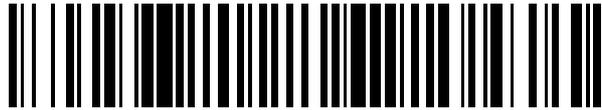


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 328**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2009 PCT/IL2009/000919**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2010 WO10035259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2009 E 09740767 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 2364162**

54 Título: **Métodos para diagnosticar y tratar la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B en base a la detección e inhibición de CD84**

30 Prioridad:

23.09.2008 US 136651 P

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

29.12.2020

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LTD. (100.0%)**

**At The Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SHACHAR, IDIT;
BINSKY, INBAL y
SOBOTTA, MIRKO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 800 328 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para diagnosticar y tratar la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B en base a la detección e inhibición de CD84.

5 En individuos normales, el conjunto de linfocitos periféricos es de tamaño constante. El control de la homeostasis linfocítica es el resultado de un equilibrio muy estrecho entre la producción, la supervivencia y la proliferación de linfocitos. Se ha demostrado que los factores de supervivencia desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis de los linfocitos.

10 La leucemia linfocítica crónica (CLL, de sus siglas en inglés), la leucemia más común en el mundo occidental se caracteriza por la acumulación progresiva de linfocitos maduros pequeños CD5⁺, en la sangre periférica, órganos linfoides y médula ósea. El sello distintivo de la enfermedad es la disminución de la apoptosis, lo que da como resultado la acumulación de estas células malignas. A pesar de los grandes avances en los últimos años en la comprensión de la biología y la fisiopatología de la enfermedad, así como del desarrollo de mejores modalidades de tratamiento, la CLL sigue siendo incurable en la mayoría de los pacientes, e incluso el control de la enfermedad requiere de un tratamiento agresivo con efectos secundarios significativos. Una mejor comprensión de los eventos celulares involucrados en la patogénesis y la progresión de la enfermedad debería conducir a terapias más específicas y menos tóxicas, con un tratamiento temprano en pacientes en riesgo, que posiblemente permita la cura.

15 Estudios anteriores han demostrado que los linfocitos de la CLL expresan cantidades relativamente grandes del ARNm de CD74 (cadena invariable; li) en comparación con las células B normales, y este receptor regula la supervivencia celular de una manera dependiente de IL-8.

20 CD74 es una proteína de membrana integral de tipo II no polimórfica que se expresa en las células presentadoras de antígenos, incluidos los macrófagos y las células B. Tiene una cola citoplasmática N-terminal corta de 28 aminoácidos (aa), seguida de una sola región transmembrana de 24 aa, y un dominio luminal de aproximadamente 150 aa. Inicialmente, se pensó que la cadena CD74 funcionaba principalmente como una chaperona MHC de clase II, que promueve la salida ER de las moléculas MHC de clase II, las dirige a los compartimentos endocíticos, evita la unión de péptidos dentro del ER, y contribuye a la edición de péptidos en el compartimento de las moléculas MHC de clase II. Una pequeña proporción de CD74 se modifica mediante la adición de sulfato de condroitina (CD74-CS), y esta forma de CD74 se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Anteriormente se demostró que el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) se une al dominio extracelular CD74 en los macrófagos, un proceso que da como resultado el inicio de una vía de señalización en estas células. El MIF promueve la activación de monocitos/macrófagos y es necesario para la expresión óptima de TNF, IL-1 y PGE₂. Los macrófagos activados por MIF son más fagocíticos y más capaces de destruir los patógenos intracelulares, tales como *Leishmania*.

CD44 es una proteína transmembrana de un solo paso ampliamente expresada con propiedades activadoras de quinasas conocidas.

35 Recientemente, CD44 se describió como un componente integral del complejo receptor CD74. Mientras que CD74 es suficiente para la unión de MIF a la superficie celular, se descubrió que CD44 era necesario para la transducción de señales de MIF. El CD74 expresado en las células B está directamente involucrado en la configuración del repertorio de células B mediante la regulación de la supervivencia de las células B maduras [Shachar et al. Science. 1996;274:106-108; Matza et al. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2002;99:3018-3023; Matza et al. 2003 Trends Immunol. 24:246-248] a través de una vía que conduce a la activación de la transcripción mediada por el homodímero NF-κB p65/RelA y su coactivador, TAFII105 [Matza et al. J Biol Chem. 2001;276:27203-27206]. La activación de NF-κB está mediada por la región citosólica de CD74 (CD74-ICD), que se libera de la membrana [Matza et al. Immunity. 2002;17:549-560]. Después de la eliminación del dominio luminal CD74, se produce un evento de escisión intramembrana en el aminoácido 42, que da como resultado la liberación del fragmento citosólico CD74 (CD74-ICD; 1-42 aa). Después CD74-ICD se transloca al núcleo celular y activa NF-κB [Becker-Herman Cell. 2005; 16:5061-5069]. Por tanto, siguiendo este paso de procesamiento, CD74 actúa como una molécula de señalización que induce la acumulación de células B maduras. Esta señal se atenúa por la degradación del fragmento CD74-ICD activo, y su eliminación del citoplasma. Por otra parte, la estimulación de CD74 por MIF conduce a la activación de NF-κB, permitiendo la entrada de las células B estimuladas en la fase S, un aumento en la síntesis de ADN, división celular, y expresión aumentada de proteínas anti-apoptóticas de una manera dependiente de CD44. Estos hallazgos indican que la superficie CD74 funciona como un receptor de supervivencia.

55 Curiosamente, tanto el MIF como CD74 se han asociado con la progresión tumoral. Se informó que el ARNm de MIF se sobre-expresa en varios tumores y que el MIF también se ha asociado con el crecimiento de células malignas [Bando et al. Jpn J Cancer Res. 2002;93:389-396; Nishihira et al. Ann N Y Acad Sci. 2003;995:171-182]. Muchos estudios han demostrado la sobre-expresión de CD74 en varios tipos de cáncer, incluida la CLL [Narni et al. Blood. 1986;68:372-377]. Se ha sugerido que la expresión de CD74 en muchos de estos cánceres sirve como factor pronóstico, con una mayor expresión relativa de CD74 que se comporta como un marcador de progresión tumoral [Mizue et al. Int J Mol Med. 2000;5:397-403]. La activación de CD74 por MIF en células B de CLL, inicia una cascada de señalización que contribuye a la progresión del tumor. Esta vía induce la activación de NF-κB, lo que da como

resultado la secreción de interleuquina 8 (IL-8), que a su vez promueve la supervivencia celular. El bloqueo de esta vía conduce a una disminución de la supervivencia celular. Por tanto, CD74 expresado en la superficie de las células B de CLL desempeña un papel crítico en la regulación de la supervivencia de estas células malignas [Binsky et al. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2007;104:13408-13413]. Las moléculas que participan en la señalización de CD74 pueden, por tanto, emplearse como nuevos objetivos y en la generación de plataformas terapéuticas para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica.

CD84 es un miembro del subconjunto CD2 de la superfamilia de inmunoglobulinas de las moléculas de la superficie celular. Es una proteína de superficie celular de cadena sencilla con una porción extracelular de 199 aa, que contiene cuatro sitios potenciales de N-glicosilación. La región transmembrana consiste en 25 aa, y la cola citoplasmática de 83 aa contiene cuatro tirosinas [de la Fuente et al. Blood. 1997;90:2398-2405]. El CD84 humano es 57,3% idéntico al CD84 murino. CD84 se expresa predominantemente por células B, células T, plaquetas, monocitos, células dendríticas (DCs), y CD84 también se expresa de forma temprana en la hematopoyesis [Calpe et al. Advances in Immunology, Vol 97. 2008;97:177-250].

Basado en la expresión de CD84, las células B se pueden subdividir en poblaciones CD84^{hi} y CD84^{lo}. La población CD84^{hi} representa un subconjunto de células B de memoria, que se caracterizan por la co-expresión de CD27, genes de la región variable de Ig mutados somáticamente, y una proliferación aumentada en respuesta a CD40L e IL-4, en comparación con las células B CD84^{lo}.

Sin embargo, no se conoce el papel de CD84 en la biología de estas células. Una característica sorprendente del CD84 humano es la expresión de una serie compleja de isoformas con varias colas citoplasmáticas en células tumorales [Palou et al. Tissue Antigens. 2000;55:118-127]. La expresión y relevancia funcional de estas variantes aún se desconocen. Hasta la fecha se han descrito dos transcripciones de CD84 en tejidos murinos. CD84 se auto-asocia fuertemente con un Kd en el intervalo submicromolar; la asociación está dirigida por el dominio Ig-V, formando un dímero homofílico ortogonal.

Técnica relacionada adicional:

La solicitud de Patente de EE.UU. Número 20050027114 describe métodos para tratar enfermedades, tales como la leucemia crónica, mediante el empleo de un agonista o antagonista de una actividad de un polipéptido similar a CD84.

La solicitud de Patente de EE.UU. Número 20050025789 describe el tratamiento o la profilaxis de tumores en pacientes, utilizando un polipéptido coestimulador (por ejemplo, CD84) que expresa células tumorales para producir una vacuna para aumentar la actividad lítica de las células NK.

YAN QINGRONG ET AL, se refiere a "Structure of CD84 provides insight into SLAM family function", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (200706), vol. 104, nº 25, ISSN 0027-8424, páginas 10583-10588.

BROWN M H ET AL, se refiere a "2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 19981207 US, (19981207), vol. 188, nº 11, ISSN 0022-1007, páginas 2083-2090.

Compendio de la invención

La presente descripción se refiere a un método para diagnosticar la B-CLL en un sujeto que lo necesita, el método comprende determinar en una muestra biológica del sujeto un nivel de isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 30), en donde un aumento en dicho nivel de dicha isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 30), por encima de un límite predeterminado con respecto a un nivel de dicho CD84 en una muestra biológica de un individuo sano, es indicativo de la B-CLL.

La presente descripción también se refiere a un agente que disminuye la actividad o expresión de CD84 para su uso en el tratamiento de la B-CLL, en donde dicho agente se selecciona del grupo que consiste en:

(i) un anticuerpo neutralizante de CD84;

(ii) un agente de ácido nucleico para disminuir la expresión de dicho CD84, seleccionándose dicho agente de ácido nucleico del grupo que consiste en un antisentido, un ARNsi, una ribozima y una ADNzima; y

(iii) un CD84 soluble, en donde dicho CD84 soluble se une a CD84 expresado en

células B e inhibe su interacción homofílica.

Preferiblemente, dicha muestra biológica comprende células B y en donde dicha determinación es en dichas células B.

Preferiblemente, dicha determinación se efectúa a nivel del ARNm.

Preferiblemente, dicha determinación se efectúa a nivel proteico.

Preferiblemente, comprende además corroborar el diagnóstico empleando un ensayo de diagnóstico seleccionado de la expresión de marcador de superficie distintivo de dicha isoforma C de CD84, análisis de cariotipo y mutaciones de línea germinal.

- 5 Preferiblemente, comprende además informar al sujeto de la enfermedad.

Breve descripción de los dibujos

10 En la presente memoria se describen algunos aspectos de la divulgación, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de aspectos de la divulgación. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo se pueden practicar los aspectos de la divulgación.

En los dibujos:

15 Las figs. 1A-B muestran una expresión elevada de hCD84 en células de B-CLL. Se purificaron las células B derivadas de sujetos sanos (normales), así como de pacientes con B-CLL de estadio temprano y avanzado. (A) El ARNm de CD84 se analizó por RT-PCR. Los resultados presentados son representativos de 2 pacientes normales, 6 en estadio temprano, y 6 en estadio B-CLL avanzado. (B) Las células se tiñeron con anti-CD84. Los histogramas muestran la expresión de CD84 en B-CLL, así como en células B normales. Los resultados presentados son representativos de 2 pacientes normales, 7 en estadio temprano, y 6 en estadio B-CLL avanzado.

20 Las figs. 2A-D muestran que CD84 es un gen diana de CD74 en células de B-CLL. (A, B) Se purificaron las células B derivadas de pacientes con B-CLL. Las células se incubaron en presencia o ausencia de MIF. (A) Después de 18 horas, se purificó el ARN, y se analizó el ARNm de CD84 y actina. Los resultados presentados son representativos de 6 pacientes con B-CLL temprana y 4 en estadio B-CLL avanzado. (B) Después de 24 horas, las células se tiñeron con anti-CD84. Los histogramas muestran la expresión de CD84 en B-CLL. Los resultados presentados son representativos de 3 pacientes con B-CLL temprana y 6 en estadio B-CLL avanzado. (C, D) Las células de B-CLL se incubaron en presencia o ausencia de MIF (100 ng/ml), ISO-1 (20 mM). (C) Después de 18 horas, se purificó el ARN y se analizaron los niveles de ARNm de CD84 y actina. Los resultados presentados son representativos de 4 pacientes con B-CLL. (D) Después de 24 horas, las células se tiñeron con anti-CD84. Los histogramas muestran la expresión de CD84 en B-CLL. Los resultados presentados son representativos de 5 pacientes con B-CLL.

30 Las figs. 3A-B muestran que la activación de la superficie celular CD84 inicia la fosforilación de tirosina y una cascada de supervivencia en células de B-CLL. Las células de B-CLL se incubaron en presencia o ausencia de anti-CD84 (1 ng/ml) durante 30 minutos. Después las células se lavaron, y el mAb unido se entrecruzó con F(ab')₂ de cabra Ig anti ratón. (A) Las células se inmunoprecipitaron con anti-pTyr durante la noche y se lisaron. Los lisados se separaron en SDS/PAGE al 8% (p/vol) y se secaron con anticuerpo anti-CD84 (los resultados presentados son representativos de 3 experimentos separados). (B) Después de 18 horas, se purificó el ARN y se analizaron los niveles de ARNm de Bcl-2, IL-8 y actina. Los resultados presentados son representativos de 7 pacientes con B-CLL.

40 Las figs. 4A-B muestran que la activación de la superficie celular de CD84 inicia una cascada de supervivencia en células HEK 293. Células HEK-293 transfectadas con CD84 de longitud completa (FL) o con construcciones de plásmidos vacías. (A) Después de 8 horas, se purificó el ARN y se analizaron los niveles de CD84, Bcl-2 y ARNm de actina. Los resultados presentados son representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares. (B) Después de 24 horas, las células se lisaron mediante SDS caliente, y los lisados se separaron luego en SDS/PAGE al 12% (p/vol) y se secaron con anticuerpo anti-Myc, anti-Bcl-2 y tubulina, seguido de anticuerpos HRP anti-ratón. Los resultados mostrados representan 8 experimentos independientes con resultados similares.

45 La fig. 5 muestra que la activación de la superficie celular de CD84 induce a una cascada de supervivencia en células B-CLL. Las células de B-CLL se incubaron en presencia o ausencia de anti-CD84 (1 ng/ml) durante 30 minutos. Después las células se lavaron, y el mAb unido se entrecruzó con F(ab')₂ de cabra Ig anti ratón durante 26 horas. Las células se tiñeron con anexina V, PI y se analizaron mediante FACS. Los resultados presentados son representativos de 7 pacientes con B-CLL.

50 Las figs. 6A-B muestran análisis de ARNm que codifica las isoformas de CD84. El ARN total, aislado de linfocitos B humanos (ya sea una persona de control sana, pacientes con B-CLL en estadio I o estadio IV) se sometió a RT-PCR semicuantitativa con actina como gen de referencia y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Los resultados mostrados son ejemplos para la sobreexpresión de CD84C en pacientes con B-CLL. Los tamaños de producto de PCR correspondientes para las diferentes isoformas son: a-477 pb; b-459 pb; c-426 pb; d- 500 pb; e- 272 pb. Las flechas a la izquierda indican la identidad de los productos de RT-PCR.

55 La fig. 7 es una ilustración esquemática del CD84- construcción completa y versiones mutadas de tirosina. Lp Péptido líder; IgV Dominio de inmunoglobulina tipo V; inmunoglobulina tipo C2; TM-transmembrana; CD dominio citoplasmático; myc/His- diferentes marcadores. Las designaciones de aminoácidos de una letra están arriba de los

diagramas. "N" indica el sitio previsto de N-glicosilación, "C" interconectada indica enlaces disulfuro. Longitud del constructo 367 aminoácidos.

Las figs. 8A-D describen las mutaciones dobles de CD84 (Y262/Y299 o Y279/Y324) y sus efectos sobre la regulación a la baja de Bcl-2 en células 293 transfectadas con CD84: las figuras 8A-C – células 293 se transfectaron con el vector vacío, CD84 completo, CD84(Y262F, Y299F)=A2 y CD84 (Y279F, Y324F)=B2. Figura 8A- se purificó el ARN 18 horas después de la transfección. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando cebadores para Bcl-2 y RP-2. qRTPCR- Los resultados se expresan como un número de veces de cambio en la expresión de Bcl-2 en comparación con vacío, que se definió como 1. N = 3 transfecciones. Figura 8B - 40 horas después los lisados de las células de transfección se sometieron a análisis mediante SDS-PAGE al 12% y Western blot. El gráfico muestra la media en el número de veces en la expresión de Bcl-2 de 6 experimentos diferentes. Figura 8C - 6 horas después de la transfección, se repuso el medio y el CD84 se activó usando el anticuerpo activador CD84. 24 horas después, las células se cosecharon y se sometieron a SDS-PAGE al 12% y al análisis de Western blot para la expresión de Bcl-2. El gráfico muestra la media en el número de veces en la expresión de Bcl-2 de 4 experimentos diferentes. Figura 8D- se transfectaron células 293 con vector vacío, CD84 completo o CD84 completo más CD84-ECD. Las células se sometieron a SDS-PAGE al 12% y al análisis de Western blot para la expresión de Bcl-2. Los resultados presentados son representativos de 5.

La fig. 9 muestra que la sobre-expresión de CD84 no mutado y mutado por tirosina afecta la expresión de Tap63. Las células HEK 293T se transfectaron con pEF4 (vector vacío), Cd84-completo (no mutado) y mutaciones dobles de CD84 como se indica. 8 horas o 32 horas después de la transfección, las células se sometieron a RT-PCR semicuantitativa con actina como gen de referencia, seguido del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

Las figs. 10A-D muestran el diseño, purificación e identificación de CD84-ECD. (dominio extracelular). (A) El esquema se dibuja a escala real. Véanse las abreviaturas como en la Figura 7 anterior. Longitud del constructo es de 330 aminoácidos. (B, C) Se analizaron muestras de diferentes etapas de purificación en SDS-PAGE al 12% y análisis de Western blot con anticuerpo anti-Myc (B) o tinción con Coomassie (C). El medio acondicionado (calle 7) se purificó con Ni²⁺ - cromatografía de afinidad de quelatos metálicos (carriles 1 + 5), seguida de cromatografía de exclusión por tamaño. Los carriles 2-4 muestran las fracciones máximas de la cromatografía de exclusión por tamaño. (D) identificación del constructo de CD84 por ESI-MS/MS. El fragmento de gel eliminado del gel teñido con Coomassie (c, carril 3) se analizó mediante proteólisis limitada seguido de ESI-MS/MS. Los péptidos emparejados para CD84 se resaltan en rojo. Este análisis fue realizado por la Unidad de Servicio Biológico del Instituto Weizmann.

