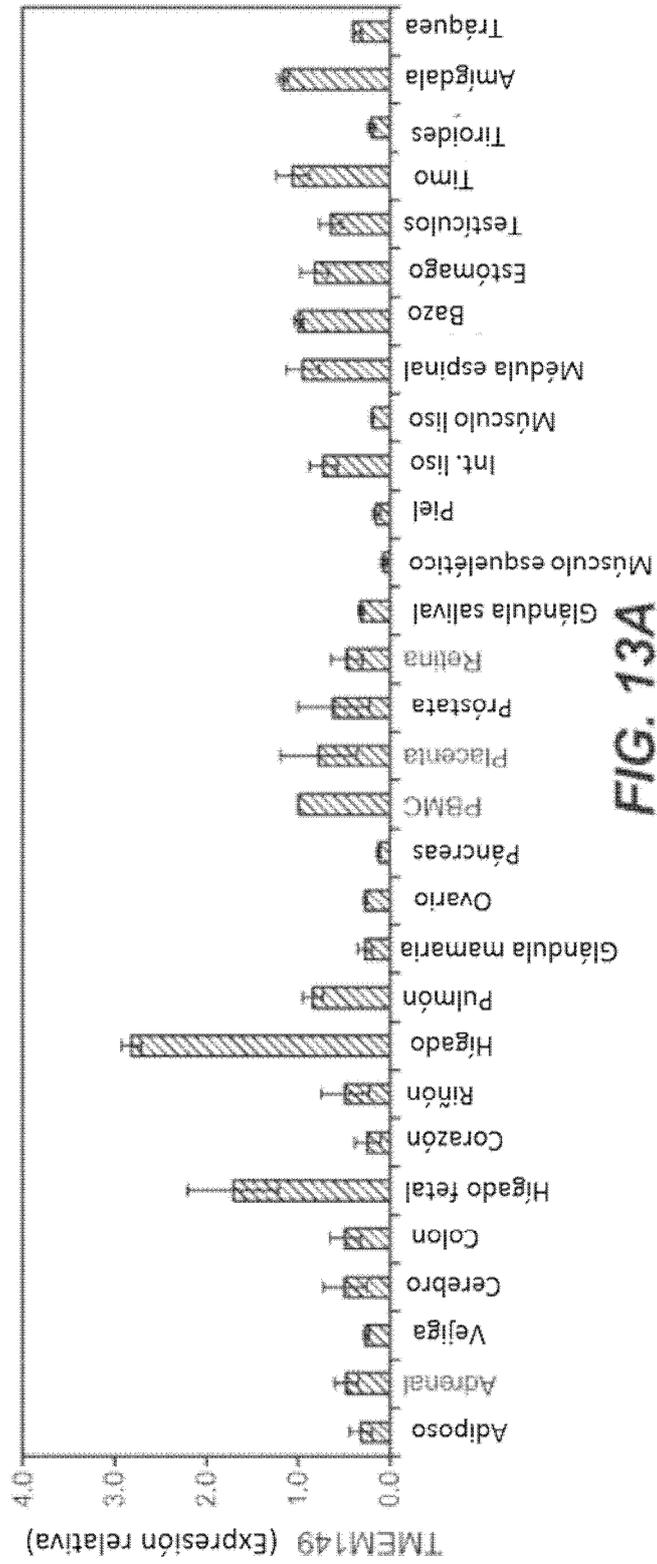
**FIG. 9**

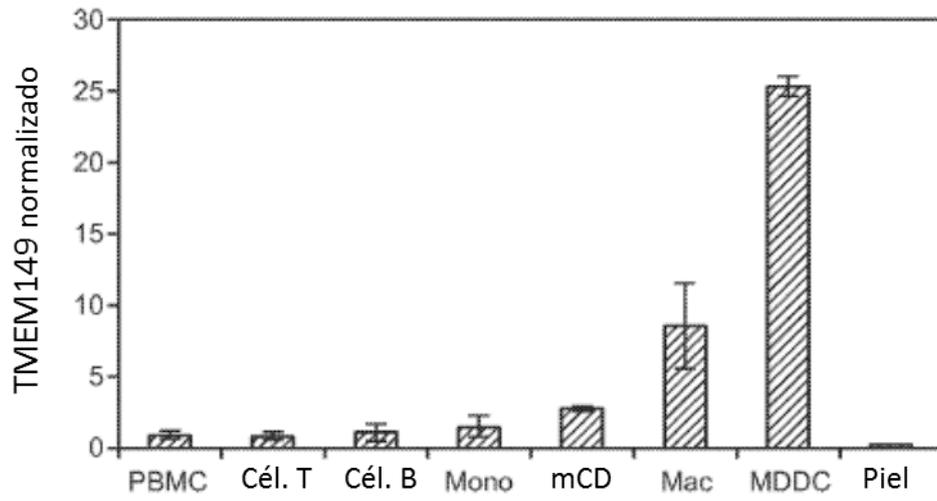


**FIG. 10**

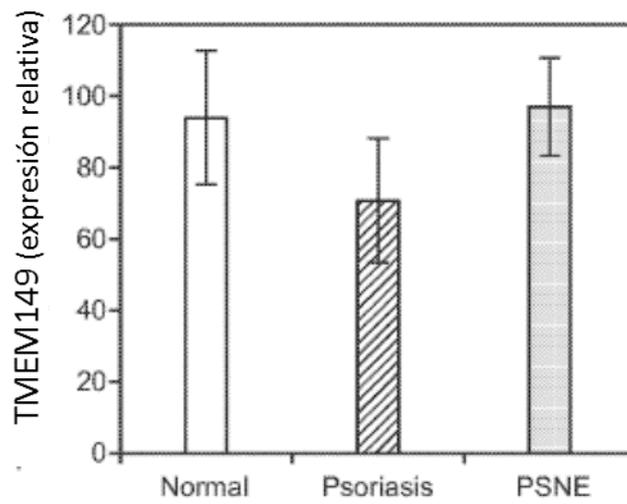




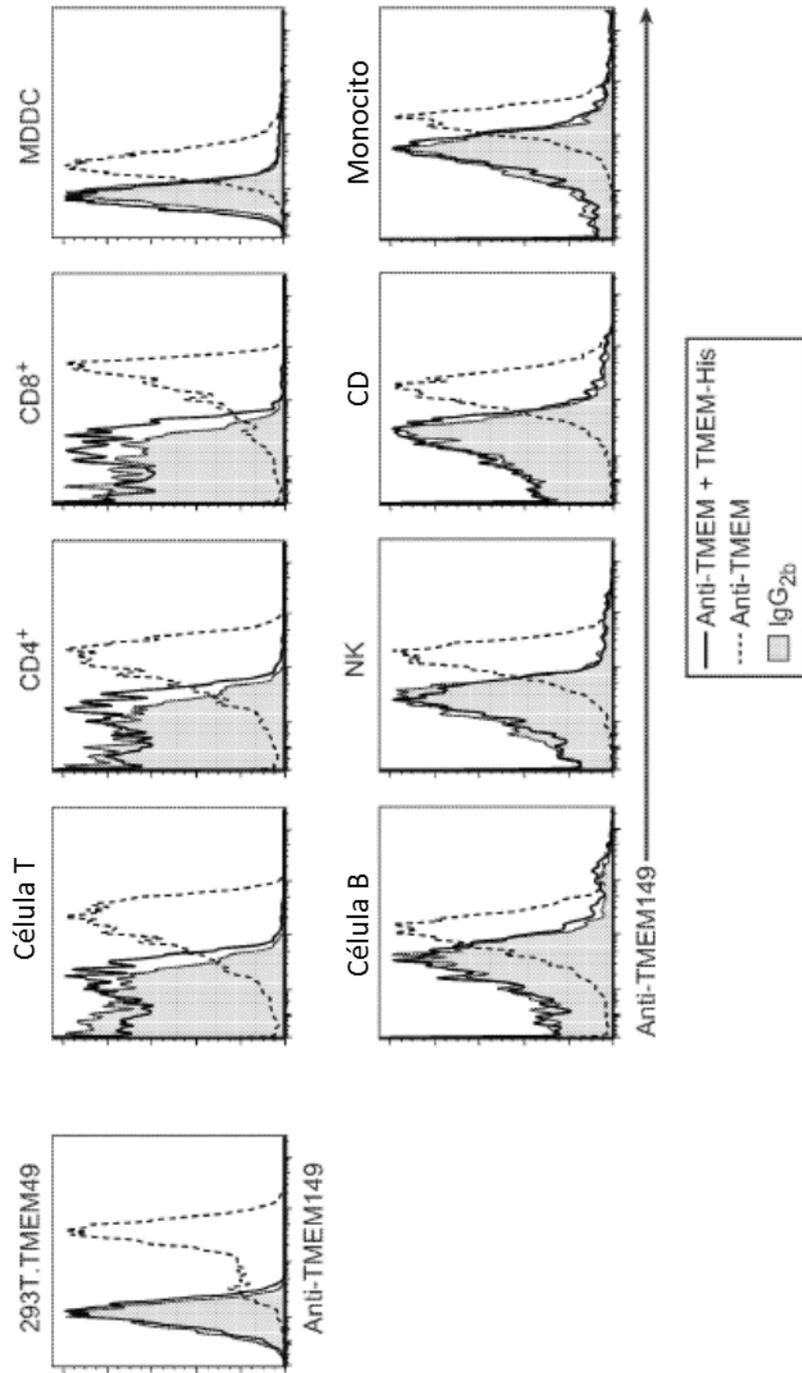




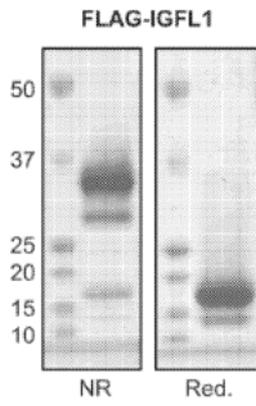
**FIG. 13B**



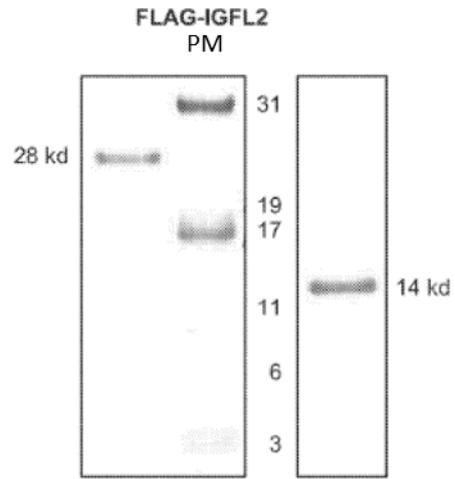
**FIG. 13C**



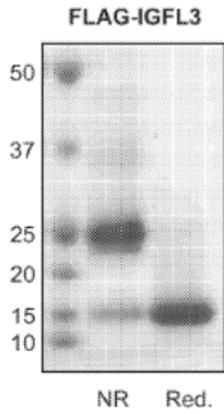
**FIG. 14**



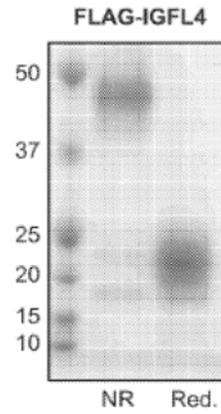
**FIG. 15A**



**FIG. 15B**

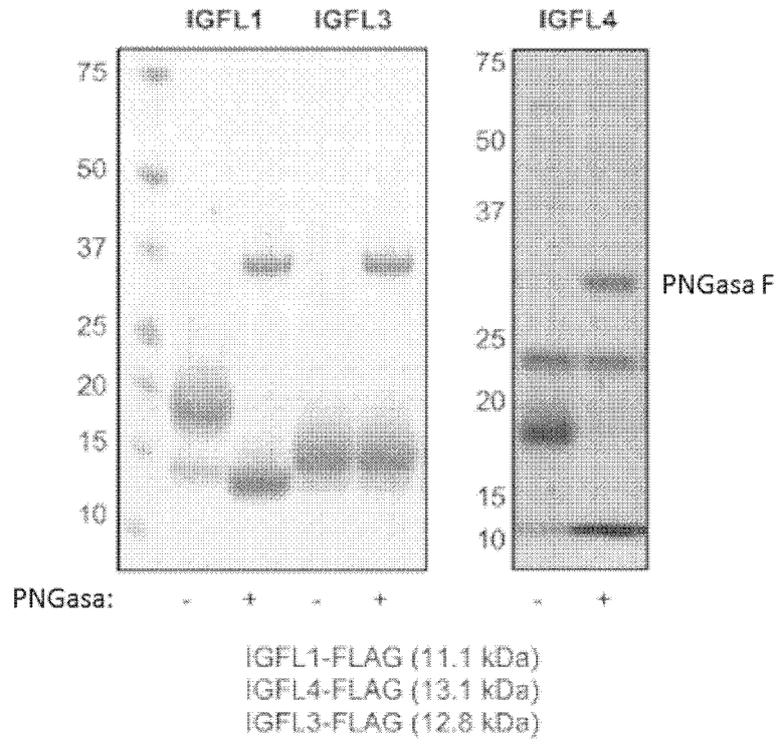


**FIG. 15C**

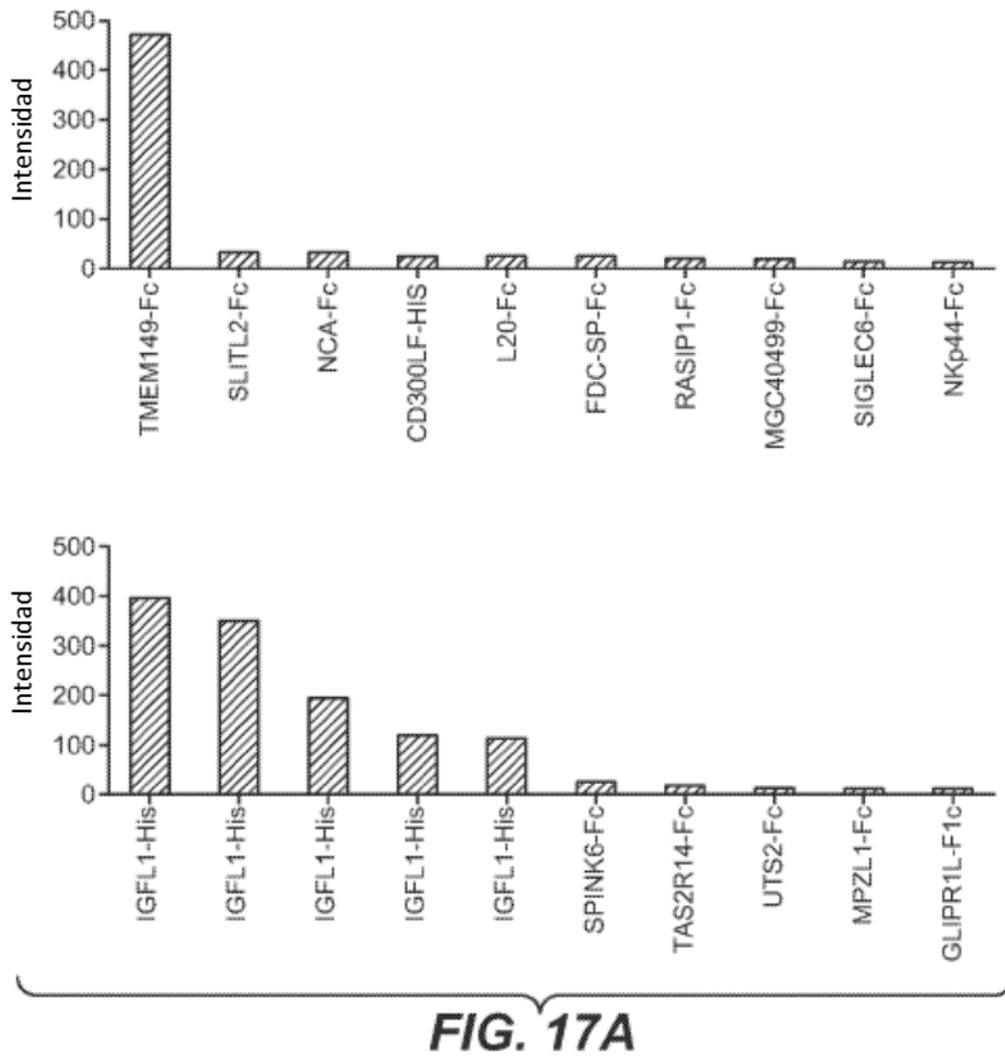


**FIG. 15D**

IGFL-1, -4 están glicosiladas



**FIG. 16**

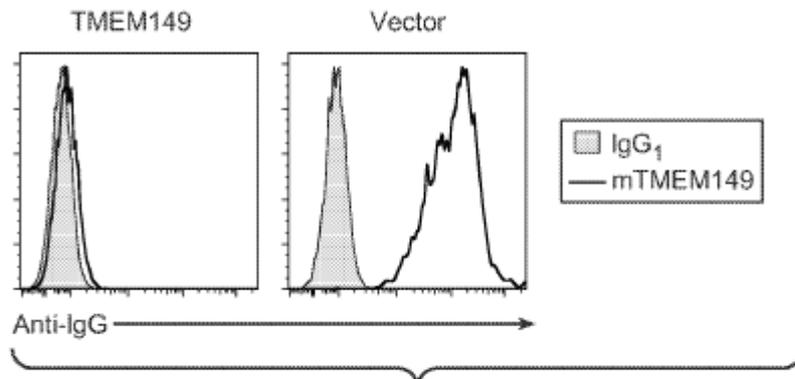


```

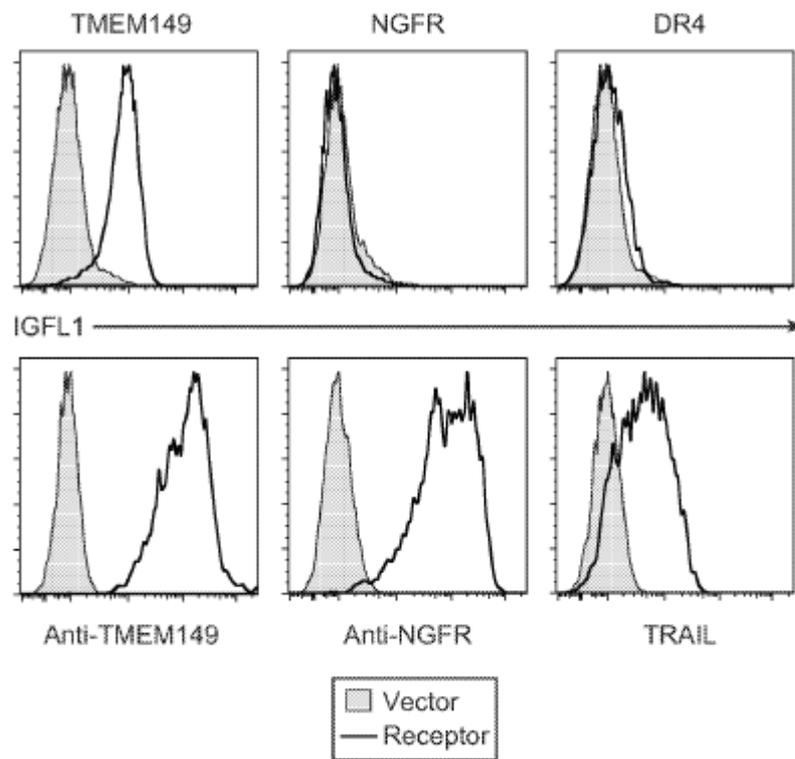
Humano  MGFGRCLLT--ALLLLALAPPEASQYGRLEYWNPDKKCCSCLQRFGPPCPDYEFR 57
Macaco  MGFGRCLLT--ALLLLALASLEASQYGRLEYWNPDKKCCSCLHRFGPPCPDYEFR 57
Ratón   MGFSWLLNTVAVAVILLTRAASMEASFCGHLEWNSDKRCCSCLQRFGPPACPDHEFT 60