La fig. 11 es un gráfico del perfil de elución de cromatografía de exclusión por tamaño-FPLC (SEC-FPLC) para la proteína CD84-ECD. El gráfico muestra un perfil de elución típico a 215, 260 y 280 nm. Los picos correspondientes a la fracción analizada se indican mediante barras marcadas con el pico 1-3. La separación se realizó en la columna GE Healthcare HiLoad 16/60 Superdex 200.

Las figs. 12A-C son fotomicrografías que muestran el efecto de bloqueo de CD84-ECD sobre la activación inducida por CD84-Bcl-2. (A) Las células HEK 293T se transfectaron con 2 µg de pEF4 (vector vacío), 2 µg de CD84 completo o 1 µg de CD84-ECD para proporcionar una cantidad final de 2 µg de ADN. Las células se sometieron a SDS-PAGE al 12% y Western blot como se indica. (B) Las células HEK 293Y se transfectaron con cantidades iguales de pEF4 (vector vacío) y CD84-ECD y se sometieron a SDS-PAGE al 12% y Western blot como se indica. (C) Análisis de Western blot de células transfectadas y cotransfectadas (cantidad igual de ADN completo de CD84). Las células HEK 293T se transfectaron con 2 µg de pEF4 (vector vacío), 2 µg de CD84 completo o 2 µg de CD84-ECD más 2 µg de CD84-ECD y se sometieron a SDS-PAGE al 12% y análisis de Western blot como se describió anteriormente. La cantidad total de ADN se mantuvo constante mediante la adición de plásmido pEF4 vacío.

La fig. 13 muestra el efecto de CD84-ECD sobre la expresión de Bcl-2. La línea celular CD84s20 o las células HEK 293T se transfectaron con pEF4 (vector vacío) o CD84-ECD. Veinticuatro horas después de la transfección, se aisló el ARN total, se sometió a RT-PCR para los genes indicados.

La fig. 14 muestra el efecto del medio acondicionado CD84-ECD sobre la expresión de Bcl-2. La superficie CD84 de la línea celular CD84s20 estaba o no estaba entrecruzada con anticuerpos anti-CD84 y anti-Fab en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de CD84-ECD. Veinticuatro horas después del tratamiento, se aisló el ARN total, y se realizó RT-PCR para Bcl-2 y actina.

Las figs. 15A-C muestran que un anticuerpo bloqueador anti CD84 induce la muerte de B-CLL. Las células de B-CLL se incubaron en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueadores de MIF y CD84. Figura 15A - Después de 18 horas, se purificó el ARN. Se analizaron los niveles de ARNm de Bcl-2 y actina. N = 4 pacientes. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando cebadores para Bcl-2 y RP-2. qRTPCR- Los resultados se expresan como el número de veces de cambio en la expresión de Bcl-2 por las células estimuladas en comparación con las células no estimuladas, que se definió como 1. N = 3 pacientes. Figura 15B - las células se lisaron después de 24 horas de exposición al anticuerpo bloqueador de MIF y CD84, y se analizaron la expresión de Bcl-2 y tubulina mediante análisis de Western blot. Figura 15C - 27 horas después de la aplicación del anticuerpo de bloqueo de MIF y CD84,,

las células se tiñeron con FLICA, y se analizaron mediante FACS. N=5 pacientes.

Las figs. 16A-B muestran el efecto de Ab del hibridoma D1-300, F8-200 y F8-500 (diferentes concentraciones del anticuerpo) sobre la supervivencia de la B-CLL. Figura 16A - Las células de B-CLL se incubaron en presencia o ausencia de medio acondicionado derivado del hibridoma D1-300 o F8-200 durante 18 horas. El ARN se purificó. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando cebadores para Bcl-2 y RP-2. qRT-PCR- Los resultados se expresan como el número de veces de cambio en la expresión de Bcl-2 por las células estimuladas en comparación con las células no estimuladas, que se definió como 1. N=3 pacientes. Figura 16B - las células se incubaron en presencia o ausencia de hibridoma sup durante 24 horas, las células se tiñeron con magic red, y se analizaron mediante FACS. N=1 paciente.

- 5
- 10 La Fig. 17 muestra el efecto de los anticuerpos del hibridoma F8-200 y F8-500 sobre la supervivencia de la B-CLL. Las células se incubaron en presencia o ausencia de MIF y medio acondicionado derivado del hibridoma F8-200 o F8-500 durante 24 horas, las células se tiñeron con red magic, y se analizaron mediante FACS. N=1 pacientes.

Descripción de aspectos de la divulgación

- 15 La presente descripción, en algunos aspectos de la misma, se refiere a composiciones y métodos para diagnosticar y tratar la B-CLL.

Antes de explicar al menos un aspecto de la divulgación en detalle, debe entenderse que la divulgación no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La divulgación es capaz de otros aspectos o de practicarse o llevarse a cabo de varias maneras.

- 20 La leucemia linfocítica crónica (CLL), una enfermedad maligna caracterizada por la acumulación de linfocitos B en la sangre, los órganos linfoides y la médula ósea, es el segundo tipo de leucemia más común en adultos, y representa alrededor de 7.000 nuevos casos de leucemia cada año. Actualmente, no existe una cura para la CLL, y el objetivo general del tratamiento de la leucemia es lograr una remisión. Por lo tanto, es altamente deseable identificar nuevas proteínas que puedan servir como dianas para inducir la muerte celular en las células malignas.

- 25 Los presentes inventores han identificado al CD84 como una proteína reguladora que es esencial para la supervivencia de las células de CLL. Como se ilustra a continuación y en la sección de Ejemplos de a continuación, los presentes inventores pudieron demostrar que las células B tomadas de pacientes con CLL expresan un alto nivel de isoforma C del CD84 en comparación con la expresión de la misma en células B de sujetos sanos libres de la enfermedad. La estimulación de CD84 por MIF, aumentó la supervivencia de la B-CLL, como lo demuestra la regulación al alza de Bcl-2 y la reducción de la tinción de anexina, siendo todo indicativo de una señal de supervivencia. Sin embargo, la inhibición de la actividad de CD84 con un anticuerpo de bloqueo o un péptido de bloqueo derivado de CD84, regulaba a la baja la expresión de Bcl-2, induciendo así la muerte celular. Por lo tanto, los presentes hallazgos establecen a CD84 como un marcador de diagnóstico para la B-CLL y, al ser un regulador de la supervivencia de B-CLL, como una diana para el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas. Por tanto, según un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para diagnosticar la B-CLL en un sujeto que lo necesita. El método comprende determinar en una muestra biológica del sujeto un nivel de la isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 30), en donde un aumento en dicho nivel de dicha isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 30) más allá de un límite predeterminado con respecto a un nivel de dicho CD84 en una muestra biológica de un individuo sano es indicativo de la B-CLL.

- 40 Como se emplea en la presente memoria, el término "diagnóstico" o "diagnosticar" se refiere a clasificar una patología (por ejemplo, cáncer, por ejemplo, leucemia, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica (CLL), por ejemplo, B-CLL).

- 45 Según este aspecto de la divulgación, el término "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano que tiene un chequeo de rutina o un examen de la patología, así como a un sujeto que está en riesgo de tener la patología, tal como debido a antecedentes familiares, factores ambientales y/o un sujeto que muestra signos clínicos sospechosos de la patología. Algunos signos clínicos de la B-CLL incluyen, pero no se limitan a, predisposición a infecciones repetidas, tal como neumonía, herpes simple labial, y herpes zoster; ganglios linfáticos agrandados; saciedad temprana y/o molestias abdominales que pueden estar relacionadas con un bazo agrandado; sangrado mucocutáneo y/o petequias que pueden deberse a trombocitopenia; cansancio y fatiga secundaria a anemia; fiebres, escalofríos y sudores nocturnos y pérdida de peso; anemia hemolítica autoinmune.

- 50 Como se emplea en la presente memoria, el término "B-CLL" o "CLL" se refiere a una proliferación neoplásica anormal de células B. Se considera que la CLL es idéntica a una enfermedad llamada linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL), un tipo de linfoma no Hodgkin que se presenta principalmente en los ganglios linfáticos. La Organización Mundial de la Salud considera que la CLL y el SLL presentan diferentes etapas de la misma enfermedad [Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M (2005). "Chronic lymphocytic leukemia". *N. Engl. J. Med.* 352(8): 804-15].

- 55 Como se emplea en la presente memoria, la frase "isoforma C D84" se refiere a la isoforma de CD84 que se asigna con los Números de Acceso AF054815.1 NP_003865.1 (NM 003874, Q9UIB8-3). SEQ ID NOs: 29, 30.

Ejemplos de "muestras biológicas" incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, fluidos linfáticos, y diversas secreciones externas de las vías respiratorias, tractos intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, así como glóbulos blancos, tejidos, cultivo celular, por ejemplo, cultivo primario. Según un aspecto específico, la muestra biológica comprende células B.

5 Las células de B-CLL pueden obtenerse de la sangre, la médula ósea, el bazo y/o los ganglios linfáticos.

El nivel de la isoforma C de CD84 se puede determinar a nivel de la proteína (nivel de expresión y/o actividad) o a nivel del ARNm (por ejemplo, RT-PCR, PCR en tiempo real, etc.).

A continuación, se incluye una lista no limitante de ejemplos de métodos para determinar un nivel de CD84C.

10 *Ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA):* Este método implica una reacción entre una enzima y un sustrato. Una muestra biológica que comprende CD84C se coloca en un plato de micropocillos. Se aplica un anticuerpo específico de sustrato acoplado a una enzima y se deja que se una al sustrato. Después se detecta la presencia del anticuerpo y se cuantifica mediante una reacción colorimétrica que emplea la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas empleadas comúnmente en este método incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. Si está bien calibrado y dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es
15 proporcional a la cantidad de color producido. Generalmente se emplea un estándar de sustrato para mejorar la precisión cuantitativa.

20 *Western blot:* Este método implica la separación de un sustrato de otra proteína por medio de un gel de acrilamida seguido de la transferencia del sustrato a una membrana (por ejemplo, nylon o PVDF). Después se detecta la presencia del sustrato por anticuerpos específicos del sustrato, que a su vez se detectan mediante reactivos de unión a anticuerpos. Los reactivos de unión a anticuerpos pueden ser, por ejemplo, proteína A, u otros anticuerpos. Los reactivos de unión a anticuerpos pueden estar radiomarcados o unidos a enzimas como se describe anteriormente. La detección puede ser por autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad de sustrato como la determinación de su identidad mediante una posición relativa en la membrana que es indicativa de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante
25 la electroforesis.

Radio-inmunoensayo (RIA): En una versión, este método implica la precipitación de la proteína deseada (*es decir*, el sustrato) con un anticuerpo específico y una proteína de unión a anticuerpos radiomarcados (p. ej., proteína A marcada con I¹²⁵) inmovilizado en un vehículo precipitable, tal como perlas de agarosa. El número de recuentos en el sedimento precipitado es proporcional a la cantidad de sustrato.

30 En una versión alternativa del RIA, se emplean un sustrato marcado y una proteína de unión a anticuerpos no marcados. Se agrega una muestra que contiene una cantidad desconocida de sustrato en cantidades variables. La disminución en los recuentos precipitados del sustrato marcado es proporcional a la cantidad de sustrato en la muestra añadida.

35 *Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS):* Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células mediante anticuerpos específicos del sustrato. Los anticuerpos específicos del sustrato están unidos a los fluoróforos. La detección se realiza mediante una máquina de clasificación de células que lee la longitud de onda de la luz emitida por cada célula a medida que pasa a través de un haz de luz. Este método puede emplear dos o más anticuerpos simultáneamente.

40 *Análisis inmunohistoquímico:* Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células fijadas mediante anticuerpos específicos del sustrato. Los anticuerpos específicos del sustrato pueden estar unidos a enzimas o estar unidos a fluoróforos. La detección es por microscopía y evaluación subjetiva o automática. Si se emplean anticuerpos ligados a enzimas, puede ser necesaria una reacción colorimétrica. Se apreciará que la inmunohistoquímica a menudo va seguida de una contratiñación de los núcleos celulares empleando, por ejemplo, tinción con hematoxilina o Giemsa.

45 *Análisis de RT-PCR:* Este método utiliza la amplificación por PCR de moléculas de ARN relativamente raras. Primero, las moléculas de ARN se purifican de las células y se convierten en ADN complementario (ADNc) utilizando una enzima transcriptasa inversa (tal como una MMLV-RT) y cebadores, tales como oligo dT, hexámeros aleatorios o cebadores específicos de genes. Luego, aplicando cebadores específicos de gen y ADN polimerasa Taq, se lleva a cabo una reacción de amplificación por PCR en una máquina de PCR. Los expertos en la técnica son capaces de
50 seleccionar la longitud y la secuencia de los cebadores específicos del gen y las condiciones de PCR (*es decir*, temperaturas de re-asociación, número de ciclos, y similares) que son adecuadas para detectar moléculas de ARN específicas. Se apreciará que se puede emplear una reacción de RT-PCR semi-cuantitativa ajustando el número de ciclos de PCR y comparando el producto de amplificación con controles conocidos.

55 En la sección de Ejemplos de a continuación se describen adicionalmente ejemplos de anticuerpos y ensayos que se pueden emplear para detectar CD84C y otros marcadores de la presente descripción.

Como se mencionó, un aumento en el nivel del CD84C más allá de un límite predeterminado con respecto al nivel

del mismo en una muestra similar de un individuo sano es indicativo de la enfermedad (por ejemplo, B-CLL).

Como se emplea en la presente memoria, la frase "muestra biológica de un individuo sano" se refiere a una muestra de control no afectada tomada de un sujeto sano (conocido por no tener B-CLL) o del mismo sujeto antes del inicio de la B-CLL (es decir, sano). Como las características biológicas dependen, entre otras cosas, de la especie y la edad, es preferible que la saliva de control provenga de un sujeto de la misma especie, la edad. Alternativamente, los datos de control pueden tomarse de bases de datos y bibliografía. Se apreciará que la muestra de control también se puede tomar del sujeto enfermo en un punto de tiempo particular, para analizar la progresión (es decir, la monitorización) de la enfermedad.

El término "aumento" según el aspecto específico debe ser estadísticamente significativo.

- 10 Una vez que se realiza el diagnóstico, el sujeto puede ser informado de la enfermedad, es decir, de la presencia o ausencia de la misma y de potenciales terapias para la B-CLL.

Para mejorar la sensibilidad del ensayo, el método puede comprender además corroborar el diagnóstico empleando un ensayo de diagnóstico seleccionado de la expresión de marcador de superficie distintivo de dicha isoforma C de CD84, análisis de cariotipo y mutaciones de la línea germinal.

- 15 A continuación, se incluye una lista no limitante de dichos ensayos/marcadores que se pueden emplear para corroborar el diagnóstico de la B-CLL.

- 20 Marcadores de la superficie celular - los linfocitos de la B-CLL normalmente muestran antígenos de superficie de las células B, como se demuestra por los anticuerpos monoclonales CD19, CD20, CD21 y CD23. Además, expresan CD5, que se encuentra más comúnmente en las células T. Debido a que las células B CD5⁺ normales están presentes en la zona del manto (MZ) de los folículos linfoides, la B-CLL es probablemente una neoplasia maligna de una subpoblación basada en la MZ de células autorreactivas anérgicas dedicadas a la producción de autoanticuerpos naturales polirreactivos. Las células de la B-CLL expresan niveles extremadamente bajos de inmunoglobulina de membrana superficial, con mayor frecuencia inmunoglobulina M (IgM) o IgM/IgD y IgD. Además, también expresan niveles extremadamente bajos de una sola cadena ligera de inmunoglobulina (kappa o lambda).

- 25 Análisis genético - Se observa un cariotipo anormal en la mayoría de los pacientes con CLL. La anomalía más común es la eliminación de 13q, que ocurre en más del 50% de los pacientes. Las personas que muestran anomalías 13q14 tienen una enfermedad relativamente benigna que generalmente se manifiesta como linfocitosis aislada estable o lentamente progresiva.

- 30 La presencia de trisomía 12, que se observa en el 15% de los pacientes, se asocia con morfología atípica y enfermedad progresiva. La delección en el brazo corto del cromosoma 17 se ha asociado con una progresión rápida, una remisión corta, y una disminución de la supervivencia general en la CLL. Las delecciones de 17p13 se asocian con la pérdida de la función del gen supresor tumoral *p53*. Las delecciones de las bandas 11q22-q23, observadas en el 19% de los pacientes, se asocian con afectación extensa de los ganglios linfáticos, enfermedad agresiva y supervivencia más corta.

- 35 Técnicas más sensibles han demostrado anomalías del cromosoma 12. Del cuarenta al 50% de los pacientes no demuestran anomalías cromosómicas en estudios citogenéticos convencionales. Sin embargo, el 80% de los pacientes tendrán anomalías detectables por hibridación fluorescente in situ (FISH). Aproximadamente el 2-5% de los pacientes con B-CLL muestran un fenotipo de células T.

- 40 Las investigaciones también han identificado una serie de características y marcadores genéticos de alto riesgo que incluyen la cadena pesada variable de la inmunoglobulina de la línea germinal (IgV_H), uso de genes IgV_H V3-21, aumento de la expresión de CD38, aumento de la expresión de Zap70, niveles elevados de beta-2-microglobulina sérica, aumento de la actividad sérica de timidina quinasa, tiempo corto de duplicación de linfocitos (<6 meses) y aumento de los niveles séricos de CD23 soluble. Estas características se han asociado con la progresión rápida, remisión corta, resistencia al tratamiento, y acortamiento de la supervivencia general en pacientes con B-CLL.

- 45 Mutaciones de la línea germinal - Se ha demostrado que la línea germinal IgV_H indica un mal pronóstico. Los estudios han demostrado que estos pacientes también tienen una progresión más temprana de B-CLL después del tratamiento con quimioterapia. El empleo de ciertos genes, IgV_H, V3-21, también se han asociado con mal pronóstico independientemente del estado mutacional de IgV_H.

- 50 Los presentes inventores también han identificado a CD84 como un factor de supervivencia importante en la B-CLL y como tal como una diana para la intervención terapéutica.

Por tanto, según otro aspecto de la divulgación se proporciona un uso de un agente que disminuye la actividad o expresión de CD84 en la fabricación de un medicamento para tratar la B-CLL.

Según otro aspecto de la divulgación, se proporciona un uso de un agente que disminuye la actividad o expresión de CD84 para tratar la B-CLL.

Según otro aspecto de la divulgación se proporciona un método para inducir la apoptosis en células B de un sujeto que tiene B-CLL, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de un agente que disminuye la actividad o expresión de CD84, induciendo así la apoptosis en células B del sujeto.

5 Según otro aspecto de la divulgación se proporciona un método para tratar la B-CLL en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de un agente que disminuye la actividad o expresión de CD84, tratando así la B-CLL.

Según un aspecto terapéutico de la divulgación el sujeto se diagnostica con B-CLL.

10 CD84 se refiere a una isoforma expresada del gen CD84. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Q9UIB8-1, Q9UIB8-2, Q9UIB8-3, Q9UIB8-4, Q9UIB8-5, Q9UIB8-6 y Q9UIB8-7. Según un aspecto específico de este aspecto de la presente descripción la regulación a la baja de CD84 se refiere a todas las isoformas de CD84. Para este fin, se emplean preferiblemente agentes que reconocen todas las isoformas de CD84 (es decir, pan CD84).

15 Por tanto, la regulación a la baja de CD84 puede efectuarse a nivel genómico y/o de transcripción empleando una variedad de moléculas que interfieren con la transcripción y/o traducción (por ejemplo, antisentido, ARNsi, ribozima, ADNzima), o a nivel proteico empleando, por ejemplo, antagonistas, enzimas que escinden el polipéptido, y similares.

A continuación, se incluye una lista de agentes capaces de regular a la baja el nivel de expresión y/o la actividad de CD84.

20 Un ejemplo, de un agente capaz de regular a la baja un CD84, un polipéptido que contiene CDR, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a CD84. Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente a al menos un epítipo de una porción extracelular de CD84 y neutraliza/bloquea su actividad, tal como al interferir con sus interacciones homofílicas.

Tal polipéptido que contiene CDR (por ejemplo, anticuerpo) se puede producir a partir del hibridoma que se depositó en el CNCN Pateur Institut el 23 de septiembre de 2009 con el número de depósito CNCM I-4228 (F8).

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el parátipo de un anticuerpo.

Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones superficiales de moléculas activas químicamente, tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

30 El término "anticuerpo" como se emplea en esta descripción incluye moléculas intactas, así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv que son capaces de unirse a los macrófagos. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen como sigue: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, se puede producir mediante la digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de la reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F (ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (5) Anticuerpo de cadena simple ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unida mediante un conector de polipéptido adecuado como una molécula de cadena única fusionada genéticamente.

45 Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

50 Los fragmentos de anticuerpos según la presente descripción pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en E. coli o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir mediante la escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir adicionalmente empleando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática empleando pepsina produce dos fragmentos monovalentes Fab' y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, Patentes de EE.UU. N^{os} 4.036.945 y 4.331.647. Véase también Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]. También se pueden emplear

otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, la escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas, o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

5 Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al. [Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 69:2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables se pueden unir mediante un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzarse mediante productos químicos, tal como el glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas mediante un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped, tal como E. coli. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena de polipéptidos con un péptido conector que une los dos dominios V. Métodos para producir sFvs se describen, por ejemplo, mediante [Whitlow y Filpula, Methods 2:97-105 (1991); Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77 (1993); y la Patente de EE.UU. N° 4.946.778.

15 Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, empleando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de las células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)].

20 Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo., murinas) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab').sub.2 u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos forman una región determinante complementaria (CDR) del receptor que se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias marco o CDR importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá de forma sustancial la totalidad de al menos uno, y normalmente dos dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son los de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de importación, que generalmente se toman de un dominio variable de importación. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por CDR o secuencias de CDR de roedor. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de EE.UU. N° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluidas las bibliotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. De manera similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

Otra molécula que se puede emplear para regular a la baja la actividad de CD84 es una forma no funcional de CD84

que se une a CD84, pero inhibe su actividad de señalización, tal como inhibiendo sus interacciones homofílicas.

Por tanto, las presentes enseñanzas proporcionan además un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de un CD84 soluble (es decir, no unido a la membrana), en donde el CD84 soluble se une al CD84 expresado en las células B (por ejemplo, con una afinidad de unión de al menos 10^{-5} nM) e inhibe sus interacciones homofílicas.

Debido a su afinidad inherente hacia la porción extracelular de CD84, el agente CD84 soluble descrito en la presente memoria también se puede utilizar en los aspectos de diagnóstico descritos anteriormente, tales como mediante la conjugación de un mismo resto identificable (por ejemplo, una proteína fluorescente, fosfatasa alcalina, marcador myc/his, beta galactosidasa, y similares).

Según un aspecto específico, el CD84 soluble comprende un dominio extracelular de CD84 y carece de un dominio transmembrana de CD84.

Según un aspecto específico, el CD84 soluble se fusiona a un resto para aumentar la solubilidad del CD84 soluble.

Según un aspecto específico, el resto para aumentar la solubilidad del CD84 soluble es una secuencia de aminoácidos heteróloga o un resto químico, tal como PEG, y similares.

Como se emplea en la presente memoria la frase "secuencia de aminoácidos heteróloga" se refiere a una secuencia de aminoácidos que no forma endógenamente una parte de la secuencia de aminoácidos CD84. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos heteróloga no regula a la baja la actividad biológica (por ejemplo, apoptótica) del polipéptido CD84 soluble.

Por tanto, la secuencia de aminoácidos heteróloga puede servir para asegurar la estabilidad del CD84 soluble de la presente descripción sin comprometer su actividad. Por ejemplo, el polipéptido heterólogo puede aumentar la vida media de la molécula de CD84 soluble en el suero. Ejemplos de secuencias de aminoácidos heterólogas que se pueden usar según las enseñanzas de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina, galactosidasa, glucuronidasa, glutatión-S-transferasa (GST), péptido carboxilo terminal (CTP) de coriónico gonadotropina (hCG) y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) [véase, por ejemplo, Suzuki et al., mencionado anteriormente; y la Publicación de EE.UU. Nº 20030171551].

El sitio exacto de la fusión (conjugación) entre el resto para aumentar la solubilidad y la secuencia de aminoácidos de CD84 no es crítico. Generalmente, el resto para aumentar la solubilidad se localiza en el extremo amino o carboxilo (n-ter o c-ter, respectivamente) del polipéptido CD84 de la presente descripción. Los sitios particulares son bien conocidos en la técnica y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de las moléculas quiméricas de este aspecto de la presente descripción.

La secuencia de aminoácidos heteróloga se puede unir a la secuencia de aminoácidos de CD84 por cualquier enlace peptídico o no peptídico. La unión de la secuencia de aminoácidos de CD84 a la secuencia de aminoácidos heteróloga puede efectuarse mediante unión covalente directa (enlace peptídico o un enlace peptídico sustituido) o unión indirecta, tal como mediante el empleo de un conector que tiene grupos funcionales. Los grupos funcionales incluyen, sin limitación, un ácido carboxílico libre ($C(=O)OH$), un grupo amino libre (NH_2), un grupo éster ($C(=O)OR$, donde R es alquilo, cicloalquilo o arilo), un grupo haluro de acilo ($C(=O)A$, donde A es fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro), un haluro (fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro), un grupo hidroxilo (OH), un grupo tiol (SH), un grupo nitrilo ($C\equiv N$), un grupo C-carbámico libre ($NR''-C(=O)-OR'$, donde cada uno de R' y R'' es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo).

Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos heteróloga que puede usarse de acuerdo con este aspecto de la presente descripción es una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, tal como las regiones bisagra y Fc de un dominio pesado de inmunoglobulina (véase, la Patente de EE.UU. Nº 6.777.196). El resto de inmunoglobulina en las quimeras de este aspecto de la presente descripción se puede obtener a partir de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM, como se discute más adelante en la presente memoria. Las quimeras construidas a partir de una secuencia receptora unida a una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina apropiada (inmuno adhesinas) son conocidas en la técnica. Las inmuno adhesinas presentadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T [Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 84:2936-2940 (1987)]; CD4 [Capon et al., Nature 337: 525-531 (1989); Trauneker et al., Nature, 339: 68-70 (1989); Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. EE.UU., 9: 347-353 (1990); Byrn et al., Nature, 344: 667-670 (1990)]; L-selectina (receptor de referencia) [(Watson et al., J. Cell. Biol., 110:2221-2229 (1990); Watson et al., Nature, 349: 164-167 (1991)]; CD44 [Aruffo et al., Cell, 61: 1303-1313 (1990)]; CD28 y B7 [Linsley et al., J. Exp. Med., 173: 721-730 (1991)]; CTLA-4 [Lisley et al., J. Exp. Med., 174: 561-569 (1991)]; CD22 [Stamenkovic et al., Cell, 66:1133-1144 (1991)]; receptor TNF [Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol., 27: 2883-2886 (1991); Peppel et al., J. Exp. Med., 174:1483-1489 (1991)]; receptores NP [Bennett et al., J. Biol. Chem 266:23060-23067 (1991)]; y receptor α IgE [Ridgway et al., J. Cell. Biol., 1 15: resumen. 1448 (1991)].

Normalmente, en tales fusiones, la molécula quimérica retendrá al menos los dominios de bisagra y CH2 y CH3 activos funcionalmente de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se

pueden generar en el extremo C-terminal de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente en el extremo N-terminal del CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera.

Según un aspecto ejemplificado actualmente, el CD84 soluble es como se establece en SEQ ID NO: 2.

5 La presente descripción proporciona además un polinucleótido aislado (del entorno natural) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CD84 soluble como se describe anteriormente.

Para expresar el polinucleótido, se liga preferiblemente en un constructo de expresión de ácido nucleico bajo el control de un elemento regulador cis, por ejemplo, el promotor.

10 Los promotores constitutivos adecuados para emplear con la presente divulgación son secuencias promotoras que son activas en la mayoría de las condiciones ambientales y en la mayoría de los tipos de células, tales como el citomegalovirus (CMV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Los promotores inducibles adecuados para emplear con la presente divulgación incluyen, por ejemplo, el promotor inducible por tetraciclina (Zabala M, et al., Cancer Res. 2004, 64(8): 2799-804).

15 El constructo de ácido nucleico (también denominado en la presente memoria como un "vector de expresión") de la presente descripción incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariontes, eucariotes o preferiblemente ambos (por ejemplo, vectores lanzadera). Además, los vectores de clonación típicos también pueden contener una secuencia de inicio de transcripción y traducción, un terminador de transcripción y traducción y una señal de poliadenilación. A modo de ejemplo, tales constructos incluirán normalmente un 5' LTR, un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de ADN de segunda cadena y un 3' LTR o una porción del mismo.

20 El constructo de ácido nucleico de la presente descripción normalmente incluye una secuencia señal para la secreción del péptido desde una célula huésped en la que se coloca. Preferiblemente, la secuencia señal para este propósito es una secuencia señal de mamífero o la secuencia señal de las variantes de polipéptidos de la presente descripción.

25 Los promotores eucariotes contienen normalmente dos tipos de secuencias de reconocimiento, la caja TATA y los elementos promotores ascendentes. Se cree que la caja TATA, ubicada a 25-30 pares de bases hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción, está involucrada en dirigir la ARN polimerasa para comenzar la síntesis de ARN. Los otros elementos promotores ascendentes determinan la velocidad a la que se inicia la transcripción.

30 Preferiblemente, el promotor utilizado por el constructo de ácido nucleico de la presente descripción es activo en la población celular específica transformada. Ejemplos de promotores específicos de tipo celular y/o específico de tejido incluyen promotores, tales como la albúmina que es específica del hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores específicos linfoides [Calame et al., (1988) Adv. Immunol 43:235-275]; en particular promotores de receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos neuronales, tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:5473-5477], promotores específicos del páncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos de las glándulas mamarias, tales como el promotor de suero de leche (Patente de EE.UU. Nº 4.873.316 y Publicación de la Solicitud Europea Nº 264.166).

40 Los elementos potenciadores pueden estimular la transcripción hasta 1.000 veces de promotores homólogos o heterólogos unidos. Los potenciadores están activos cuando se colocan de manera ascendente o descendente al sitio de inicio de la transcripción. Muchos elementos potenciadores derivados de virus tienen un amplio intervalo de huéspedes y son activos en una variedad de tejidos. Por ejemplo, el potenciador genético temprano SV40 es adecuado para muchos tipos de células. Otras combinaciones de potenciador/promotor que son adecuadas para la presente divulgación incluyen aquellas derivadas del virus del poliovirus, citomegalovirus humano o murino (CMV), la repetición a largo plazo de varios retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina, el virus del sarcoma de Rous o murino y el VIH. Véase, Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983.

En la construcción del vector de expresión, el promotor se coloca preferiblemente aproximadamente a la misma distancia desde el sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. Sin embargo, como se sabe en la técnica, se puede acomodar alguna variación en esta distancia sin pérdida de la función del promotor.

50 Las secuencias de poliadenilación también se pueden agregar al vector de expresión para aumentar la eficacia de la traducción de ARNm de CD84. Se requieren dos elementos de secuencia distintos para una poliadenilación precisa y eficaz: secuencias ricas en GU o U ubicadas de manera ascendente al sitio de poliadenilación y una secuencia altamente conservada de seis nucleótidos, AAUAAA, ubicada 11-30 nucleótidos de manera ascendente. Las señales de terminación y poliadenilación que son adecuadas para la presente divulgación incluyen las derivadas de SV40.

55 Además de los elementos ya descritos, el vector de expresión de la presente descripción puede contener normalmente otros elementos especializados destinados a aumentar el nivel de expresión de ácidos nucleicos clonados o para facilitar la identificación de células que portan el ADN recombinante. Por ejemplo, varios virus

animales contienen secuencias de ADN que promueven la replicación cromosómica adicional del genoma viral en tipos de células permisivas. Los plásmidos que portan estos replicones virales se replican episómicamente siempre que los factores apropiados sean proporcionados por genes transportados en el plásmido o con el genoma de la célula huésped.

5 El vector puede incluir o no un replicón eucariota. Si está presente un replicón eucariota, entonces el vector es amplificable en células eucariotas empleando el marcador seleccionable apropiado. Si el vector no comprende un replicón eucariota, no es posible la amplificación episomal. En cambio, el ADN recombinante se integra en el genoma de la célula modificada genéticamente, donde el promotor dirige la expresión del ácido nucleico deseado.

10 El vector de expresión de la presente descripción puede incluir además secuencias de polinucleótidos adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas de un único ARNm, tal como un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) y secuencias para la integración genómica del polipéptido quimérico promotor.

15 Ejemplos de vectores de expresión en mamíferos incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, pZeoSV2 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/ cyto, pCMV myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Strategene, pTRES que está disponible en Clontech, y sus derivados.

20 También se pueden usar vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas, tales como retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein Bar incluyen pHEBO, y p2O5. Otros ejemplos de vectores incluyen pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano SV-40, el promotor SV-40 posterior, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus del tumor de mama murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor de polihedrina, u otros promotores muestran eficacia para la expresión en células eucariotas.

25 Otro agente capaz de regular a la baja un CD84 es una pequeña molécula de ARN interferente (ARNi). La interferencia de ARN es un proceso de dos etapas. La primera etapa, que se denomina etapa de iniciación, el ARNds de entrada se digiere en ARN interferentes pequeños (RNAi) de 21-23 nucleótidos (nt), probablemente por la acción de Dicer, un miembro de la familia ARNasa III de ribonucleasas específicas de ARNds, que procesa (escinde) ARNds (introducido directamente o mediante un transgen o un virus) de una manera dependiente de ATP. Los sucesivos eventos de escisión degradan el ARN a duplos de 19-21 pb (ARNi), cada uno con salientes de 2 nucleótidos 3' [Hutvagner y Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002); y Bernstein Nature 30 409:363-366 (2001)].

35 En la etapa efectora, los duplos de ARNi se unen a un complejo de nucleasa del complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Para la activación del RISC se requiere un desenrollado dependiente de ATP del duplo de ARNi. El RISC activo se dirige a la transcripción homóloga mediante interacciones de emparejamiento de bases y divide el ARNm en 12 fragmentos de nucleótidos del extremo 3' del ARNi [Hutvagner y Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002); Hammond et al. (2001) Nat. Rev. Gen. 2:110-119 (2001); y Sharp Genes. Dev. 15:485-90 (2001)]. Aunque el mecanismo de escisión aún no se ha dilucidado, la investigación indica que cada RISC contiene un único ARNi y una RNasa [Hutvagner y Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002)].

40 Debido a la notable potencia de ARNi, se ha sugerido una etapa de amplificación dentro de la ruta de ARNi. La amplificación podría ocurrir copiando los ARNds de entrada que generarían más ARNi, o mediante la replicación de los ARNi formados. Alternativa o adicionalmente, la amplificación se podría ver afectada por múltiples eventos de rotación del RISC [Hammond et al. Nat. Rev. Gen. 2:110-119 (2001), Sharp Genes. Dev. 15:485-90 (2001); Hutvagner y Zamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002)]. Para obtener más información sobre ARNi, consulte las siguientes reseñas Tuschl ChemBiochem. 2:239-245 (2001); Cullen Nat. Immunol. 3:597-599 (2002); y Brantl Biochem. Biophys. Act. 1575:15-25 (2002).

45 La síntesis de moléculas de ARNi adecuadas para su empleo con la presente divulgación se puede efectuar como sigue. Primero, la secuencia de ARNm de CD84 se escanea hacia abajo del codón de inicio AUG para secuencias de dinucleótidos AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes a 3' se registra como sitios potenciales diana de ARNi. Preferiblemente, los sitios diana de ARNi se seleccionan del marco de lectura abierto, ya que las regiones no traducidas (UTRs) son más ricas en sitios de unión a proteínas reguladoras. Las proteínas de unión a UTR y/o los complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo de endonucleasa ARNi [Tuschl ChemBiochem. 2:239-245]. Sin embargo, se apreciará que los ARNi dirigidos a regiones no traducidas también pueden ser eficaces, como se demostró para GAPDH, en donde el ARNi dirigido a UTR 5' mediaba una disminución de aproximadamente 90% en el ARNm de GAPDH celular y abolía completamente el nivel proteico (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html).