Rata    MGFSWLLNTVVVVTVILLTRAAPLEASRFCGHLEFWSNKRCCSCLQRFGPPACPDYEFA
***. * * :***: * . *** :**:**:**:**:**:**:**:**:**:**:**
Humano  ENCGLNDHGDFVTFPRKCSSGQCNPDGAELCSQGGG-AVTPTAAGGGRTPRKCRERF 116
Macaco  ENCGLNDHGDFVTFPRKCSSGQCNPDGAELCSQGGG-AVTPTAAGGGRTLRKCRERF 116
Ratón   ENCGLNDFGDTVAHFVKKCSFGYCNPNGTCLCSQSSGAAAPAHVESPRTRHKCRKPP 120
Rata    ENCGLNDFGDTVAHFVKKCSFGYCNPNGTCLCSQNSG-ATAPTHMESPRTRHKCR-KP 118
*****.** * :**:**:**:**:**:**:**:**:**:**:** * * :** :*
Humano  VPAKGHCPLTPGNPGAPSSQERSPASSIAWRTPEVPVQQAWPNFLPLVVLVLLTLAVI 176
Macaco  VPAKGPCPLTTGNPGPSSQERSPASSIAWRTPEPIPQQALFTFLPLLVLLVLLTLAVI 176
Ratón   VPKDVCPLKPEDAGASSPGRWSLQTTKNEVSS-RPGFVSASVPLAVLPLLVLLLI 179
Rata    IPPKEVCPKPEERAGVSSPGRWSLRQTTONEVSS-RRAFVPSVPLAVLPLFVILLI 177
:*.* *****:** * * * * . . . . . * * * * * * * * * * * *
Humano  AILLLFILLWHLCPKADFPYPLVCGV-PNTHTPSSSHLSPGALGTGTWKEASLL 235
Macaco  AILLLFILLWHLCPKADFPYPLVCGV-PNTHAPSSSHLSPGALGTGTWK-ASLL 234
Ratón   LAVVLSLF-----KRVRSRPGSSSAFGD-PSTSLHYWPCPGLEVESRNRGK-ANLL 232
Rata    LAVVLSLF-----KRVRSRPGSSSLAGPQYESTSVH-WPCPGSLEGLSGNRGK-TSLL
      :***: * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Humano  PLLSRELSSLASQPLSRLLELEVELEELIVLLDPEPGGGMAHGTTRHLAARYGLPAAW 295
Macaco  PLLSRELPGLSQPLSRLLELEVELEELIVLLDPEPGGGMAHGTTRHLAARYGLPAAW 294
Ratón   QLSWELOGLASQPLSRLLELEVELEELIMLLDPEPGSGSTAYGTRHLAARYGLPATW 292
Rata    QLSWEFQSLASQPLSRLLELEVELEELIMLLDPEPGSGSMAYGTRHLAARYGLPATW
      * * * : . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Humano  STFAYSLRPSRSPRALIEMVWAREPSASLQGLQTHLAQLGRADALRVLSKLGSSGVCWA 355
Macaco  STFAYSLRPSRSPRALIEMVWAREPSASLQGLQTHLAQLGRADALRVLSKLG----- 347
Ratón   STFAYSLRPSRSPRALIEMVWAREPSATLQGFCTYLAQLGRDALQVLSKLG----- 345
Rata    STFAYSLRPNRSRSPRALIEMVWAREPSATLQGLGMVLAQLGRDALQVLSKLG-----
      ***.*****.*****.*****.***:* :*****:**:**:**:**:**