55 En segundo lugar, los sitios diana potenciales se comparan con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo., en humanos, ratones, ratas, etc.) utilizando cualquier programa informático de alineación de secuencias, tal como el programa informático BLAST disponible en el servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se filtran

los sitios diana putativos que exhiben una homología significativa con otras secuencias de codificación.

Las secuencias diana que reúnen los requisitos se seleccionan como molde para la síntesis de ARNi. Las secuencias preferidas son aquellas que incluyen un bajo contenido de G/C, ya que han demostrado ser más eficaces para mediar el silenciamiento génico en comparación con aquellas con un contenido de G/C superior al 55%. Se seleccionan preferiblemente varios sitios diana a lo largo de la longitud del gen diana para evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNi seleccionados, se usa preferiblemente un control negativo en conjunto. El ARNi de control negativo incluye preferiblemente la misma composición de nucleótidos que los ARNi pero carece de una homología significativa con el genoma. Por tanto, se emplea preferiblemente una secuencia de nucleótidos codificada del ARNi, siempre que no muestre ninguna homología significativa con ningún otro gen.

Otro agente capaz de regular a la baja un CD84 es una molécula de ADNzima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm o una secuencia de ADN del CD84. Las ADNzimas son polinucleótidos monocatenarios que son capaces de escindir secuencias diana monocatenarias y bicatenarias (Breaker, R.R. y Joyce, G. *Chemistry and Biology* 1995;2:655; Santoro, S.W. y Joyce, G.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1997;94:4262). Se ha propuesto un modelo general (el modelo "10-23") para la ADNzima. Las ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustrato de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su sustrato de ARN en las uniones purina:pirimidina (Santoro, S.W. y Joyce, G.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1997; para rev de ADNzimas véase Khachigian, LM [*Curr Opin Mol Ther* 4:119-21 (2002)].

Se han descrito ejemplos de construcción y amplificación de ADNzimas sintéticas modificadas genéticamente que reconocen sitios de escisión diana monocatenarios y bicatenarios en la Patente de EE.UU. Nº 6.326.174 por Joyce et al. Recientemente se observó que las ADNzimas de diseño similar dirigidas contra el receptor de uroquinasa humano inhiben la expresión del receptor de uroquinasa, e inhiben con éxito la metástasis de células de cáncer de colon in vivo (Itoh et al, 20002, Resumen 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther www.asgt.org). En otra solicitud, las ADNzimas complementarias a los oncogenes bcr-ab1 lograron inhibir con éxito la expresión de oncogenes en células de leucemia, y disminuir las tasas de recaída en el trasplante autólogo de médula ósea en casos de LMC y LLA.

La regulación a la baja de un CD84 también puede efectuarse empleando un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de ARNm que codifica el CD84.

El diseño de moléculas antisentido que se pueden utilizar para regular de manera eficaz un CD84 debe realizarse teniendo en cuenta dos aspectos importantes para el enfoque antisentido. El primer aspecto es el suministro del oligonucleótido al citoplasma de las células apropiadas, mientras que el segundo aspecto es el diseño de un oligonucleótido que se une específicamente al ARNm designado dentro de las células de manera que inhibe la traducción del mismo.

La técnica anterior enseña una serie de estrategias de administración que se pueden usar para administrar oligonucleótidos de manera eficaz en una amplia variedad de tipos de células [véase, por ejemplo, Luft *J Mol Med* 76: 75-6 (1998); Kronenwett et al. *Blood* 91: 852-62 (1998); Rajur et al. *Bioconjug Chem* 8: 935-40 (1997); Lavigne et al. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-71 (1997) y Aoki et al. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 231: 540-5 (1997)].

Además, también están disponibles los algoritmos para identificar esas secuencias con la mayor afinidad de unión prevista para su ARNm diana basado en un ciclo termodinámico que explica la energía de las alteraciones estructurales tanto en el ARNm diana como en el oligonucleótido [véase, por ejemplo, Walton et al. *Biotechnol Bioeng* 65: 1-9 (1999)].

Dichos algoritmos se han utilizado con éxito para implementar un enfoque antisentido en las células. Por ejemplo, el algoritmo desarrollado por Walton et al. permitió a los científicos diseñar con éxito oligonucleótidos antisentido para transcripciones de beta-globina de conejo (RBG) y factor de necrosis tumoral alfa de ratón (TNF alfa). El mismo grupo de investigación informó más recientemente que la actividad antisentido de oligonucleótidos seleccionados racionalmente frente a tres ARNm diana modelo (lactato deshidrogenasa humana A y B y gp130 de rata) en cultivo celular, según lo evaluado por una técnica de PCR cinética, demostró ser eficaz en casi todos los casos, incluyendo pruebas frente a tres dianas diferentes en dos tipos de células con químicas de oligonucleótidos de fosfodiéster y fosforotioato.

Además, también se publicaron varios enfoques para diseñar y predecir la eficacia de oligonucleótidos específicos empleando un sistema in vitro (Matveeva et al., *Nature Biotechnology* 16: 1374 - 1375 (1998)).

Otro agente capaz de regular a la baja un CD84 es una molécula de ribozima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm que codifica un CD84. Las ribozimas se emplean cada vez más para la inhibición específica de la secuencia de la expresión génica mediante la escisión de los ARNm que codifican las proteínas de interés [Welch et al., *Curr Opin Biotechnol.* 9:486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico los ha convertido en herramientas valiosas tanto en investigación básica como en aplicaciones terapéuticas. En el área terapéutica, las ribozimas se han explotado para atacar los ARN virales en enfermedades infecciosas, oncogenes dominantes en cánceres y mutaciones somáticas específicas en trastornos genéticos [Welch

et al., Clin Diagn Virol. 10:163-71 (1998)]. En particular, varios protocolos de terapia génica de ribozima para pacientes con VIH ya están en ensayos de Fase 1. Más recientemente, las ribozimas se han utilizado para la investigación en animales transgénicos, validación de dianas genéticas y aclaración de vías. Varias ribozimas se encuentran en diversas etapas de ensayos clínicos. ANGIOZYME fue la primera ribozima sintetizada químicamente que se estudió en ensayos clínicos en humanos. ANGIOZYME inhibe específicamente la formación del VEGF-r (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), un componente clave en la vía de la angiogénesis. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., así como otras empresas, han demostrado la importancia de la terapéutica anti-angiogénica en modelos animales. HEPTAZYME, una ribozima diseñada para destruir selectivamente el ARN del virus de la hepatitis C (VHC), se encontró ser eficaz en la disminución del ARN viral de la Hepatitis C en ensayos de cultivo celular (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - página principal WEB).

Los agentes de la presente divulgación pueden administrarse al sujeto *per sé*, o en una composición farmacéutica donde se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

Como se emplea en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes adecuados fisiológicamente. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria el término "ingrediente activo" se refiere al agente responsable del efecto biológico (es decir, de regulación a la baja en la actividad o expresión de CD84).

Aquí en lo sucesivo, las frases "vehículo aceptable fisiológicamente" y "vehículo aceptable farmacéuticamente" que pueden emplearse de manera intercambiable se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Bajo estas frases se incluye un adyuvante.

En la presente memoria el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, que incluyen las inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como intratecal, intraventricular directa, intracardíaca, por ejemplo, en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, inyecciones intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares.

Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

El término "tejido" se refiere a la parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura similar y/o una función común. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral, retina, tejido cutáneo, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartilago, tejido conectivo, tejido sanguíneo, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido cerebral, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal, tejido hematopoyético.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden fabricarse mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente descripción pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos aceptables fisiológicamente que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente, tales como la disolución de Hank, la disolución de Ringer, o el tampón salino fisiológico. Para la administración por vía transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para atravesar la barrera. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden fabricar usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla

de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros aceptables fisiológicamente, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar disoluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, y selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con relleno, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la ruta de administración elegida.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para usar según la presente divulgación se administran convenientemente en forma de presentación en pulverizador en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para usar en un dispensador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis con opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas o de base acuosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución antes de su usar con un vehículo adecuado, por ejemplo, una disolución estéril de base acuosa libre de pirógenos.

La composición farmacéutica de la presente divulgación también puede formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente descripción incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad eficaz terapéuticamente significa una cantidad de ingredientes activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, B-CLL) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. En un aspecto específico, la cantidad eficaz terapéuticamente es suficiente para inducir la apoptosis de B-CLL.

La determinación de una cantidad eficaz terapéuticamente está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la divulgación, la cantidad o dosis eficaz terapéuticamente puede estimarse inicialmente a partir de ensayos in vitro y de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una

dosis en modelos animales para lograr una concentración o título deseado. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

5 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en en la presente memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar in vitro, en cultivos celulares o en animales experimentales.

10 Un modelo animal de B-CLL tal como la quimera de ratón NOD-SCID como se describe anteriormente [Shimoni A, Marcus H, Canaan A, et al. A model for human B-chronic lymphocytic leukemia in human/mouse radiation chimera: evidence for tumor-mediated suppression of antibody production in low-stage disease. Blood. 1997;89:2210-2218], puede usarse para determinar la eficacia terapéutica de los agentes de la presente divulgación in vivo. Las células mononucleares de sangre periférica humana de pacientes con B-CLL en diferentes etapas de la enfermedad se transfieren mediante inyección intraperitoneal. Este sistema soporta la supervivencia a largo plazo de las células tumorales humanas. Los ratones quiméricos se tratan con los agentes de la presente divulgación durante diferentes períodos de tiempo, y luego se evalúa el efecto sobre el injerto de las células y la supervivencia.

15 Los datos obtenidos de estos ensayos in vitro y de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación se pueden elegir por el médico individual en vista de la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cap. 1 p.1).

20 La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles (de tejido) del ingrediente activo que sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, MEC). La MEC variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos in vitro. Las dosis necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden usar para determinar las concentraciones plasmáticas.

25 Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una o varias administraciones, con un curso de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúe la curación o se logre una disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la forma de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

30 Si se desea, las composiciones de la presente divulgación pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El envase o dispensador también se puede acomodar mediante un aviso asociado al envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, dicho aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de administración de las composiciones 35 humanas o veterinarias. Dicha notificación, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. para la prescripción de medicamentos recetados o del prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la divulgación formulada en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado, y etiquetar para el 40 tratamiento de una afección indicada, como se detalla anteriormente.

Para mejorar la eficacia terapéutica, los agentes de la presente descripción pueden administrarse adicionalmente junto con terapia convencional para la B-CLL, tal como quimioterapia, radioterapia, terapia biológica, por ejemplo, inmunoterapia o trasplante de médula ósea.

A continuación, se incluye una lista no limitativa de ejemplos de terapias convencionales para B-CLL.

45 Análogos de purina - la fludarabina o el clorambucilo se emplean generalmente en esta categoría de tratamientos.

Anticuerpos monoclonales - los anticuerpos monoclonales, tal como el alemtuzumab (dirigido frente a CD52) y el rituximab (dirigido frente a CD20) se emplean generalmente en esta categoría de tratamientos.

50 Quimioterapia combinada - las opciones de quimioterapia combinada generalmente se emplean en la recaída y el nuevo diagnóstico de la CLL. Recientemente, los ensayos aleatorios han demostrado que las combinaciones de análogos de purina (fludarabina) con agentes alquilantes (ciclofosfamida) producen tasas de respuesta más altas y una supervivencia sin progresión más prolongada que los agentes individuales: por ejemplo, FC (fludarabina con ciclofosfamida); FR (fludarabina con rituximab); FCR (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona).

55 Trasplante alogénico de médula ósea (células madre) - rara vez se usa como tratamiento de primera línea para la CLL debido a su riesgo. Existe un interés creciente en el uso del trasplante alogénico de células madre de intensidad

reducida, que ofrece la posibilidad de curación para pacientes seleccionados con un donante adecuado.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluyen, pero no se limita a". Este término abarca los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

5 La frase "que consiste esencialmente en" significa que la composición o método puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero sólo si los ingredientes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición o método reivindicado.

Como se emplea en la presente memoria, la forma singular "un", "una" y "el" "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

10 A lo largo de esta solicitud, se pueden presentar varios aspectos de esta divulgación en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción de formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la divulgación. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo, 15 tal como de 1 a 6 ha revelado específicamente subrangos, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

20 Siempre que se indique un intervalo numérico en la presente memoria, se pretende incluir cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "que oscila/intervalos entre" un primer número de indicación y un segundo número de indicación y "que oscila/intervalos desde" un primer número de indicación "a" un segundo número de indicación se usan indistintamente en la presente memoria y están destinados a incluir el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluye, pero no se limita a, estas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos, o bien desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las técnicas de la química, farmacología, biología, bioquímica y medicina.

Como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" incluye anular, inhibir, ralentizar o revertir sustancialmente la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

30 La palabra "ejemplar" se emplea en la presente memoria por querer decir "que sirve como un ejemplo, caso o ilustración". Cualquier aspecto descrito como "ejemplar" no debe interpretarse necesariamente como preferido o ventajoso sobre otros aspectos y/o excluir la incorporación de características de otros aspectos.

35 La palabra "opcionalmente" se emplea en la presente memoria por querer decir que "se proporciona en algunos aspectos y no se proporciona en otros aspectos". Cualquier aspecto particular de la divulgación puede incluir una pluralidad de características "opcionales" a menos que tales características entren en conflicto.

40 Se aprecia que ciertas características de la divulgación, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de aspectos separados, también se pueden proporcionar en combinación con un único aspecto. Por el contrario, varias características de la divulgación, que, por resumir, se describen en el contexto de un único aspecto, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otro aspecto descrito de la divulgación. Ciertas características descritas en el contexto de varios aspectos no deben considerarse características esenciales de esos aspectos, a menos que el aspecto no funcione sin esos elementos.

Varios aspectos y aspectos de la presente descripción tal como se definieron anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones de a continuación, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

45 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos que, junto con las descripciones anteriores, ilustran algunos aspectos de la divulgación de una manera no limitante.

50 Generalmente, la nomenclatura empleada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio empleados en la presente divulgación incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Dichas técnicas se explican detenidamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley e Hijos, Baltimore, Maryland (1989).; Perbal, "A practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley e Hijos, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las establecidas en las Patentes

de EE.UU. N^{os} 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8^a Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N^{os} 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "Protocols PCR: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos allí conocidos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Materiales y procedimientos experimentales

Generación de CD84-ECD

Para generar un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular de CD84 (CD84-ECD), la PCR se realizó según las Tablas 1 y 2. Los cebadores contenían salientes con sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción *EcoR* I y *Bam*H I.

Tabla 1: Formulación para PCR preparativa ([50] µL)

[2pt] componente de reacción	cantidad
10µl de tampón Pfu	[5]µL
dNTP mezcla [10] mM10mM	[1]µL
cebador 5', 5'BamH1CD84	[0,2]µL ([12] pmol)
cebador 3', 3'EcoR1CD84	[0,2]µL ([12] pmol)
PolimerasaPfu	[1]µL
agua	[41,6]µL

Tabla 2: Parámetros de ciclado para PCR preparativa ([50] µL)

[2pt] n ^o etapa.	temperatura	periodo de tiempo	proceso
1.	[95]C	[10]min	desnaturalización inicial
2.	[95]C	[1]min	fusión
3.	[51]C	[30]s	re-asociación
4.	[72]C	[70]s	extensión
5.	[72]C	[8]min	extensión final
6.	[8]C		

Las etapas 2 a 4 se repitieron 39 veces.

Después de la purificación del producto de PCR CD84-ECD, las enzimas de restricción *EcoR* I y *Bam*H se emplearon para digerir el vector pEF4 y el propio producto de PCR para producir extremos complementarios, y cohesivos. Por lo tanto, el producto completo purificado de PCR CD84-ECD ([30] µL) se puso en reacción con 20 unidades de *EcoR* I y *Bam*H I ([1] µL cada uno), [5] µL 10µL tampón para *EcoR* I y agua para hacer un volumen final de [50] µL. La formulación se incubó durante la noche a [37]^oC y luego se purificó nuevamente. [3] µg del plásmido pEF4-myc/His se digirieron de forma análoga. Se realizaron reacciones de control, cada una con sólo una de las dos

enzimas, y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El inserto CD84-ECD digerido y purificado y el vector pEF4-myc/His digerido y purificado se ligaron utilizando una proporción molar de 1:5 entre el vector y el inserto. La mezcla se incubó durante la noche a [15]°C y se usó directamente para la transformación de la bacteria DH5alfa. Los transformantes positivos que contienen el CD84-ECD se identificaron usando PCR de colonias, empleando los cebadores para el CD84-ECD. El CD84-ECD se subclonó a partir de pEF4-myc/His en el vector pET21a mediante restricción con *EcoR* I y *BamH* I. La colonización positiva se confirmó por PCR de colonias.

Mutagénesis dirigida al sitio

Se utilizó el kit de Mutagénesis dirigida al sitio Stratagene QuickChange, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los siguientes mutantes de tirosina se derivaron del constructo CD84-completo:

- 10 1. Y262F
- 2. Y262F, Y299F
- 3. Y279F
- 4. Y279F, Y324F

Los cebadores utilizados para la clonación se enumeran a continuación.

15 *Aislamiento de ARN*

El ARN se aisló usando el reactivo TRI MRC (molecular research center, inc) según las instrucciones del fabricante.

Síntesis de ADNc

20 Para sintetizar ADNc a partir de ARN aislado (ver arriba), para cada muestra se mezcló [1] µg de ARN con [1] µL del cebador oligo-dT y se completó con agua hasta un volumen de [16] µL. La mezcla se incubó a [70]°C durante [5] min y después se enfrió durante [2] min en hielo. Se añadieron [12] µL de la siguiente disolución, seguido de la incubación durante [1] h a [42]°C:

Tabla 3

[5] µL	Tampón RT
[3] µL	[0,1]M DTT
[2] µL	dNTPs [10] mM
[0,7] µL	dHO
[0,3] µL	ARN de HPRI
[1] µL	MMLV Superscript II RT

PCR analítica

25 La PCR analítica se realizó utilizando un Taq 2ReadyMix (Bio Lab), que contiene todos los componentes necesarios, además de los cebadores y del molde. Los cebadores empleados se enumeran a continuación con sus respectivas temperaturas de re-asociación. El número normal de ciclos fue de 33-39, dependiendo de la muestra y del gen. La actina se empleó como un gen de referencia, y se realizó en paralelo una PCR de control sin molde como control para la contaminación. Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis analítica en gel de agarosa.