```

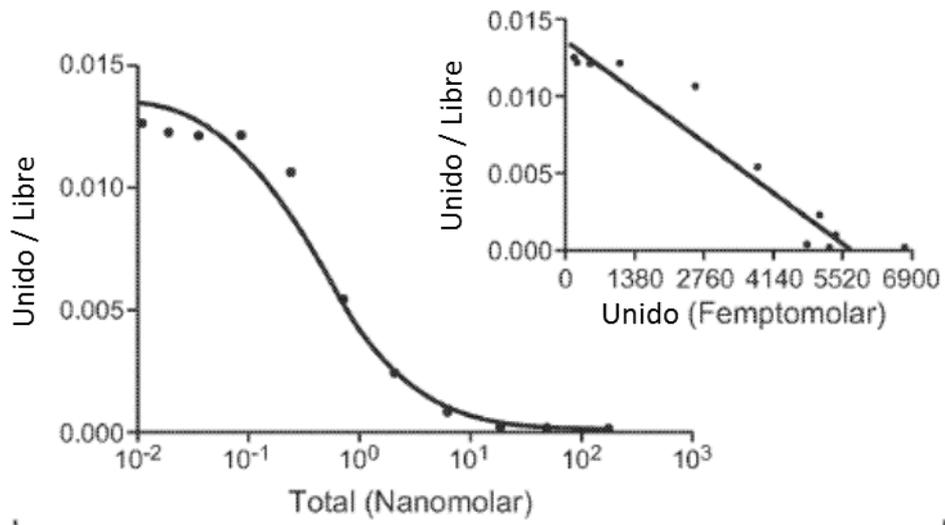
FIG. 17B



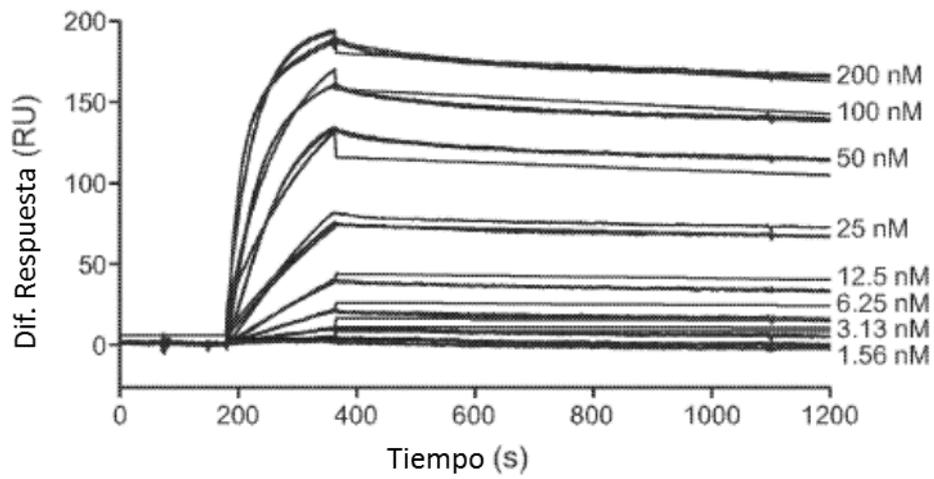
**FIG. 18A**



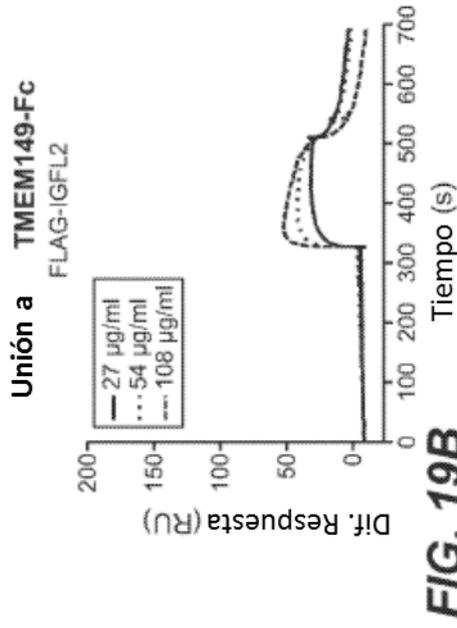
**FIG. 18B**



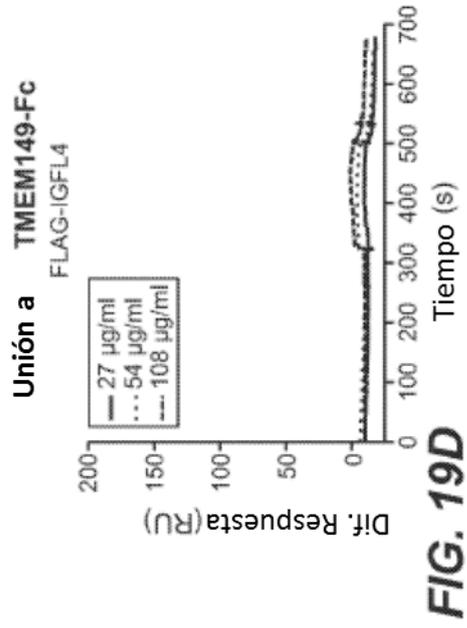
**FIG. 18C**



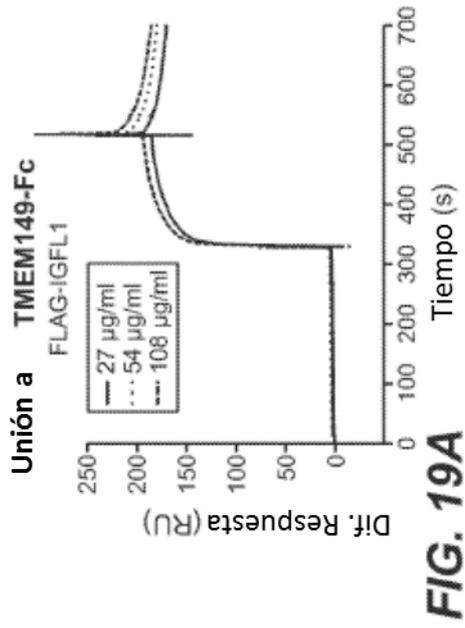
**FIG. 18D**



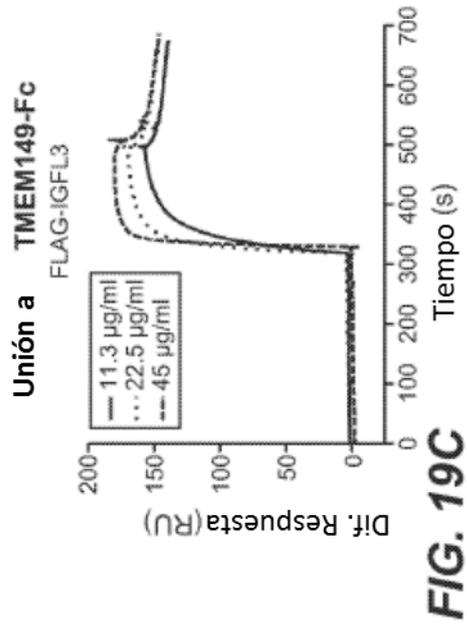
**FIG. 19B**



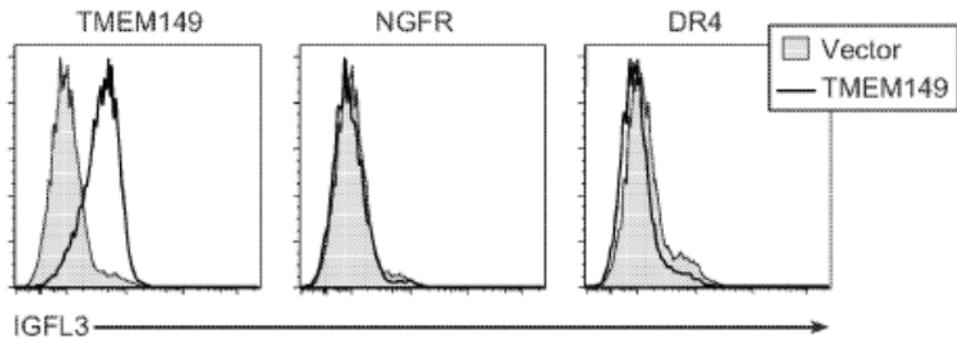
**FIG. 19D**



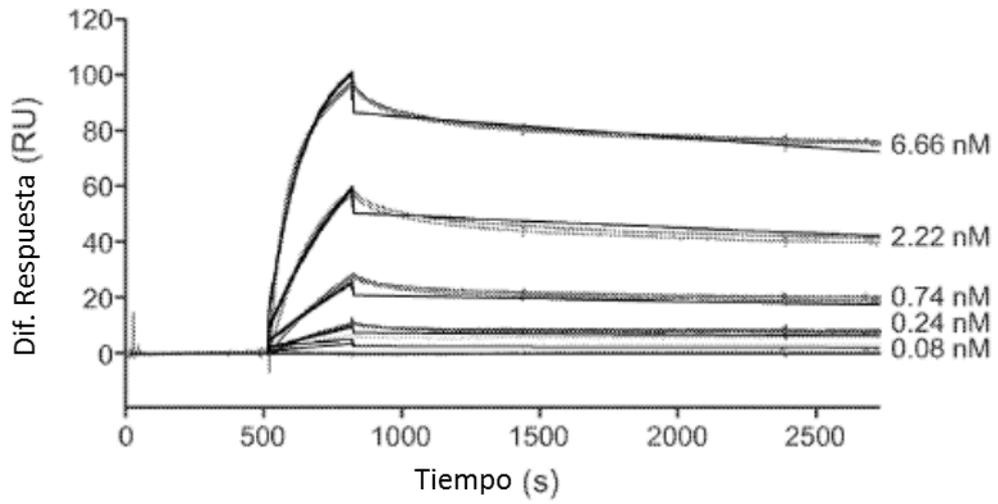