30 *Análisis de diferentes isoformas de CD84*

Se analizaron las diferentes isoformas de CD84 mediante el sistema establecido por Palou et al. (2000) Palou, E., Piroto, F., Solé, J., Freed, JH, Peral, B., Vilardell, C., Vilella, R., Vives, J. y Gayá, A. (2000), 'Genomic characterization of CD48 reveals the existence of five isoforms differing in their cytoplasmic domains', *Tissue Antigens* 55(2), 118-27.

35 Las cinco isoformas de CD84 comparten la misma secuencia de la parte extracelular, pero difieren en su secuencia intracelular. Más precisamente, CD84a, b, c y d tienen una secuencia de nucleótidos similar, además de un "espaciador" corto de diferente longitud en su parte citoplasmática proximal a la membrana.

Al usar un par de cebadores que enmarcan esta parte variable (el cebador 5' en la parte extracelular, el cebador 3' en la parte intracelular), una única PCR produce fragmentos de diferente longitud para estas isoformas. Debido a

ES 2 800 328 T3

una diferencia de secuencia citoplasmática de las otras isoformas, CD84e puede analizarse específicamente mediante un par de cebadores, que utilizan el mismo cebador extracelular que antes, pero un cebador individual para la secuencia intracelular.

Tabla 4: Isoformas de CD84 y sus números de acceso

Denominación	Número de acceso de GenBank (proteína de ARNm) (identificador UniProtKB/Swiss-Prot)/SEQ ID NO de ácidos nucleicos y proteínas	longitud (aa)
CD84a	AF054816 AAF21722.1 (Q9UIB8-1/25, 26)	345
CD84b	Y12632 CAA73181.1 (Q9UIB8-2/27, 28)	339
CD84c	AF054815.1 NP_003865.1 (Q9UIB8-3/29, 30)	328
CD84d	AF054817 AAF21723.1 (Q9UIB8-5/31, 32)	272
CD84e	U96627 AAD04232.1 (Q9UIB8-4/33, 34)	280

5

Cebadores

Cebadores para cada isoforma

5'CD84d (SEQ ID NO: 3) TACATGCCTTAGGTCCGA NM_003874.2

3'CD84d (SEQ ID NO: 4) GAGGGAAGCACCTTGT NM_003874.2

10 5'CD84completo (SEQ ID NO: 5) TGCCTGCAAACCTGGCCGGAAGCA todas las construcciones CD84

3'CD84all (SEQ ID NO: 6) TGCAGGTTGTAGCGCTTGGTGGTGGT todas las construcciones CD84

5'SAP (SEQ ID NO: 7) AGCGTGCCAGGCGTGTACTG 56_C NM_002351.3

3'SAP (SEQ ID NO: 8) ACACCAGCCAACTTCCCACCA 56_C NM_002351.3

5'EAT2 (SEQ ID NO: 9) GCTCAAGGAAGGGTGGATGGC NM_053282

15 3'EAT2 (SEQ ID NO: 10) TCTGGTGCTGGTGGGCAGAAC NM_053282

3'Bcl2 (SEQ ID NO: 11) ACAAGTGAAGTCAACATGCC NM_000633.2

5'Bcl2 (SEQ ID NO: 12) GCAAGTGAATGAACACCTTC NM_000633.2

Actina: 5' (SEQ ID NO: 13) TGAAGTGTGACGTGGACATCCG

3' (SEQ ID NO: 14) GCTGTACCTTCACCGTTCCAG

20 Cebadores para las mutaciones de tirosina

5'Y262 (SEQ ID NO: 15) GATGCTGCCTCAAAGAAAACCATATTCACATATATCATGGCTTC

3'Y262 (SEQ ID NO: 16) GAAGCCATGATATATGTGAATATGGTTTTCTTTGAGGCAGCATC

5'Y299 (SEQ ID NO: 17) GAGCCAGTGAACACAGTTTTTTCCGAAGTGCAGT

3'Y299 (SEQ ID NO: 18) ACTGCACTTCGGAAAAAAGTGTGTTCACTGGCTC

25 5'Y279 (SEQ ID NO: 19) GCCAGCAGAGTCCAGAATCTTTGATGAAATCCTG

3'Y279 (SEQ ID NO: 20) CAGGATTTTCATCAAAGATTCTGGACTCTGCTGGC

5'Y324 (SEQ ID NO: 21) ACCTCCTGGGACTTCAAGCTTTGAAATTGTGATCG

3'Y324 (SEQ ID NO: 22) CGATCACAATTTCAAAGCTTGAAGTCCCAGGAGGT

Secuencia de cebadores para el CD84-ECD

30 5'BamH1CD84 (SEQ ID NO: 23) CGTCGGATCCATGGCTCAGCACCAC

3'EcoR1CD84 (SEQ ID NO: 24) TAGCGAATTCACGGAAGCCCATTGC

Anticuerpos

anti-Bcl-2 (C-2; Santa Cruz)

anticuerpo anti-tubulina (Sigma),

5 conjugado con peroxidasa anti-ratón (Jackson Labs).

Activación de CD84 (ab3202 abcam) antiFab (Jackson Labs).

Bloqueo de CD84 (CD84.1.21 Biolegend)

CD84 para IP (152-1DS Santa Cruz)

Generación de células HEK 293T transfectadas de forma estable con CD84

10 Las células HEK 293T se transfectaron de manera estable con el constructo CD84 completo, que promueve la expresión de la isoforma CD84 marcada con myc y His. Antes de la transfección, el vector se linealizó para evitar la integración de manera que interrumpiera el gen CD84. El plásmido pEF4 contiene el gen de resistencia a Zeocina que se empleó para la selección de células transfectadas de forma estable. Las células de mamíferos exhiben una amplia gama de susceptibilidad a Zeocina. Por lo tanto, la primera etapa en la generación de una línea celular estable es determinar la concentración mínima de Zeocina, necesaria para matar la línea celular huésped no transfectada. Por lo tanto, las células HEK 293T se sembraron en placas de 6 pocillos para producir [25]% de confluencia. Después de [24] h, el medio se reemplazó con medio que contenía concentraciones variables de Zeocina: 0, 150, 300, 500, 700 y [1000] µg/mL. El medio selectivo se reponía cada 3-4 días y se observaba la supervivencia de las células a lo largo del tiempo. La concentración que mató a la mayoría e inhibió el crecimiento de las células en 12 días se seleccionó para el siguiente procedimiento de selección. Las células HEK 293T sensibles a zeocina se pueden diferenciar fácilmente de las células resistentes por su gran aumento de tamaño y forma celular anormal.

Transfección y expresión proteica de CD84-ECD secretado

25 Para la expresión y secreción de la proteína CD84-ECD, el siguiente protocolo ha demostrado ser ventajoso. Dieciséis a veinte horas antes de la transfección, las células HEK 293T se sembraron en placas en matraces de cultivo celular de 175 cm hasta una confluencia final de [75]%. Se usó una cantidad mínima de [30] ml de medio DMEM completo y [3] ml de disolución que contiene precipitado de ADN para la transfección. Dieciséis a 24 horas después de la transfección, el medio se cambió a DMEM sin suero durante tres o cuatro días. Este medio acondicionado se recogió, se centrifugó a [4000]g durante 2 horas para eliminar las células y los desechos, se filtró con una unidad de filtro [0,2] µm y se concentró a un volumen de [1] mL, usando concentradores de muestra Vivaspin 20. Después de la adición de [1]% de Cóctel Inhibidor de Proteasa, la disolución se almacenó a [4]°C para su uso posterior.

Detección de la expresión de superficie CD84 por citometría de flujo

35 Se detectó mediante citometría de flujo la expresión superficial de CD84 por células HEK 293T transfectadas de forma estable. Se recogieron células de una placa de cultivo de [35] mm casi confluyente sin el uso de tripsina. La suspensión celular se dividió en fracciones de [200] µL en una placa de 96 pocillos, para los siguientes tratamientos: células sin tinción, células incubadas con anticuerpo secundario y duplicados de células incubadas con anticuerpo primario y secundario. Las células se granularon por centrifugación a [300] g durante 4 minutos y se resuspendieron en PBS que contenía el anticuerpo primario anti-CD84 con una dilución de 1:100. Después de la incubación durante 40 20 minutos a [4]°C, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS que contenía el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Después de la incubación durante 20 minutos a [4]°C, las células se lavaron una vez más y se resuspendieron en [300] µL de PBS. Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo Becton Dickinson (BD) FACSCalibur. Se utilizó el programa informático BD Cell Quest para activar y analizar la población viable de células.

45 Entrecruzamiento de CD84 *in vitro*

Para activar la cascada de señalización descendente de CD84 en células transfectadas transitoriamente, se realizaron las siguientes etapas. Las células HEK 293T se transfectaron con plásmido de CD84-completo en una placa de cultivo celular de 12 pocillos, como se describió anteriormente, y [6] h después de la transfección, el medio se reponía. Las células se incubaron con [1,25] µL de anticuerpo Abcam anti-CD84 durante [30] min y posteriormente con [0,5] µL del anticuerpo secundario anti-Fab. Para el análisis de Western blot, las células se recogieron [24] h después de la activación.

Co-inmunoprecipitación

La co-inmunoprecipitación (co-IP) puede emplearse para identificar miembros de complejos proteicos. Por lo tanto, [30] µL de perlas de proteína-G sefarosa se revistieron con [3] µg de CD84 o anticuerpo de control IgG. Las células HEK 293T se transfectoron en una placa de cultivo celular de [35] mm con [1] µg de CD84-completo y [1] µg de plásmido CD74, [24] h antes de la recogida. El inmuno-precipitado se preparó como sigue:

Las células se recogieron, el sedimento se congeló inmediatamente en N líquido, y después se resuspendió en [300] µL de tampón de lisis para IP. Después de la incubación durante [30] min en hielo, la disolución se centrifugó durante [30] min a [18000] g y el sobrenadante se dividió en dos fracciones: [30] µL (para usar como muestra de proteína total) se mezclaron con [6] µL 5 µm de tampón de muestra con [1]% de β-mercaptoetanol después de la incubación a [99] °C durante [10] min. El lisado restante se incubó durante la noche con las perlas recubiertas bajo agitación constante. Las perlas se lavaron dos veces con la disolución 1 de IP y una vez con la disolución 2 de IP. Después de la eliminación completa del sobrenadante, se añadió al precipitado [35] µL de tampón de muestra con β-mercaptoetanol. Después de mezclar y centrifugar brevemente, el sobrenadante se empleó para el análisis mediante SDS-PAGE y Western blot.

15 *Preparación de muestras de proteínas de células HEK 293T con RIPA*

El medio de cultivo celular se eliminó y las células adherentes se lavaron cuidadosamente con PBS helado. Las células se separaron, se resuspendieron en 1 ml de PBS, y se sedimentaron a [300] g durante [4] min. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en el volumen apropiado de tampón RIPA con [1]% de inhibidores de proteasa. Se usó un volumen mínimo de [100] µL por [10] cm de área de crecimiento (rendimiento celular promedio para una placa de cultivo confluyente: [35] mm). La suspensión se incubó en hielo bajo agitación periódica durante treinta minutos y después se centrifugó a [18000] g durante [30] min. La centrifugación se realizó a [4] °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se combinó 1:5 con 5 µl de tampón de muestra ([1]% de β-mercaptoetanol). Posteriormente, la disolución se hirvió durante 10 minutos a [99] °C y se congeló a [-20] °C hasta el análisis por SDS-PAGE y Western blot.

25 *Preparación de muestras de proteínas de células HEK 293T con Hot-SDS*

Las células se lavaron, recogieron y granularon. El sedimento se desprendió mediante agitación fuerte y se añadió una disolución de SDS caliente precalentada ([99]°C). Se usó un volumen mínimo de [100] µL por [10] cm de área de crecimiento (rendimiento celular promedio para una placa de cultivo confluyente: [35] mm). La muestra se hirvió durante [2] min a [99] °C y después se congeló en nitrógeno líquido durante al menos cuatro minutos. Posteriormente, la muestra se volvió a hervir durante [2] min, se sometió a sonicación en hielo y se combinó 1:5 con 5 µl de tampón de muestra ([1]% de β-mercaptoetanol).

Purificación de proteínas del medio acondicionado utilizando FLPC

La cromatografía de afinidad se basa en la adsorción específica y reversible de una molécula a un compañero de unión a la matriz. La naturaleza de la unión se produce bien de forma natural (por ejemplo, como para antígeno-anticuerpo) o bien puede introducirse genéticamente a una proteína, con "marcadores" específicos. Un grupo especial de métodos de cromatografía de afinidad utiliza grupos quelantes de metales inmovilizados: los iones de metales de transición multivalentes se unen a la resina de manera que permite que los enlaces coordinados libres interactúen con grupos básicos de proteínas. El marcador de His empleado en la presente memoria logra un complejamiento tan fuerte de iones Níquel, que se pueden utilizar para la cromatografía de afinidad, cuando se emplea una resina con iones de níquel inmovilizados. Después de la adsorción de la proteína a la columna, se lava y eventualmente se puede eluir en altas concentraciones de imidazol, que compite con el marcador de His por el complejamiento de Ni y desplaza la proteína. Después de la purificación, las muestras concentradas de cada etapa de purificación y de los diferentes picos se analizan normalmente mediante SDS-PAGE seguido de Western Blot y tinción con Coomassie del gel.

45 *Cromatografía de afinidad de níquel*

En general, una purificación de proteínas con columnas de Níquel consiste en las siguientes etapas:

1. lavar la columna con agua para eliminar el etanol residual del almacenamiento
2. equilibrio de la columna con PBS que contiene imidazol [20] mM
3. carga de la disolución que contiene la proteína marcada con His
- 50 4. lavar la columna con PBS que contiene imidazol [20] mM
5. eluir la proteína con PBS que contiene imidazol [250] mM

Para cada etapa de lavado y de equilibrado, se empleó un volumen de al menos 10 veces el volumen de la columna. Si no se indica lo contrario, la velocidad de flujo fue de [5] mL/min. La proteína se concentró como se describe

anteriormente (*Transfección y expresión proteica del CD84-ECD secretado*) y se diluyó 1:10 en PBS con imidazol [20] mM. La disolución de proteína se aplicó a la columna de Níquel de sefarosa equilibrada HisTrap HP [5] mL a velocidades de flujo entre 1 y [3] mLmin. La columna se lavó con PBS que contiene imidazol [20] mM, lo que evita la unión inespecífica de proteínas ricas en histidina. La elución de la proteína se llevó a cabo utilizando PBS, que contiene de imidazol [250] mM. El sistema ÄKTA Basic FPLC aplicado permite la monitorización inmediata del eluido mediante mediciones de absorción de tres longitudes de onda UV diferentes, pH y conductancia. De esta manera, las fracciones adecuadas podrían tomarse "sobre la marcha". Las fracciones del pico de la presunta proteína se agruparon, se concentraron a un volumen de 1- [2] ml usando concentradores de muestra Vivaspin 20 y se sometieron a filtración en gel como se describe (ver más abajo).

10 *Cromatografía de exclusión por tamaño*

La cromatografía de exclusión por tamaño, también conocida como filtración en gel, separa las moléculas por su tamaño y se basa en la permeación diferencial de un analito en una resina porosa con un tamaño de poro controlado. Las moléculas grandes, que no sean capaces de penetrar en los poros, se eluyen concomitantemente con el frente del disolvente (volumen de exclusión). Las moléculas más pequeñas se infiltran en los poros y quedan retenidas. Por tanto, los componentes más pequeños tienen el mayor tiempo de detención y se eluyen al final.

Las fracciones concentradas agrupadas de la cromatografía de afinidad por Níquel se cargaron en una columna Superdex 200 16/60 (grado de preparación) mediante inyección en el sistema FPLC. Las proteínas se eluyeron a una velocidad de flujo de [5] mLmin con PBS como eluyente. Las fracciones se recogieron según la absorción UV y los cambios en el pH del eluido. Después de agrupar y concentrar las diferentes fracciones de pico, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE, seguido de Western blot y tinción Coomassie. La concentración de proteína de las muestras se determinó mediante el ensayo de Bradford.

Digestión proteolítica e identificación de proteínas por ESI-MS/MS

Para verificar la identidad de la proteína CD84-ECD, la presunta banda del gel teñido con Coomassie se escindió y analizó por digestión proteolítica seguida de espectrometría de masas por ionización por electropulverización. El procedimiento se llevó a cabo por la Unidad de Servicios Biológicos del Instituto Weizmann.

Ejemplo 1

Identificación de genes diana CD84

El objetivo inicial del presente estudio fue identificar genes diana de CD74 y su papel en la supervivencia de células B-CLL, utilizando células obtenidas de pacientes en el Instituto de Hematología del Centro Médico Kaplan.

30 *Identificación de genes diana CD74* - para este fin, se incubaron células B de pacientes con B-CLL (también denominadas células B-CLL) en presencia o ausencia de MIF (100 ng/ml), se utilizó el sistema de análisis de expresión Affymetrix GeneChip® para comparar los patrones de expresión de ARN de estas dos poblaciones. En este análisis, se comparó el ARN de las células estimuladas con MIF con el ARN derivado de las células sin estimular. Se encontró que muchos genes se expresan diferencialmente en estas poblaciones; un ejemplo sorprendente fue CD84, cuya expresión se elevó notablemente en las células B-CLL inducidas por MIF.

40 *Niveles de expresión de CD84 en células B-CLL* - se compararon los niveles de expresión de la superficie celular de CD84 en células B-CLL circulantes con niveles en células B maduras circulantes normales. Las células B purificadas de sujetos sanos, así como los pacientes con B-CLL en estadio temprano y avanzado, se analizaron mediante RT-PCR para detectar la presencia de ARNm de CD84 (un segmento común a todas las isoformas). Como se muestra en la Figura 1A, se detectaron niveles bajos de ARNm de CD84 en las células B normales, mientras que se observaron niveles elevados de ARNm de CD84 en todos los pacientes con CLL, independientemente de la etapa de la enfermedad.

45 A continuación, se utilizó el análisis de citometría de flujo (FACS) para determinar si estos niveles elevados de CD84 se expresaron en la superficie celular de las células B-CLL. Como se muestra en las Figuras 1B-C, se expresaron niveles más altos de CD84 en la superficie celular de todas las células B-CLL, en comparación con las células B normales. Estos resultados se observaron uniformemente en todas las muestras examinadas, independientemente de los parámetros clínicos de los pacientes, incluida la etapa de la enfermedad [RAI o Binet, Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. Pautas del Grupo de Trabajo patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer para la leucemia linfocítica crónica: pautas revisadas para el diagnóstico y el tratamiento. Blood. 1996;87:4990-4997 (Véase la Tabla 5, abajo)].