**FIG. 19A**



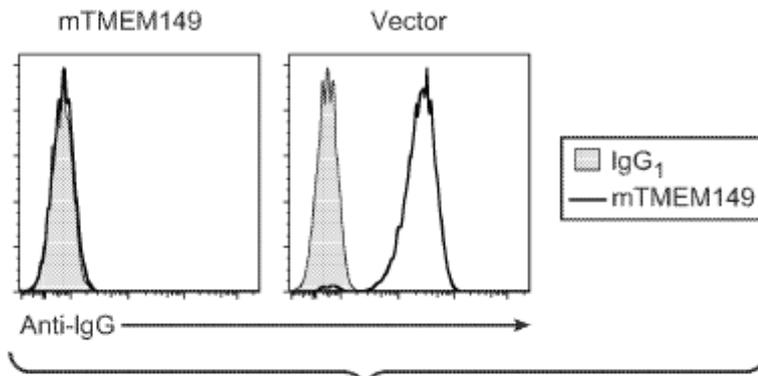
**FIG. 19C**



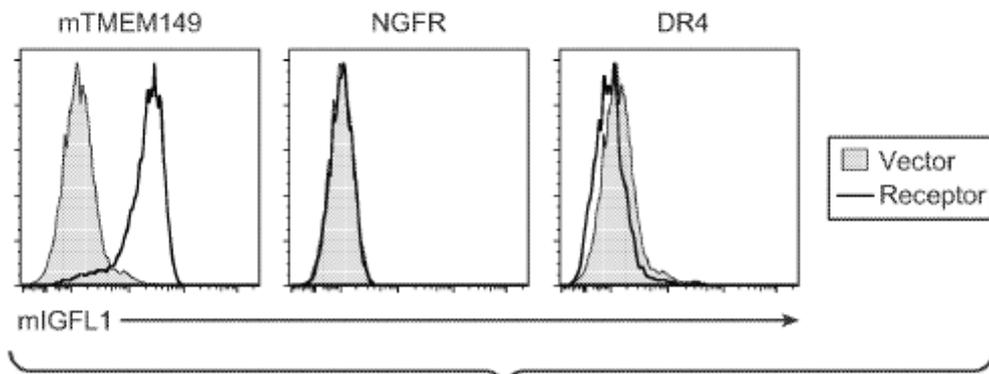
**FIG. 20A**



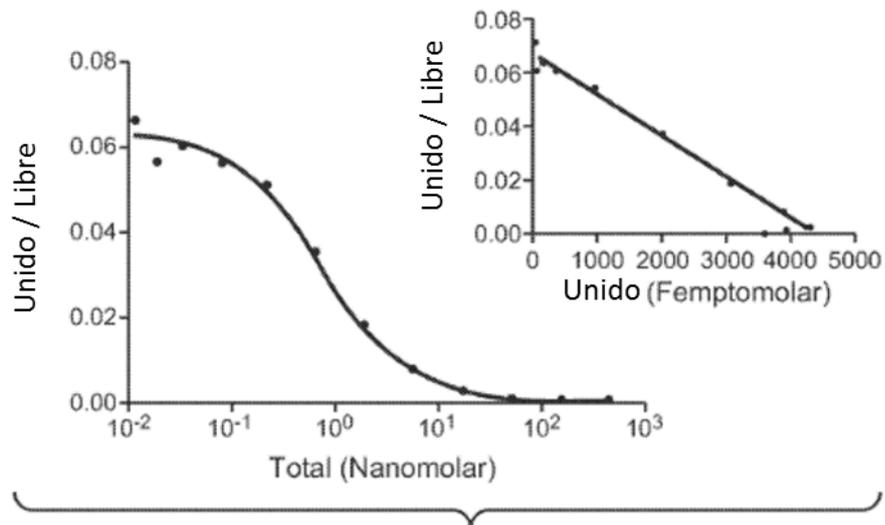
**FIG. 20B**



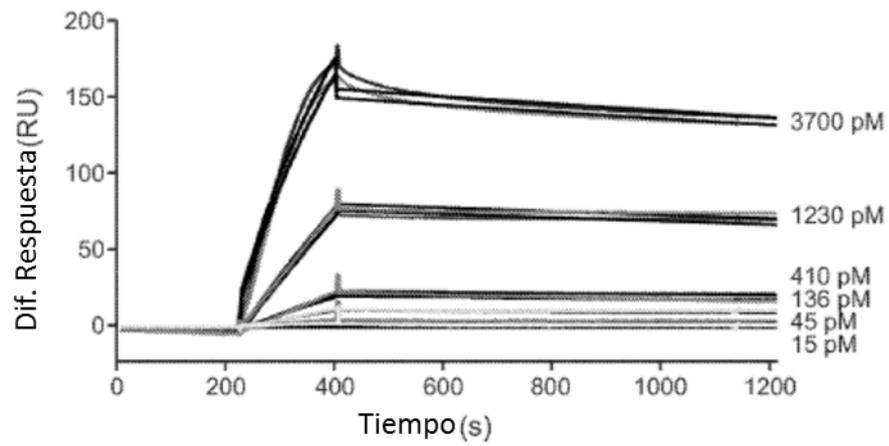
**FIG. 21A**



**FIG. 21B**



**FIG. 21C**



**FIG. 21D**

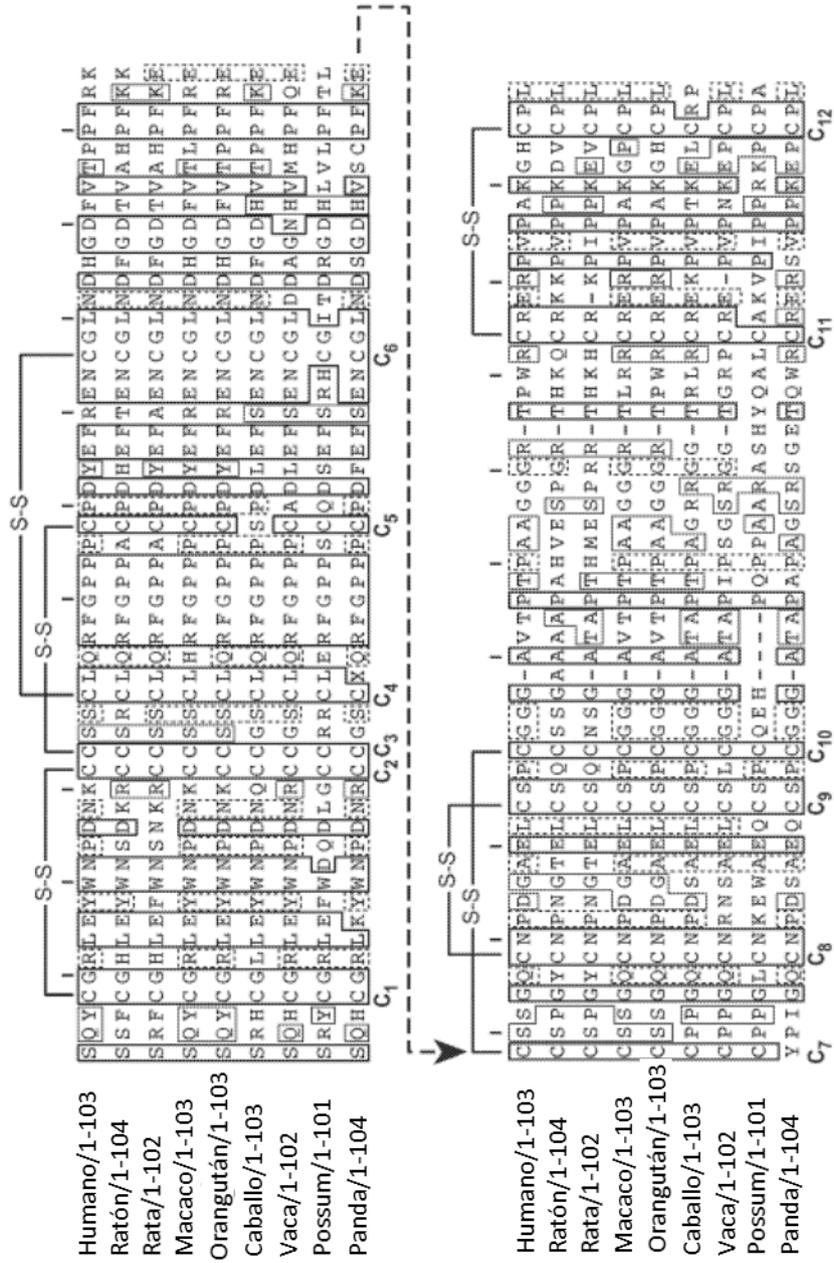
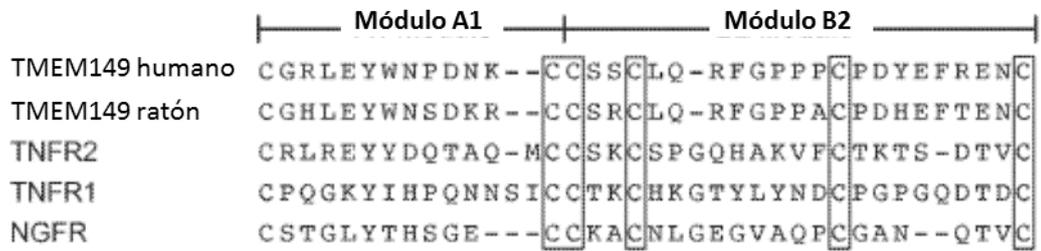
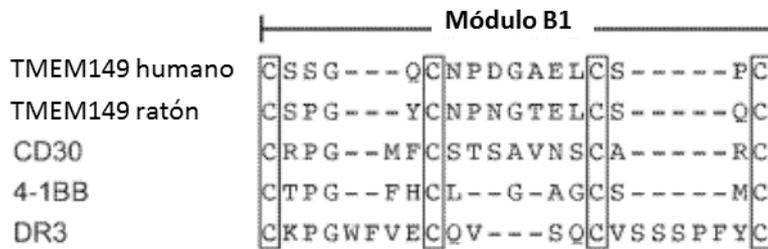