50

Tabla 5 - Niveles de expresión de CD84 según lo determinado por FACS

% de expresión de superficie celular de CD84	Nº de veces de la expresión de CD84 después de la estimulación con MIF	
células B normales	avanzado	1,3
normal	14	avanzado
normal	15	temprano
Células B-CLL		temprano
temprano	76	avanzado
avanzado	58	temprano
temprano	79	avanzado
avanzado	83	avanzado
temprano	87	avanzado
avanzado	66	av
avanzado	71	sd
temprano	73	
temprano	81	
temprano	71	
temprano	81	
avanzado	71	
avanzado	82	
av (CLL)	75,3	
SD (CLL)	7	

5 *CD84 se modula por CD74* - Para verificar que la expresión de CD84 está modulada realmente por CD74, el nivel de transcripción de CD84 se analizó por RT-PCR en células B-CLL estimuladas con MIF en comparación con células sin estimular. Como se ve en la Figura 2A, CD74 de hecho aumentó drásticamente los niveles de ARNm de CD84. Esta elevación también dio como resultado un aumento en su expresión de la superficie celular (Figuras 2B-C).

10 ISO-1 es un inhibidor no tóxico de MIF que se une al MIF bioactivo en su sitio de tautomerasa N-terminal [Dios A, Mitchell RA, Aljabari B, et al. Inhibition of MIF bioactivity. By rational design of pharmacological inhibitors of MIF tautomerase activity J Med Chem. (2002);45:2410-2416]. Para determinar si el MIF secretado por B-CLL regula la expresión de CD84, se analizaron los niveles de ARNm de MIF en células incubadas en presencia o ausencia de este inhibidor. Además, ISO-1 reduce significativamente los niveles de ARNm de CD84 (Figura 2C) y los niveles de expresión de la superficie celular (Figura 2D), lo que demuestra que MIF regula los niveles de expresión de CD84 en B-CLL.

Ejemplo 2

15 *La activación de la superficie celular de CD84 en células B-CLL inicia una cascada de supervivencia en células B-CLL y células HEK 293T.*

20 Para determinar si la superficie celular de CD84 transmite una señal que da como resultado la activación de cascadas de señalización descendentes en células B-CLL, el CD84 se entrecruzó con anti-CD84 o anticuerpo IgG1 de control mAb (Abcam, Tangye SG, van de Weerd BCM, Avery DT, Hodgkin PD. El CD84 se regula al alza en una población importante de células B de memoria humanas y recluta el dominio SH2 que contiene las proteínas SAP y EAT-2. European Journal of Immunology. 2002;32:1640-1649). Después las células se lavaron, y el mAb unido se entrecruzó con F (ab')₂ de Ig de cabra anti-ratón. La fosforilación de tirosina de CD84 se determinó después de su unión. Como se muestra en la Figura 3A, la unión de CD84 induce su propia fosforilación de tirosina. A continuación,

se siguió la cascada descendente de CD84, y especialmente su papel en la supervivencia de B-CLL. Anteriormente se demostró que la estimulación de la superficie celular de CD74 en células B-CLL da como resultado la elevación de la expresión de IL-8 y Bcl-2 (Binsky I, Haran M, Starlets D, et al. La IL-8 secretada de una manera dependiente del factor inhibidor de la migración de macrófagos y de CD74 regula la supervivencia de la leucemia linfocítica crónica de células B. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2007;104:13408-13413). Por lo tanto, los niveles de ARNm de IL-8 y Bcl-2 se determinaron después de la estimulación con CD84. Se incubaron células B-CLL en presencia o ausencia de anti-CD84, y se analizaron los niveles de ARNm de IL-8 y Bcl-2, que previamente demostraron que regulaban la supervivencia de B-CLL. Como se muestra en la Figura 3B, la estimulación anti-CD84 aumentó los niveles de ARNm de IL-8 y Bcl-2, y los niveles proteicos de Bcl-2 que indican que la activación de CD84 en B-CLL inicia una cascada de supervivencia.

Para determinar si la cascada de supervivencia de CD84 humana (hCD84) es específica de las células B-CLL, o si esta molécula puede desencadenar una cascada similar en células adicionales, incluidas las células normales, se determinó la señalización de CD84 en células transfectadas con HEK 293T que expresan niveles bajos de CD84 endógeno que da como resultado una versión de CD84 marcada con epítipo c-myc en el C-terminal. La isoforma C de CD84 humana (la principal isoforma encontrada en las células B-CLL) se clonó en la construcción del vector pEF4/Myc-His. Para revelar si hCD84 induce una cascada de supervivencia en las células HEK 293T, se examinó su efecto sobre la transcripción de Bcl-2. De hecho, hCD84 de longitud completa induce la transcripción de Bcl-2 en estas células. Por otra parte, la unión de la superficie celular de hCD84 con un anticuerpo anti-CD84 activador eleva significativamente los niveles de transcripción de Bcl-2 en células HEK 293T (Figura 4 A). Esta elevación era una respuesta específica a la estimulación de CD84 y no ocurrió en células transfectadas con una construcción vacía (Figura 4B). Por tanto, similar a la ruta que se demostró en las células B-CLL, CD84 activa una ruta de supervivencia celular que da como resultado la transcripción de Bcl-2 en células HEK 293T.

Para demostrar directamente que la estimulación con anticuerpo agonista anti-CD84 induce la supervivencia de las células B-CLL, las células B-CLL se incubaron en presencia o ausencia de mAb anti-CD84 y un anticuerpo de control (IgG1) durante 24 h. Después las células se analizaron para determinar la apoptosis mediante tinción de anexinas, como se describió anteriormente (Gore Y, Starlets D, Maharshak N, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) induces B cell survival by activation of a CD74/CD44 receptor complex. J Biol Chem. 2008;283:2784-2792). Como se muestra en la Figura 5, la estimulación de CD84 reduce el porcentaje de células positivas a anexinas. Por tanto, se sugiere que CD74 regula la supervivencia de B-CLL regulando al alza los niveles de expresión de la superficie celular de CD84. La activación de CD84 induce la expresión de Bcl-2, que regula la supervivencia de B-CLL.

Ejemplo 3

Expresión de isoformas de CD84 en B-CLL

Hay al menos cinco isoformas diferentes de CD84. Para determinar si esas isoformas podrían tener funciones distintas y si una isoforma específica podría desempeñar un papel en las células B-CLL, se analizó el patrón de expresión de las diversas isoformas en las células B-CLL. Para seguir las isoformas de ARNm de CD84 a nivel de ARNm, se eligió un enfoque de RT-PCR semicuantitativa, empleando oligonucleótidos diseñados por \cite{palou_genomic_2000}.

Los pares de cebadores 5'CD84comu/3'CD84alt2 flanquean una región que comienza en la parte extracelular y termina en el último exón, que es común a todas las isoformas excepto para CD84e. Por lo tanto, este par de cebadores genera productos de PCR para todas las isoformas, excepto para CD84e, que pueden analizarse mediante el par de cebadores 5'CD84comu/3'CD84orig. Para minimizar los productos de PCR inespecíficos, se optimizó la temperatura de re-asociación y se aumentó de 60 a 64°C. Se diseñó otro par de cebadores, específico para CD84d. Se comparó El ARNm de 12 pacientes diferentes de B-CLL con el ARNm de personas sanas. Las Figuras 6A-B son el resultado de experimentos ejemplares.

En todas las muestras ensayadas (13 pacientes), CD84c era la isoforma dominante en pacientes sanos, y en pacientes con B-CLL en estadio temprano y avanzado. En todas las muestras analizadas, no hubo una correlación clara en los niveles de ARNm de CD84d y CD83e en las muestras de control y de B-CLL.

Ejemplo 4

Motivos de señalización de tirosina de CD84 como mediadores de la señal de supervivencia

Para analizar la cascada de señalización de CD84 en células HEK 293T, primero se analizaron las tirosinas implicadas en la cascada de supervivencia. Por lo tanto, se diseñaron mutantes puntuales en los cuatro motivos de tirosina de CD84c. Dos de estas tirosinas mutadas (Y262 y Y299) son motivos de consenso para las interacciones SH2 con SAP/ EAT2/SHP- 2. Se sabe poco sobre los otros dos motivos que interaccionan con SH2 (Y279 y Y324), de los cuales Y324 se asemeja a un motivo ITIM \cite{vila_the_2007}. Como se muestra en la Figura 7, se generaron dos mutantes diferentes, uno al que le faltaba Y262 y Y299 y el otro al que le faltaba Y279 y Y324.

Para determinar qué motivos regulan la expresión de Bcl-2, las células HEK 293T se transfectaron transitoriamente

con CD84-completo, CD84[Y262F,Y299F], CD84[Y279F, Y324] y vector vacío como control. Las células se colocaron en placas para proporcionar una confluencia de aproximadamente el 70% con el fin de alcanzar cambios detectables en la expresión de Bcl-2. Después de 24-40 h, las células se recogieron y se verificó la expresión de las construcciones examinando con anticuerpo anti-myc (no mostrado). Los niveles de proteína Bcl-2 se analizaron mediante análisis de Western blot. Como se puede ver en las Figuras 8A-D, la activación de Bcl-2 era más pronunciada para la forma de tipo salvaje, indicando que las tirosinas examinadas son importantes para la expresión de Bcl-2. El efecto de CD84-ECD (como se describe a continuación) sobre la expresión de Bcl-2 se muestra adicionalmente en la Figura 8D.

Para seguir más allá de la cascada descendente de CD84, los niveles de ARNm de TAp63 en células HEK transfectadas se analizaron en diferentes puntos de tiempo después de la transfección. Como se muestra en la Figura 9, hubo un aumento en la expresión de ARNm de TAp63 en células transfectadas con CD84-completo, en comparación con células transfectadas con vector vacío, mientras que las mutaciones de tirosina eliminaron este efecto inducido por CD84.

Ejemplo 5

Diseño, expresión y purificación de una proteína CD84 soluble (CD84-ECD)

Además de la activación selectiva de receptores de la superficie celular específicos, el bloqueo de la señalización es una herramienta deseable para estudiar la función de los receptores, que tienen una función desconocida o mecanismos de acción desconocidos.

Como CD84 es un autoligando, la expresión de su dominio extracelular puede dar como resultado la inhibición de la activación de CD84 de la superficie celular de manera competitiva. Por lo tanto, se generó una construcción del dominio extracelular marcado con myc/His6 de CD84 (CD84-ECD) (Figura 10A). Las células HEK 293T se transfectaron con la construcción de CD84-ECD y se recogió el medio acondicionado (CM) de las células. Para probar la secreción de la proteína, el CM se sometió a SDS-PAGE y análisis de Western blot. El sondeo con anticuerpos anti-myc mostró una banda prominente entre 43 kDa y 50 kDa (que se muestra en la Figura 10B).

La proteína CD84-ECD recombinante se purificó del CM con un sistema FLPC. La Figura 11 muestra el perfil de elución de la cromatografía de filtración en gel con una columna Sephadex 200 calibrada, seguido de absorción UV. Se pudieron observar tres picos distintos con tiempos de retención muy superiores al tamaño esperado de CD84-ECD monomérico. El análisis de las fracciones eluidas del pico 1--3 y de las muestras de cromatografía de afinidad Ni²⁺ mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie o Western blot confirmó que la proteína CD84-ECD marcada con myc- y His6 estaba realmente presente en el pico 1 y 2 (Figura 10C) con la cantidad principal en el pico 2 a 65 - 75 mL de volumen de elución. Para verificar la identidad de la proteína, la banda del pico 2 se escindió del gel teñido de Coomassie y se analizó mediante digestión proteolítica seguida de ESI-MS/MS (Figura 10D). Se pudieron detectar 18 fragmentos de proteínas que cubren los aminoácidos 51 a 220.

Para determinar el rendimiento de la proteína producida, el pico 2 eluido de la filtración en gel se concentró hasta un volumen de 500 µl. Para 100 ml de medio o un área de superficie de cultivo celular de 525 cm² se determinó que el rendimiento de proteína era de 50 µg, que es 1 µg/10 cm² (durante 3 días de expresión).

Con el fin de utilizar el CD84-ECD como una molécula de bloqueo competitiva para CD84, las células HEK 293T se transfectaron con CD84-completo y CD84-ECD y se analizó el efecto de CD84-ECD sobre la función de CD84. Como primer experimento, las células HEK 293T se transfectaron con cantidades iguales de ADN plasmídico total del vector vacío, CD84-completo o CD84-completo y CD84-ECD. La expresión de la proteína se verificó mediante análisis de Western blot con anticuerpo anti-myc (Figura 12A). Debido a las diferentes cantidades de ADN plasmídico de CD84-completo, se expresó menos CD84-completo en las células co-transfectadas. Las células CD84-completo transfectadas mostraron un aumento en la expresión de Bcl-2, en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Este aumento se eliminó en las células co-transfectadas con CD84-ECD (Figura 12A). Como muestra la Figura 12B, la transfección con CD84-ECD en solitario no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de expresión de Bcl-2. Dado que las diferentes cantidades de CD84-completo podrían ser responsables de la menor expresión de Bcl-2 en las células co-transfectadas, se realizó un experimento similar con cantidades iguales de ADN plasmídico de CD84-completo con un resultado similar (Figura 12C).

Otro enfoque fue transfectar las líneas celulares CD84 establecidas con CD84-EDC. Las células HEK 293T y la línea celular CD84s20 se transfectaron con vectores vacíos o de CD84-ECD. Después de 24 h, se analizaron los niveles de ARNm por RT-PCR semicuantitativa con Actina como gen de referencia (Figura 13). Mientras que las células HEK 293T no mostraron cambios sustanciales en la expresión de Bcl-2 después de la transfección con CD84-ECD, la línea celular estable exhibió una disminución notable en los niveles de ARNm de Bcl-2 y p63.

Para mostrar directamente el efecto de CD84-ECD sobre la cascada de supervivencia inducida por CD84, se recogió medio acondicionado derivado de células transfectadas con CD84-ECD (véase la Figura 14). El CM se concentró y se diluyó nuevamente en el medio de cultivo celular para alcanzar una concentración final de CD84-ECD de 0,3 µg/mL, que era aproximadamente la cantidad de CD84-ECD en los experimentos anteriores o 3,75 µg/mL de CD84-ECD (que debería conducir al entrecruzamiento de CD84 por altas cantidades de proteína, adheridas a las

superficies). La línea celular que expresa CD84 se incubó en presencia o ausencia de CM de concentración alta o baja. Como se muestra en la Figura 14, niveles bajos de CD84-ECD inhiben la elevación del ARNm de Bcl-2 en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. La incubación con la alta concentración de CD84-ECD da como resultado un aumento drástico de Bcl-2. Tomados en conjunto estos resultados, el dominio extracelular de CD84 es un candidato prometedor para futuras investigaciones con el fin de encontrar una molécula de bloqueo para CD84.

Ejemplo 6

Anticuerpos anti CD84 que se pueden emplear como anticuerpos neutralizantes o anticuerpos activadores

Protocolo del hibridoma

10 La proteína CD84-ECD se purificó del medio acondicionado derivado de células HEK 293T transfectadas con la construcción CD84-ECD. Los ratones se inyectaron durante 5 meses con CD84-ECD. Después del test sanguíneo ELISA positivo para anticuerpos frente a CD84-ECD, se extrajeron los bazos, se aislaron los linfocitos y se mezclaron con células NSO (células de mieloma murino). Se seleccionó el hibridoma y se analizó su sup para el reconocimiento de CD84-ECD empleando el ensayo ELISA.

15 Para determinar si la superficie celular de CD84 transmite una señal que da como resultado la activación de cascadas descendentes de señalización en las células B-CLL, el CD84 se entrecruzó con anti-CD84 (Santa Cruz) o control de anticuerpos IgG1 mAb (Abcam) [Tangye, 2002]. Después las células se lavaron, y el mAb unido se entrecruzó con F(ab')₂ de Ig de cabra anti-ratón. Después de la unión se examinó primero la fosforilación de tirosina de CD84. Como se muestra en la Figura 3A, la activación de CD84 induce la fosforilación de su cola citoplasmática, indicando el inicio de una cascada de señalización. A continuación, se examinó la cascada descendente de CD84, y especialmente su papel en la supervivencia de B-CLL. Anteriormente se demostró que la estimulación de la superficie celular de CD74 en células B-CLL da como resultado la elevación de la expresión de IL-8 y Bcl-2 [Binsky, 2007]. Por lo tanto, los niveles de ARNm de IL-8 y Bcl-2 se analizaron después de la estimulación con CD84. Las células de B-CLL se incubaron en presencia o ausencia de anti-CD84, y se analizaron los niveles de ARNm de IL-8 y Bcl-2. Como se muestra en la Figura 3B, la estimulación de CD84 incrementó los niveles de ARNm de IL-8 y Bcl-2, indicando que la activación de CD84 en células B-CLL inicia una cascada de supervivencia.

30 Para determinar directamente si CD74 induce la supervivencia de B-CLL de una manera dependiente de CD84, se bloqueó la actividad de CD84 empleando un anticuerpo de bloqueo de CD84 disponible comercialmente (CD84.1.21 Biologend) y se siguió la cascada de supervivencia inducida por MIF. Se analizaron los niveles de ARNm de ARNm de Bcl-2 (Figura 15A) y de proteína (Figura 15B) y la supervivencia celular se analizó mediante tinción FLICA (Figura 15C). El bloqueo de CD84 disminuyó la expresión de Bcl-2 y la muerte celular elevada en las células tratadas con MIF, lo que demuestra que CD84 es un componente esencial en la cascada de supervivencia inducida por CD74.

35 Para determinar si los anticuerpos monoclonales para CD84 transmiten una señal que da como resultado la activación o inhibición de las cascadas de señalización descendentes de CD84 en células B-CLL, las células CLL se trataron con sobrenadante derivado del hibridoma D1-300 y F8-500. 18 horas después, los niveles de ARNm de Bcl-2 se analizaron mediante PCR en tiempo real. Como se muestra en las Figuras 16A-B, la incubación con anticuerpos derivados del hibridoma D1-300 dio como resultado una regulación al alza de los niveles de ARNm de Bcl-2 (Figura 16A), así como también reduce la población apoptótica (Figura 16B), indicando que este hibridoma activa la cascada de supervivencia de CD84 en células B-CLL. Sin embargo, la incubación con anticuerpos derivados del hibridoma F8-500 disminuyó los niveles de ARNm de Bcl-2 (Figura 16A) e induce la muerte celular (Figura 16B), indicando que este hibridoma inhibe la cascada de señalización de CD84. Para analizar más a fondo el efecto inhibidor de los anticuerpos derivados del hibridoma F8-500, las células B-CLL se trataron con MIF junto con los anticuerpos derivados del hibridoma F8-500. Después se analizó la población apoptótica mediante tinción magic red. Como se muestra en la Figura 17, el hibridoma F8-500 eliminó la cascada de supervivencia inducida por MIF, indicando que CD84 es un componente esencial en la cascada de supervivencia inducida por CD74 y que su bloqueo induce la muerte celular.