FIG. 22A

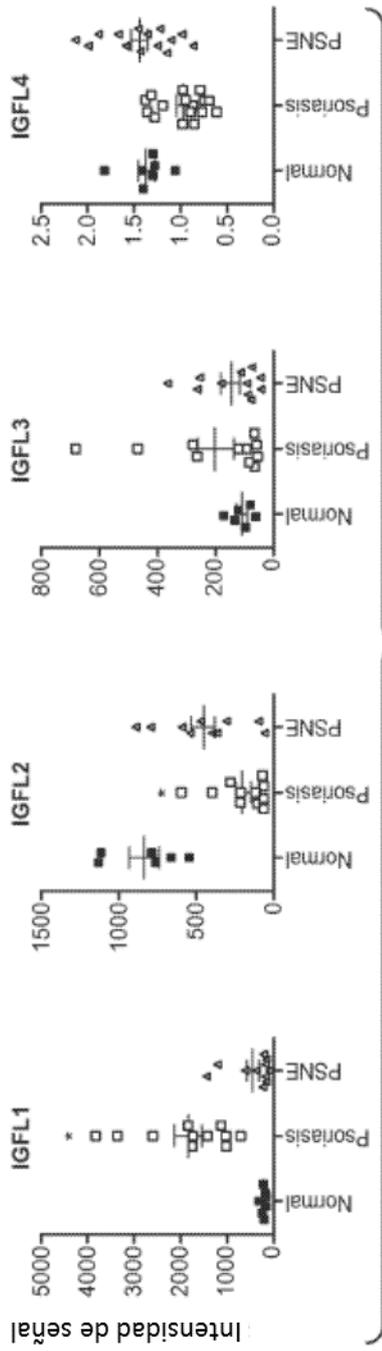


**FIG. 22B**

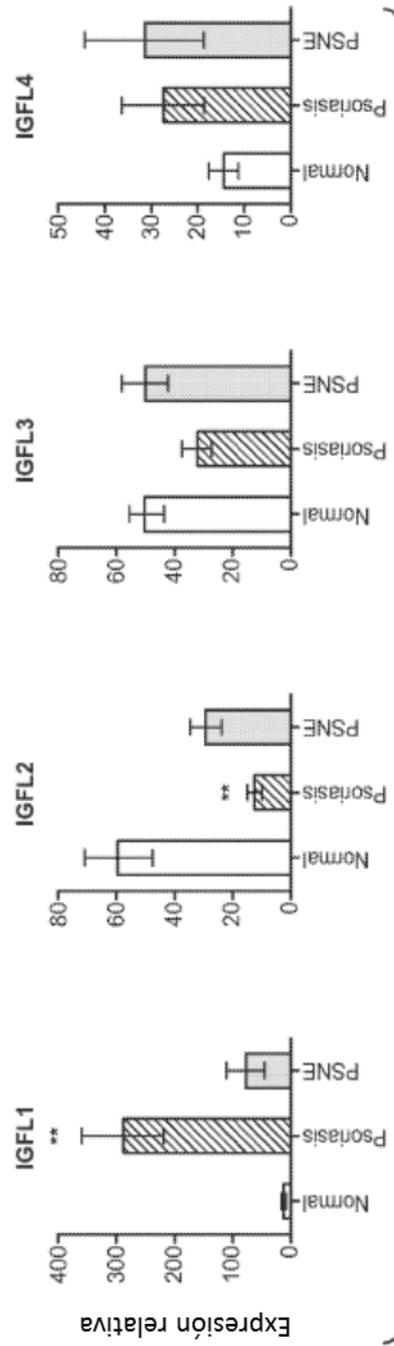


**FIG. 22C**

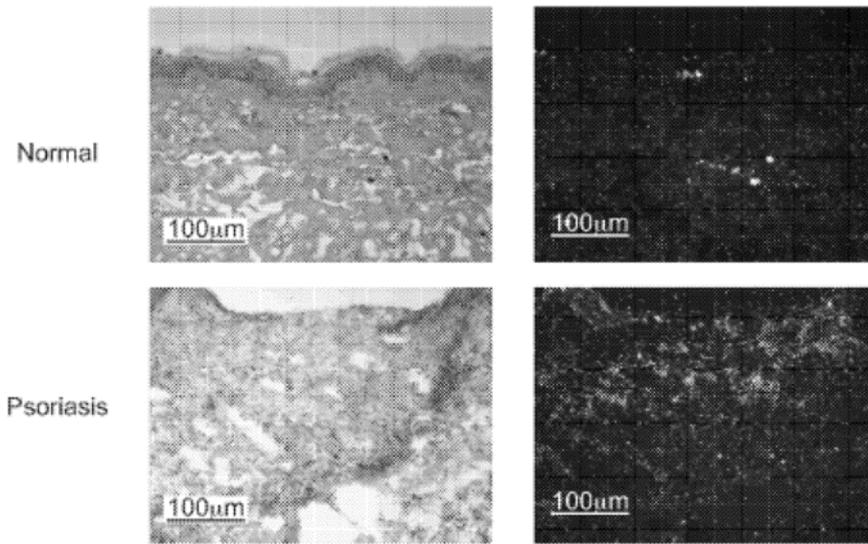