Listado de secuencias

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENTS CO. LTD.

SHACHAR, Idit

50 BINSKY, Inbal

SOBOTTA, Mirko

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR B-CLL

<130> 46712

<150> US 61/136,651

<151> 23-09-2008

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 780

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que expresa CD84 soluble

10 <400> 1

```

atggctcagc accacctatg gatcttgctc ctttgcctgc aaacctggcc ggaagcagct      60
ggaaaagact cagaaatctt cacagtgaat gggattctgg gagagtcagt cactttccct      120
gtaaatatcc aagaaccacg gcaagttaa atcattgctt ggacttctaa aacatctggt      180
gcttatgtaa caccaggaga ctcagaaaca gcacctgtag ttactgtgac ccacagaaat      240
tattatgaac ggatacatgc cttaggtccg aactacaatc tggtcattag cgatctgagg      300
atggaagacy caggagacta caaagcagac ataaatacac aggctgatcc ctacaccacc      360
accaagcgtc acaacctgca aatctatcgt cggcttggga aaccaaaaat tacacagagt      420
ttaatggcat ctgtgaacag cacctgtaat gtcacactga catgctctgt agagaaagaa      480
gaaaagaatg tgacatacaa ttggagtccc ctgggagaag agggtaatgt ccttcaaadc      540
ttccagactc ctgaggacca agagctgact tacacgtgta cagcccagaa cctgtcagc      600
aacaattctg actccatctc tgcccggcag ctctgtgcag acatcgcaat gggcttccgt      660
gaattctgca gatatccagc acagtggcgg ccgctcagat ctagagggcc cttcgaacaa      720
aaactcatct cagaagagga tctgaatatg cataccggtc atcatcacca tcaccattga      780
    
```

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido CD84 soluble

<400> 2

```

Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
1           5           10           15
    
```

```

Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
           20           25           30
    
```

20

ES 2 800 328 T3

Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
 35 40 45

Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
 50 55 60

Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
 65 70 75 80

Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile
 85 90 95

Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn
 100 105 110

Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Leu Met Ala Ser Val Asn Ser Thr
 115 120 125

Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu Glu Lys Asn Val
 130 135 140

Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn Val Leu Gln Ile
 145 150 155 160

Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr Cys Thr Ala Gln
 165 170 175

Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala Arg Gln Leu Cys
 180 185 190

Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Glu Phe Cys Arg Tyr Pro Ala Gln
 195 200 205

Trp Arg Pro Leu Glu Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 210 215 220

Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His
 225 230 235

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 3

tacatgcctt aggtccga 18

10 <210> 4

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 4

gaggaagca ccttgt 16

<210> 5

<211> 24

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 5
 tgcctgcaaa cctggccgga agca 24

 <210> 6
 <211> 26
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 6
 10 tgcaggtgt agcgcttgg ggtgt 26

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 7
 agcgtgccag gcgtgtactg 20

 <210> 8
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 25 <400> 8
 acaccagcca actcccacc a 21

 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 9
 gctcaaggaa ggggtgatg gc 22

 35 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 10
 tctgtgctg gtggcagaa c 21

 <210> 11
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

 <400> 11
 50 acaagtgaag tcaacatgcc 20

- <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 12
 gcaagtgaat gaacacctc 20
- 10 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- 15 <400> 13
 tgaagtgtga cgtggacatc eg 22
- <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 14
 gctgtcacct tcaccgttc ag 22
- 25 <210> 15
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- 30 <400> 15
 gatgctgcct caaagaaaac catattcaca tatatcatgg cttc 44
- <210> 16
 <211> 44
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 16
 gaagccatga tatatgtgaa tatggtttc ttgaggcag catc 44
- <210> 17
 <211> 34
 <212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 17
 gagccagtga acacagtttt ttccgaagtg cagt 34
- <210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
- 50

- <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 18
5 actgcacttc ggaaaaaact gtgtcactg gctc 34
- <210> 19
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 19
gccagcagag tccagaatct ttgatgaaat cctg 34
- 15 <210> 20
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- 20 <400> 20
caggatttca tcaaagattc tggactctgc tggc 34
- <210> 21
<211> 35
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 21
acctcctggg acttcaagct ttgaaattgt gatcg 35
- 30 <210> 22
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
35 <223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 22
cgatcacaat ttcaaagctt gaagtcccag gaggt 35
- <210> 23
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
- <400> 23
45 cgtcggatcc atggctcagc accac 25
- <210> 24
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>

<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 24

tagcgaattc acggaagccc attgc 25

5

<210> 25

<211> 1118

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 25

```

cggctcaagt gaactgactc tgctagaaca gtgccgtgct tttccacaga aggttagacc      60
ctgaaagaga tggctcagca ccacctatgg atcttgctcc ttgcoctgca aacctggcgg      120
gaagcagctg gaaaagactc agaaatcttc acagtgaatg ggattctggg agagtcagtc      180
actttccctg taaatatcca agaaccacgg caagttaaaa tcattgcttg gacttctaaa      240
acatctgttg cttatgtaac accaggagac tcagaaacag caccocgtagt tactgtgacc      300
cacagaaatt attatgaacg gatacatgcc ttaggtccga actacaatct ggtcattagc      360
gatctgagga tgggaagcgc aggagactac aaagcagaca taaatacaca ggctgatccc      420
tacaccacca ccaagcgcta caacctgcaa atctatcgtc ggcttgggaa accaaaaatt      480
acacagagtt taatggcatc tgtgaacagc acctgtaatg tcacactgac atgctctgta      540
gagaaagaag aaaagaatgt gacatacaat tggagtcccc tgggagaaga gggtaatgtc      600
cttcaaatct tccagactcc tgaggaccaa gagctgactt acacgtgtac agcccagaac      660
cctgtcagca acaattctga ctccatctct gcccggcagc tctgtgcaga catcgcaatg      720
ggcttccgta ctaccacac cgggttgctg agcgtgctgg ctatgttctt tctgcttgtt      780
ctcattctgt cttcagtggt tttgttccgt ttgttcaaga gaagacaagg taggattttc      840
ccagaaggtt cctgcttgaa caccttcaact aagaaccctt atgctgcctc aaagaaaacc      900
atatacacat atatcatggc ttoaaggaac acccagccag cagagtccag aatctatgat      960
gaaatcctgc agtccaaggt gcttccctcc aaggaagagc cagtgaacac agttttattcc     1020
gaagtgcagt ttgctgataa gatggggaaa gccagcacac aggacagtaa acctcctggg     1080
acttcaagct atgaaattgt gatctaggct gctgggct                               1118

```

10

<210> 26

<211> 345

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 800 328 T3

Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
1 5 10 15

Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
20 25 30

Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
35 40 45

Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
50 55 60

Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile
85 90 95

Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn
100 105 110

Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Thr Lys Arg Tyr Asn Leu Gln Ile
115 120 125

Tyr Arg Arg Leu Gly Lys Pro Lys Ile Thr Gln Ser Leu Met Ala Ser
130 135 140

Val Asn Ser Thr Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu
145 150 155 160

Glu Lys Asn Val Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn
165 170 175

Val Leu Gln Ile Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr
180 185 190

Cys Thr Ala Gln Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala
195 200 205

Arg Gln Leu Cys Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Thr His His Thr
210 215 220

Gly Leu Leu Ser Val Leu Ala Met Phe Phe Leu Leu Val Leu Ile Leu
225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Leu Phe Arg Leu Phe Lys Arg Arg Gln Gly Arg Ile
245 250 255

Phe Pro Glu Gly Ser Cys Leu Asn Thr Phe Thr Lys Asn Pro Tyr Ala
260 265 270

Ala Ser Lys Lys Thr Ile Tyr Thr Tyr Ile Met Ala Ser Arg Asn Thr
275 280 285

Gln Pro Ala Glu Ser Arg Ile Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ser Lys Val
290 295 300

Leu Pro Ser Lys Glu Glu Pro Val Asn Thr Val Tyr Ser Glu Val Gln
305 310 315 320

Phe Ala Asp Lys Met Gly Lys Ala Ser Thr Gln Asp Ser Lys Pro Pro
325 330 335

Gly Thr Ser Ser Tyr Glu Ile Val Ile
340 345

ES 2 800 328 T3

<210> 27
 <211> 1100
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 27
 cggctcaagt gaactgactc tgctagaaca gtgccgtgct tttccacaga aggttagacc 60
 ctgaaagaga tggctcagca ccacctatgg atcttgctcc tttgcctgca aaacctggccg 120
 gaagcagctg gaaaagactc agaaatcttc acagtgaatg ggattctggg agagtcagtc 180
 actttccctg taaatatcca agaaccacgg caagttaaaa tcattgcttg gacttctaaa 240
 acatctgttg cttatgtaac accaggagac tcagaaacag caccctagt tactgtgacc 300
 cacagaaatt attatgaacg gatacatgcc ttaggtccga actacaatct ggtcattagc 360
 gatctgagga tgggaagcgc aggagactac aaagcagaca taaatacaca ggctgatccc 420
 tacaccacca ccaatgctca caacctgcaa atctatcgtc ggcttgggaa accaaaaatt 480
 acacagagtt taatggcacc tgtgaacagc aacctgtaatg tcacactgac atgctctgta 540
 gagaaagaag aaaagaatgt gacatacaat tggagtcccc tgggagaaga gggtaatgtc 600
 cttcaaatct tccagactcc tgaggaccaa gagctgactt acacgtgtac agcccagaac 660
 cctgtcagca acaattctga ctccatctct gcccggcagc tctgtgcaga catcgcaatg 720
 ggcttccgta ctcaccacac cgggttgctg agcgtgctgg ctatgttctt tctgcttgtt 780
 ctcatctgtt cttcagtggt tttgttccgt ttgttcaaga gaagacaagg ttctctgctg 840
 aacaccttca ctaagaacct ttatgctgcc tcaagaaaa ccatatacac atatatcatg 900
 gcttcaagga acaccagcc agcagagctc agaatctatg atgaaatcct gcagtccaag 960
 gtgcttccct ccaaggaaga gccagtgaac acagtttatt ccgaagtgca gtttgctgat 1020
 aagatgggga aagccagcac acaggacagt aaacctcctg ggacttcaag ctatgaaatt 1080
 gtgatctagg ctgctgggct 1100

10 <210> 28
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28

ES 2 800 328 T3

Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
1 5 10 15

Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
20 25 30

Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
35 40 45

Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
50 55 60

Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile
85 90 95

Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn
100 105 110

Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Thr Lys Arg Tyr Asn Leu Gln Ile
115 120 125

Tyr Arg Arg Leu Gly Lys Pro Lys Ile Thr Gln Ser Leu Met Ala Ser
130 135 140

Val Asn Ser Thr Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu
145 150 155 160

Glu Lys Asn Val Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn
165 170 175

Val Leu Gln Ile Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr
180 185 190

Cys Thr Ala Gln Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala
195 200 205

Arg Gln Leu Cys Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Thr His His Thr
210 215 220

Gly Leu Leu Ser Val Leu Ala Met Phe Phe Leu Leu Val Leu Ile Leu
225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Leu Phe Arg Leu Phe Lys Arg Arg Gln Gly Ser Cys
245 250 255

Leu Asn Thr Phe Thr Lys Asn Pro Tyr Ala Ala Ser Lys Lys Thr Ile
260 265 270

Tyr Thr Tyr Ile Met Ala Ser Arg Asn Thr Gln Pro Ala Glu Ser Arg
275 280 285

Ile Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ser Lys Val Leu Pro Ser Lys Glu Glu
290 295 300

Pro Val Asn Thr Val Tyr Ser Glu Val Gln Phe Ala Asp Lys Met Gly
305 310 315 320

Lys Ala Ser Thr Gln Asp Ser Lys Pro Pro Gly Thr Ser Ser Tyr Glu
325 330 335

Ile Val Ile

<210> 29
<211> 1067
<212> ADN

ES 2 800 328 T3

<213> Homo sapiens

<400> 29

```

cggctcaagt gaactgactc tgctagaaca gtgccgtgct tttccacaga aggttagacc      60
ctgaaagaga tggctcagca ccacctatgg atcttgctcc tttgctgca aacctggccg      120
gaagcagctg gaaaagactc agaaatcttc acagtgaatg ggattctggg agagtcagtc      180
actttccctg taaatatcca agaaccacgg caagttaaaa tcattgcttg gacttctaaa      240
acatctgttg cttatgtaac accaggagac tcagaaacag caccgtagt tactgtgacc      300
cacagaaatt attatgaacg gatacatgcc ttaggctcga actacaatct ggtcattagc      360
gatctgagga tgggaagcgc aggagactac aaagcagaca taaatacaca ggctgatccc      420
tacaccacca ccaagcgcta caacctgcaa atctatcgtc ggcttgggaa accaaaaatt      480
acacagagtt taatggcadc tgtgaacagc acctgtaatg tcacactgac atgctctgta      540
gagaaagaag aaaagaatgt gacatacaat tggagtcccc tgggagaaga gggtaatgtc      600
cttcaaatct tccagactcc tgaggaccaa gagctgactt acacgtgtac agcccagaac      660
cctgtcagca acaattctga ctccatctct gcccggcagc tctgtgcaga catcgcaatg      720
ggcttccgta ctcaccacac cgggttgctg agcgtgctgg ctatgttctt tctgcttggt      780
ctcattctgt cttcagtggt tttgttccgt ttgttcaaga gaagacaaga tgetgcctca      840
aagaaaacca tatacacata tatcatggct tcaaggaaca cccagccagc agagtccaga      900
atctatgatg aaatcctgca gtccaaggtg ctccctcca aggaagagcc agtgaacaca      960
gtttattccg aagtgcagtt tgctgataag atggggaaag ccagocaca ggacagtaaa     1020
cctcctggga cttcaagcta tgaaattgtg atctaggctg ctgggct                       1067

```

<210> 30

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

5

ES 2 800 328 T3

Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
 20 25 30

Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
 35 40 45

Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
 50 55 60

Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
 65 70 75 80

Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile
 85 90 95

Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn
 100 105 110

Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Thr Lys Arg Tyr Asn Leu Gln Ile
 115 120 125

Tyr Arg Arg Leu Gly Lys Pro Lys Ile Thr Gln Ser Leu Met Ala Ser
 130 135 140

Val Asn Ser Thr Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu
 145 150 155 160

Glu Lys Asn Val Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn
 165 170 175

Val Leu Gln Ile Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr
 180 185 190

Cys Thr Ala Gln Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala
 195 200 205

Arg Gln Leu Cys Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Thr His His Thr
 210 215 220

Gly Leu Leu Ser Val Leu Ala Met Phe Phe Leu Leu Val Leu Ile Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Leu Phe Arg Leu Phe Lys Arg Arg Gln Asp Ala Ala
 245 250 255

Ser Lys Lys Thr Ile Tyr Thr Tyr Ile Met Ala Ser Arg Asn Thr Gln
 260 265 270

Pro Ala Glu Ser Arg Ile Tyr Asp Glu Ile Leu Gln Ser Lys Val Leu
 275 280 285

Pro Ser Lys Glu Glu Pro Val Asn Thr Val Tyr Ser Glu Val Gln Phe
 290 295 300

Ala Asp Lys Met Gly Lys Ala Ser Thr Gln Asp Ser Lys Pro Pro Gly
 305 310 315 320

Thr Ser Ser Tyr Glu Ile Val Ile
 325

<210> 31

<211> 967

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

ES 2 800 328 T3

<400> 31
 cggctcaagt gaactgactc tgctagaaca gtgccgtgct tttccacaga aggttagacc 60
 ctgaaagaga tggctcagca ccacctatgg atcttgctcc ttgacctgca aacctggccg 120
 gaagcagctg gaaaagactc agaaatcttc acagtgaatg ggattctggg agagtcagtc 180
 actttccctg taaatatcca agaaccacgg caagttaaaa tcattgcttg gacttctaaa 240
 acatctggtg cttatgtaac accaggagac tcagaaacag caccocgtagt tactgtgacc 300
 cacagaaatt attatgaacg gatacatgcc ttaggtccga actacaatct ggtcattagc 360
 gatctgagga tgyaagacgc aggagactac aaagcagaca taaatacaca ggctgatccc 420
 tacaccacca ccaagcgcga caacctgcaa atctatcgtc ggcttgggaa accaaaaatt 480
 acacagagtt taatggcacc tgtgaacagc acctgtaatg tcacactgac atgctctgta 540
 gagaaagaag aaaagaatgt gacatacaat tggagtcccc tgggagaaga gggtaatgtc 600
 cttcaaatct tccagactcc tgaggaccaa gagctgactt acacgtgtac agcccagaac 660
 cctgtcagca acaattctga ctccatctct gcccggcagc totgtgcaga catcgcaatg 720
 ggcttccgta ctcaccacac cggggttgctg agcgtgctgg ctatgttctt tctgcttgtt 780
 ctcatctgt cttcagtgtt ttgttccgt ttgttcaaga gaagacaagg tgcttccctc 840
 caaggaagag ccaatgaaca cagtttattc cgaagtgcag ttgctgata agatgyggaa 900
 agccagcaca caggacagta aacctcctgg gacttcaagc tatgaaattg tgatctaggc 960
 tgctggg 967

<210> 32

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
 1 5 10 15

5

ES 2 800 328 T3

Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
 20 25 30

Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
 35 40 45

Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
 50 55 60

Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
 65 70 75 80

Tyr Tyr Glu Arg Ile His Ala Leu Gly Pro Asn Tyr Asn Leu Val Ile
 85 90 95

Ser Asp Leu Arg Met Glu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Ala Asp Ile Asn
 100 105 110

Thr Gln Ala Asp Pro Tyr Thr Thr Thr Lys Arg Tyr Asn Leu Gln Ile
 115 120 125

Tyr Arg Arg Leu Gly Lys Pro Lys Ile Thr Gln Ser Leu Met Ala Ser
 130 135 140

Val Asn Ser Thr Cys Asn Val Thr Leu Thr Cys Ser Val Glu Lys Glu
 145 150 155 160

Glu Lys Asn Val Thr Tyr Asn Trp Ser Pro Leu Gly Glu Glu Gly Asn
 165 170 175

Val Leu Gln Ile Phe Gln Thr Pro Glu Asp Gln Glu Leu Thr Tyr Thr
 180 185 190

Cys Thr Ala Gln Asn Pro Val Ser Asn Asn Ser Asp Ser Ile Ser Ala
 195 200 205

Arg Gln Leu Cys Ala Asp Ile Ala Met Gly Phe Arg Thr His His Thr
 210 215 220

Gly Leu Leu Ser Val Leu Ala Met Phe Phe Leu Leu Val Leu Ile Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Leu Phe Arg Leu Phe Lys Arg Arg Gln Gly Ala Ser
 245 250 255