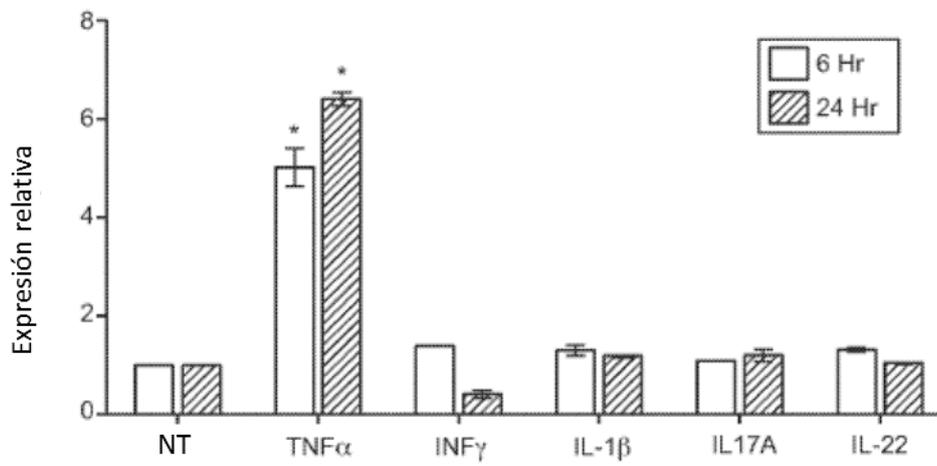
**FIG. 24A**



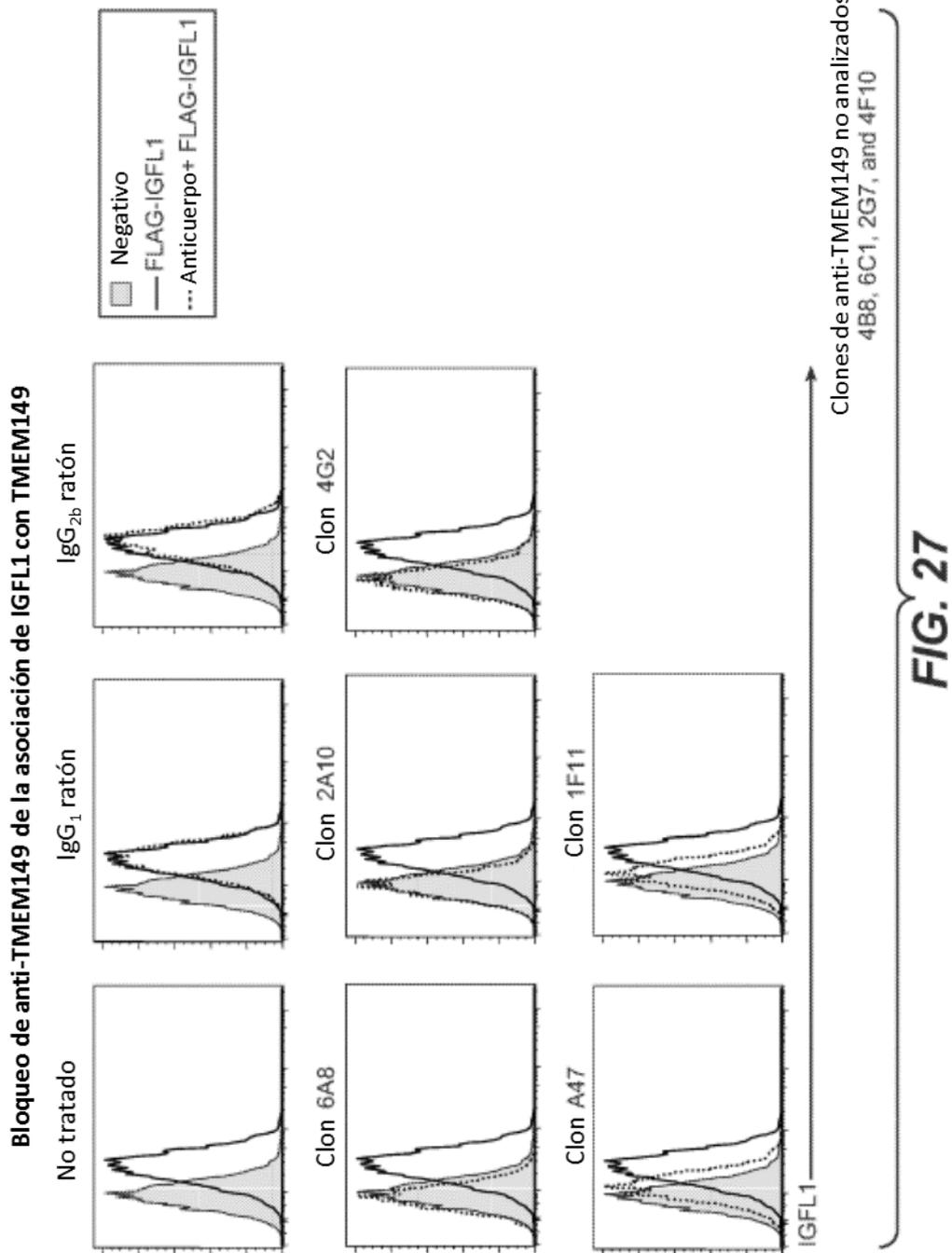
**FIG. 24B**

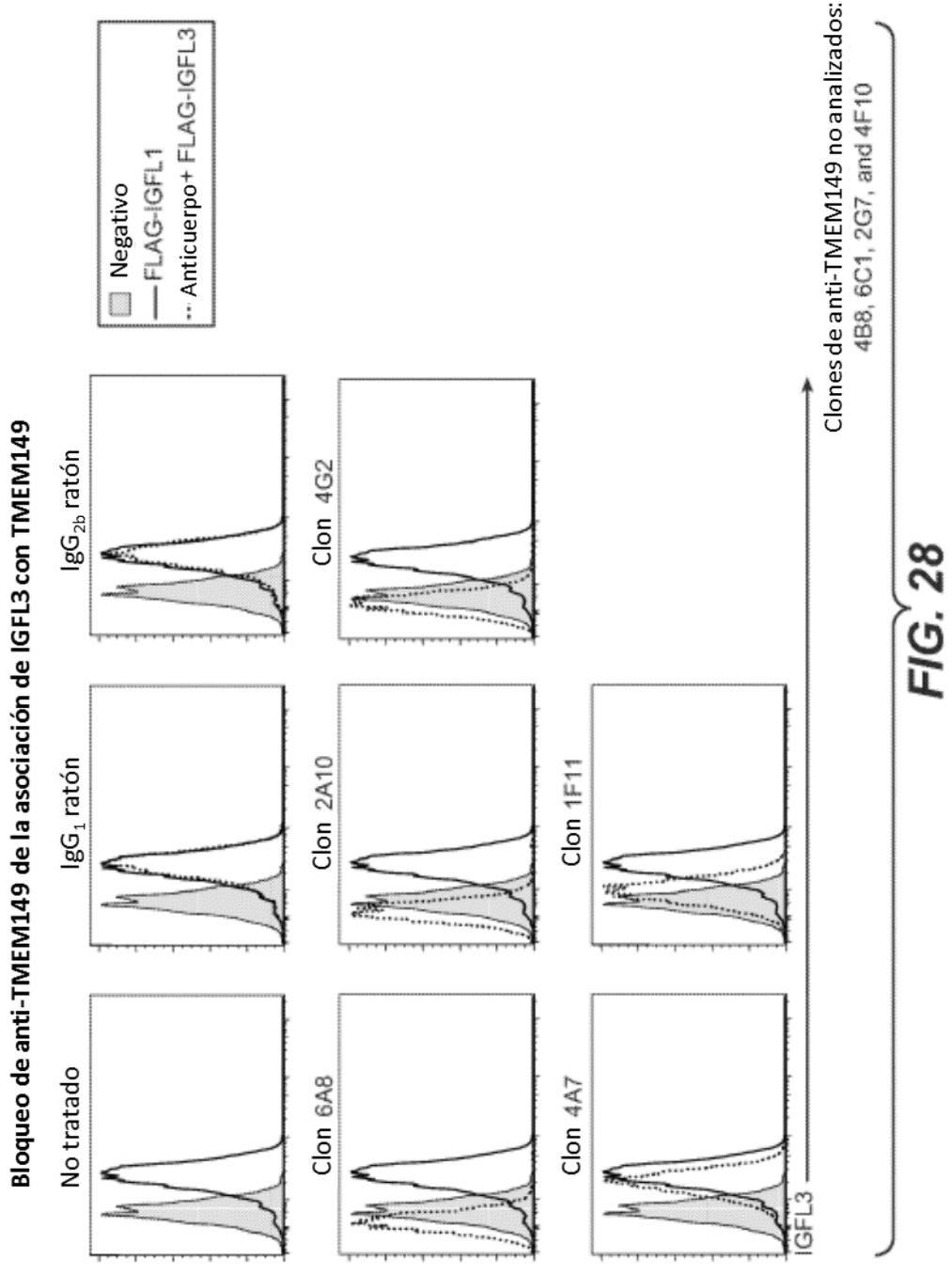


**FIG. 25**



**FIG. 26**





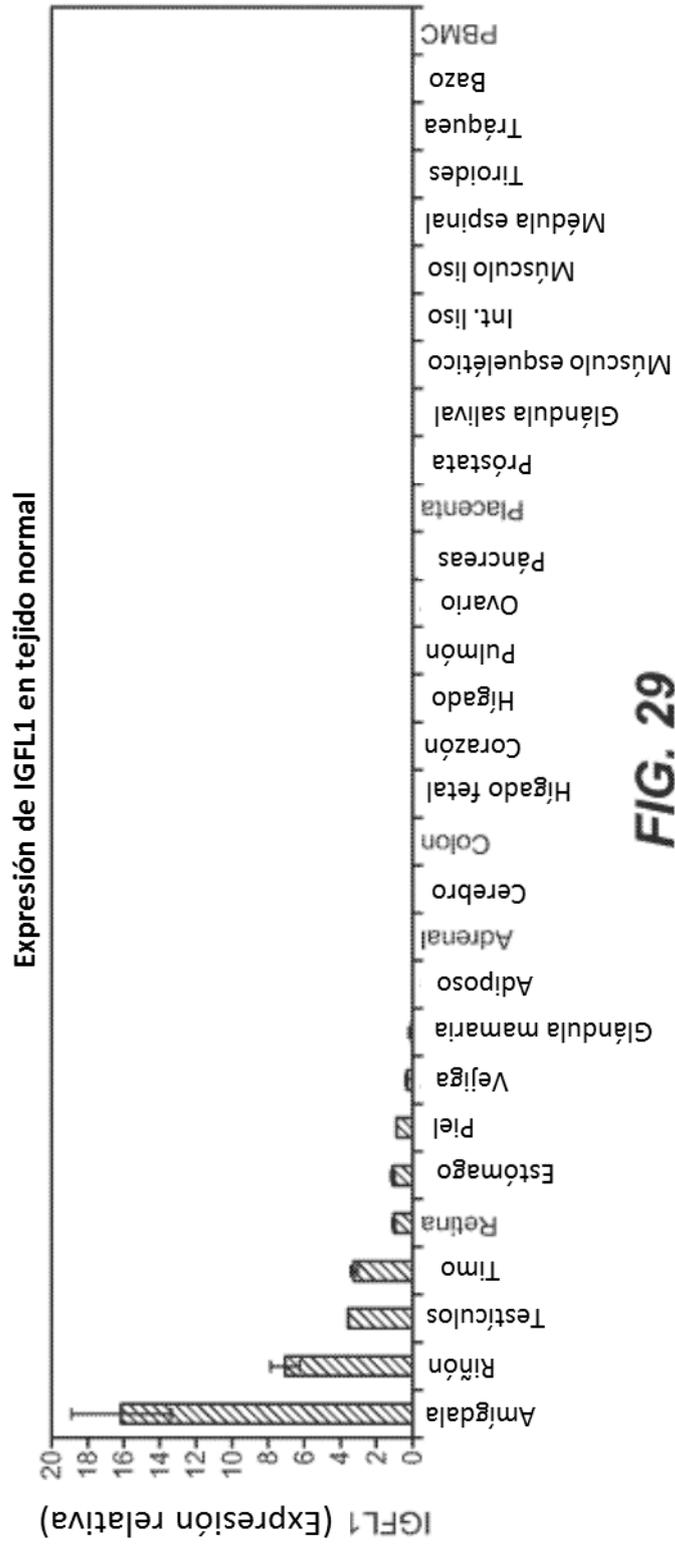
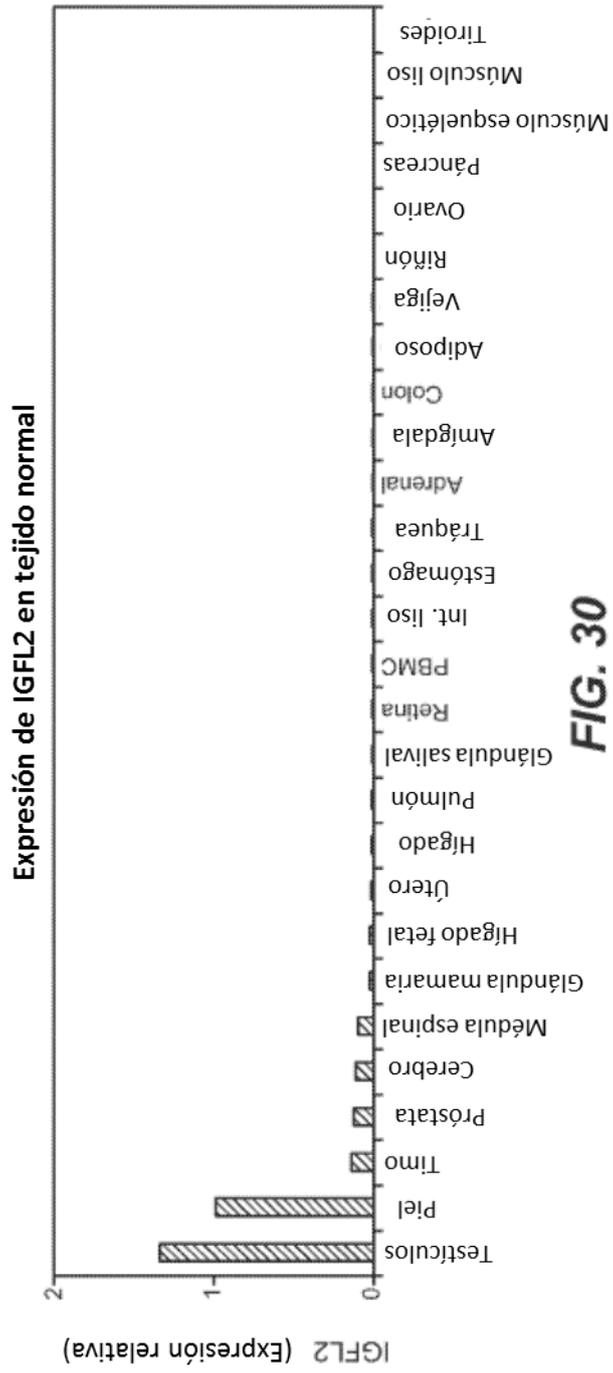


FIG. 29



**FIG. 30**

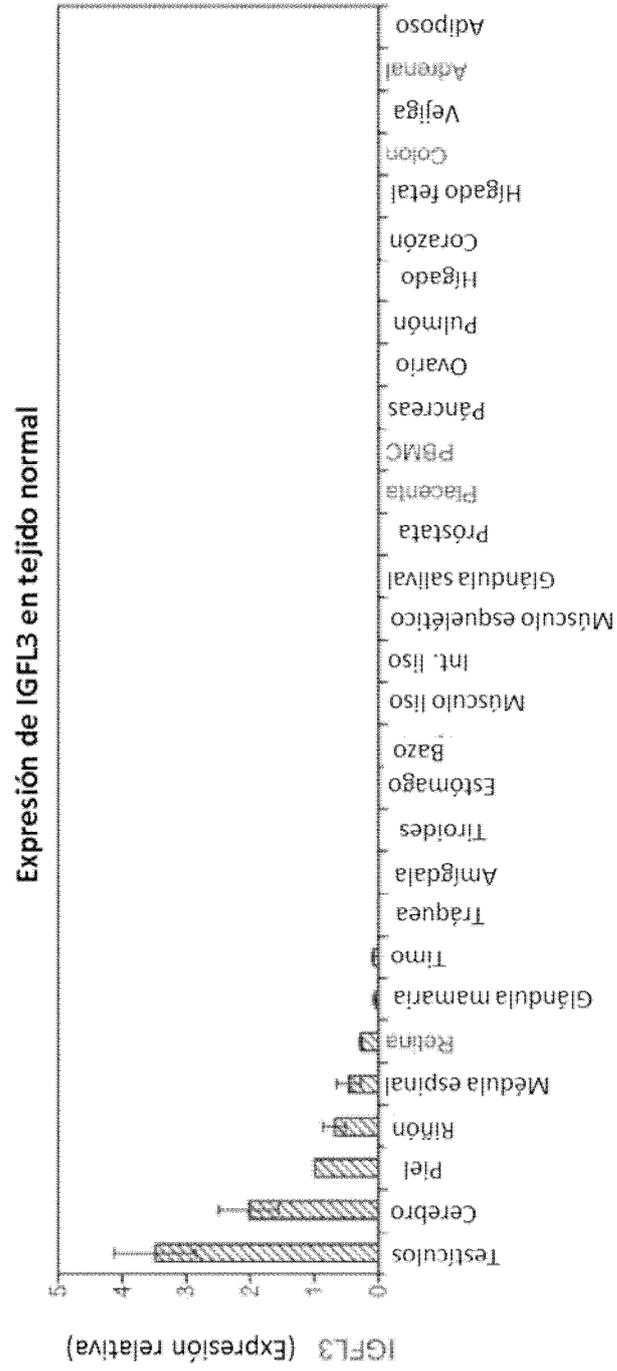


FIG. 31