Leu Gln Gly Arg Ala Ser Glu His Ser Leu Phe Arg Ser Ala Val Cys
 260 265 270

<210> 33

<211> 1299

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 33

ES 2 800 328 T3

```

cggtcaagt gaactgactc tgctagaaca gtgccgtgct tttccacaga aggttagacc      60
ctgaaagaga tggctcagca ccacctatg atcttgctcc tttgcctgca aacctggccg     120
gaagcagctg gaaaagactc agaatcttc acagtgaatg ggattctggg agagtcagtc     180
actttccctg taaatatcca agaaccacgg caagttaaaa tcattgcttg gacttctaaa     240
acatctggtg cttatgtaac accaggagac tcagaaacag caccctagtg tactgtgacc     300
cacagaaatt attatgaacg gatacatgcc ttaggtccga actacaatct ggtcattagc     360
gatctgagga tgggaagcgc aggagactac aaagcagaca taaatacaca ggctgatccc     420
tacaccacca ccaagcgcga caacctgcaa atctatcgtc ggcttgggaa accaaaaaatt     480
acacagagtt taatggcacc tgtgaacagc acctgtaatg tcacactgac atgctctgta     540
gagaaagaag aaaagaatgt gacatacaat tggagtcccc tgggagaaga gggtaatgtc     600
cttcaaatct tccagactcc tgaggacca gagctgactt acacgtgtac agcccagaac     660
cctgtcagca acaattctga ctccatctct gcccggcagc tctgtgcaga catcgcaatg     720
ggcttccgta ctcaccacac cgggttgctg agcgtgctgg ctatgttctt tctgcttggt     780
ctcattctgt cttcagtggt ttgttccgt ttgttcaaga gaagacaagg taggattttc     840
ccagaaggta aaatgtgaa actcaccttc tctcctcctg ggactgaagc catttatcca     900
aggtttagct gaaaggccca ttgttccagg gaatctgcct ttttccgac tccacccac     960
cacctccag aatgatggct ctgaggatgy tatgacatta cctgaaatgg tcttcagaat    1020
ccattcctga gatcaccagt agctggtggg ccagaacat gggttcgagc ttagtacata    1080
catgaacaag ctgtgcttca ctgtacgagt gtgttcacct ttccgctcag gcccctcaca    1140
tgtgaaatgt ttgactaga ggatctccag ggtcaacttc aatttcattg tattttgatt    1200
atgactattg gagagtcatt gagaacata tactaatcct gtactccatg gttgtcacta    1260
tgtccctctg aatccctctg gatcattctg tagttgtgc                                1299

```

<210> 34

<211> 280

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

```

Met Ala Gln His His Leu Trp Ile Leu Leu Leu Cys Leu Gln Thr Trp
 1          5          10          15

Pro Glu Ala Ala Gly Lys Asp Ser Glu Ile Phe Thr Val Asn Gly Ile
 20          25          30

Leu Gly Glu Ser Val Thr Phe Pro Val Asn Ile Gln Glu Pro Arg Gln
 35          40          45

Val Lys Ile Ile Ala Trp Thr Ser Lys Thr Ser Val Ala Tyr Val Thr
 50          55          60

Pro Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Val Thr Val Thr His Arg Asn
 65          70          75          80

```


REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para diagnosticar B-CLL en un sujeto que lo necesita, el método comprende determinar en una muestra biológica del sujeto un nivel de isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 30), en donde un aumento en dicho nivel de dicha isoforma C de CD84 (SEQ ID NO: 30) por encima de un límite predeterminado con respecto a un nivel de dicho CD84 en una muestra biológica de un individuo sano es indicativo de la B-CLL.
- 2.** Un agente que disminuye la actividad o expresión de CD84 para su uso en el tratamiento de B-CLL, en donde dicho agente se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 (i) un anticuerpo neutralizante de CD84;
- (ii) un agente de ácido nucleico para disminuir la expresión de dicho CD84, seleccionándose dicho agente de ácido nucleico del grupo que consiste en un antisentido, un ARNsi, una ribozima y una ADNzima; y
- (iii) un CD84 soluble, donde dicho CD84 soluble se une a CD84 expresado en células B e inhibe su interacción homofílica.
- 3.** El método de la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica comprende células B y en donde dicha determinación es en dichas células B.
- 15 **4.** El método de la reivindicación 1, en donde dicha determinación se efectúa a nivel del ARNm.
- 5.** El método de la reivindicación 1, en donde dicha determinación se efectúa a nivel proteico.
- 6.** El método de la reivindicación 1, que comprende además corroborar el diagnóstico empleando un ensayo de diagnóstico seleccionado de la expresión de marcador de superficie distintivo de dicha isoforma C de CD84, el análisis de cariotipo y las mutaciones de línea germinal.
- 20 **7.** El método de la reivindicación 1, que comprende además informar al sujeto de la enfermedad.

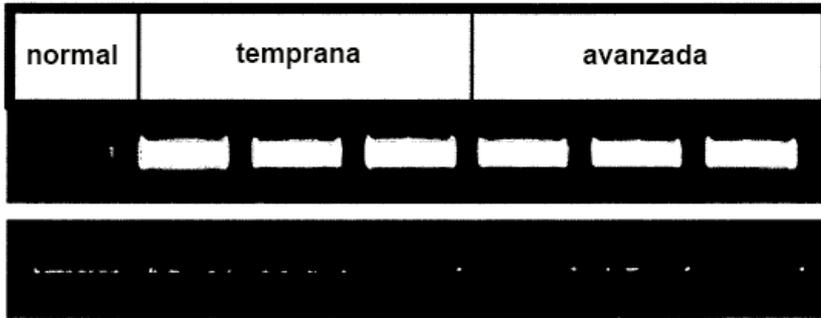


FIG. 1A

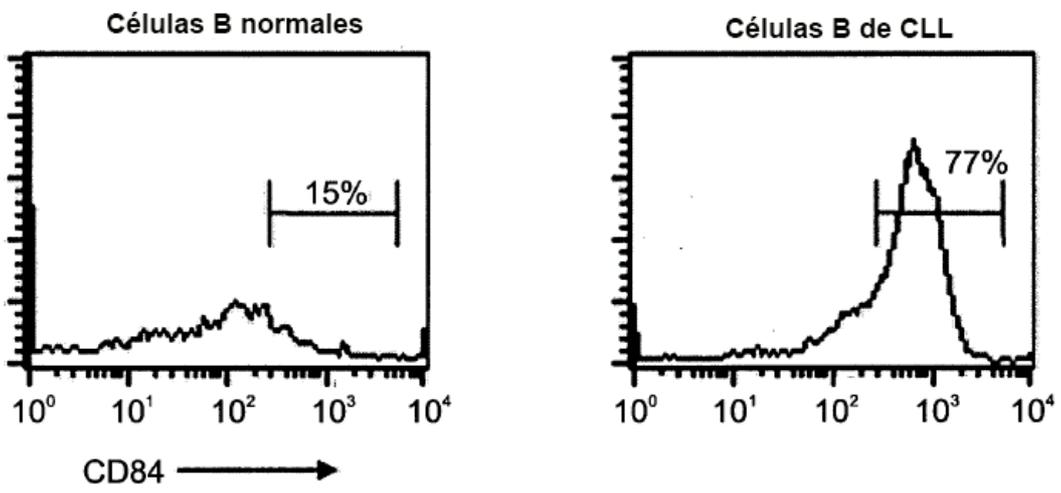


FIG. 1B

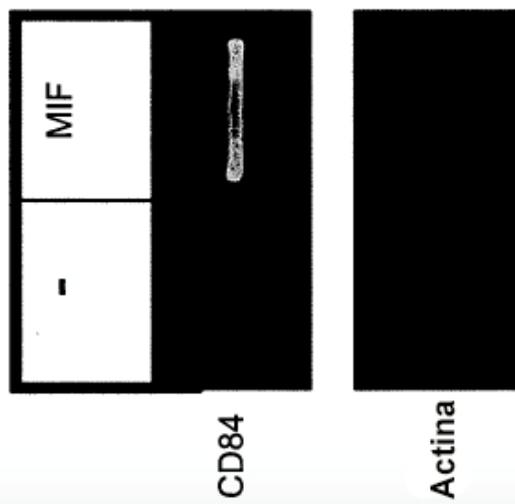


FIG. 2A

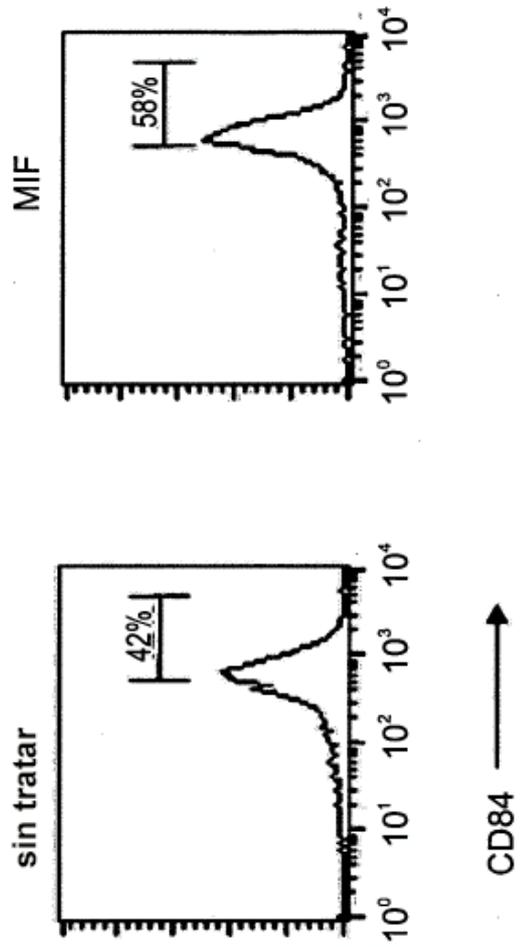


FIG. 2B

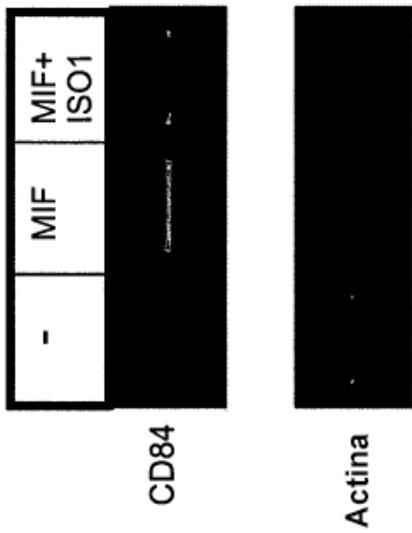


FIG. 2C

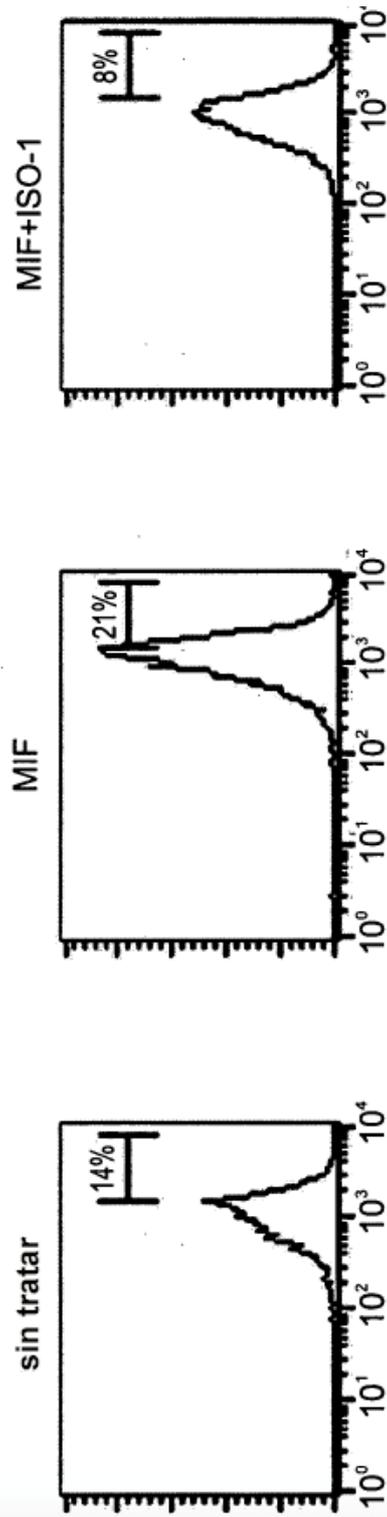


FIG. 2D

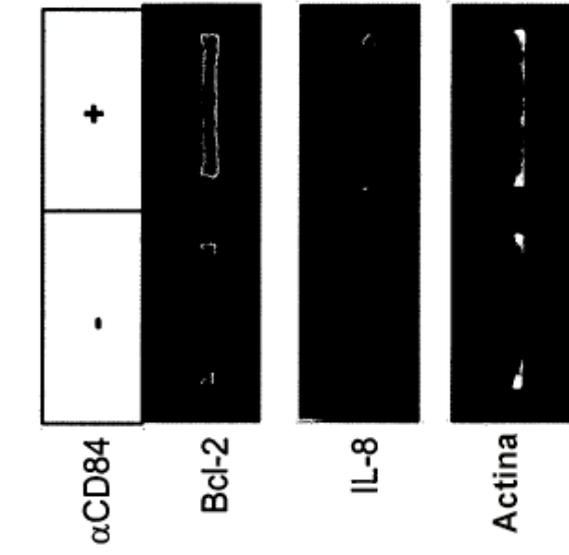
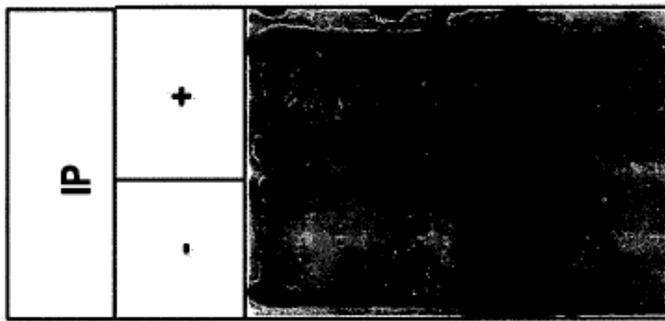
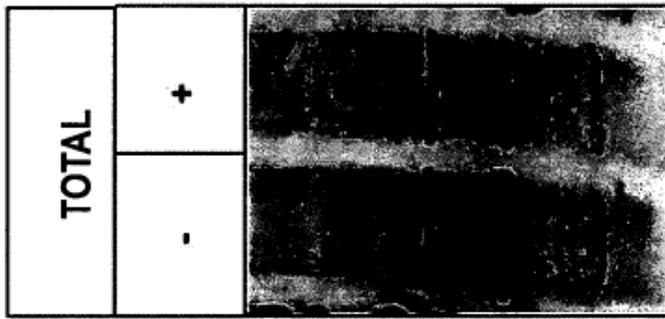


FIG. 3B



IP: pTyr
IB: anti-CD84

FIG. 3A

α CD84
CD84 \longrightarrow

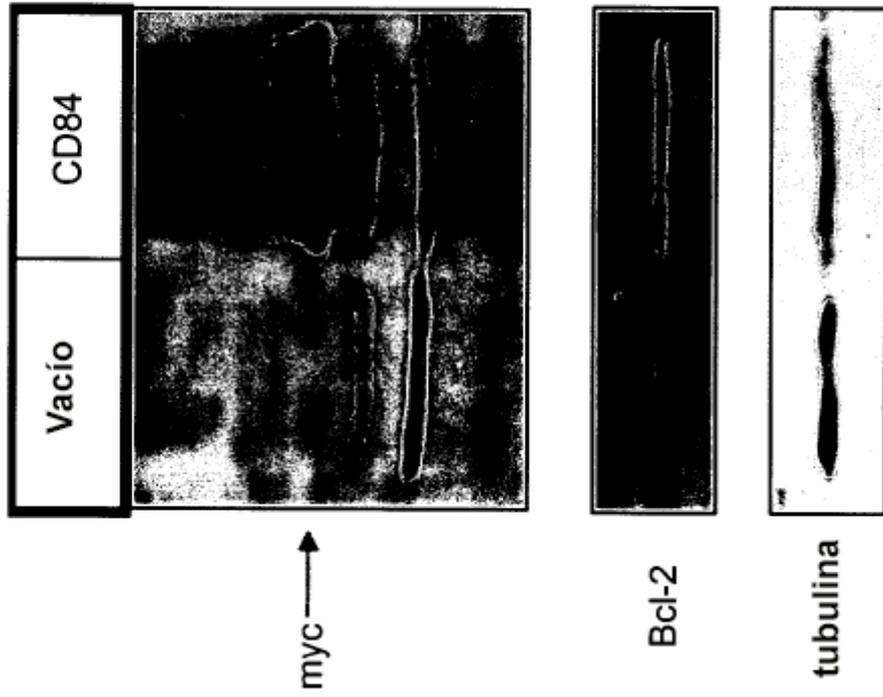


FIG. 4B

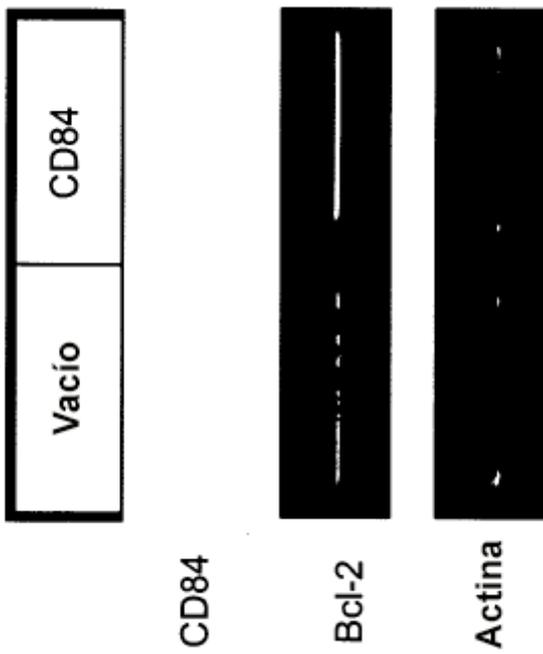


FIG. 4A

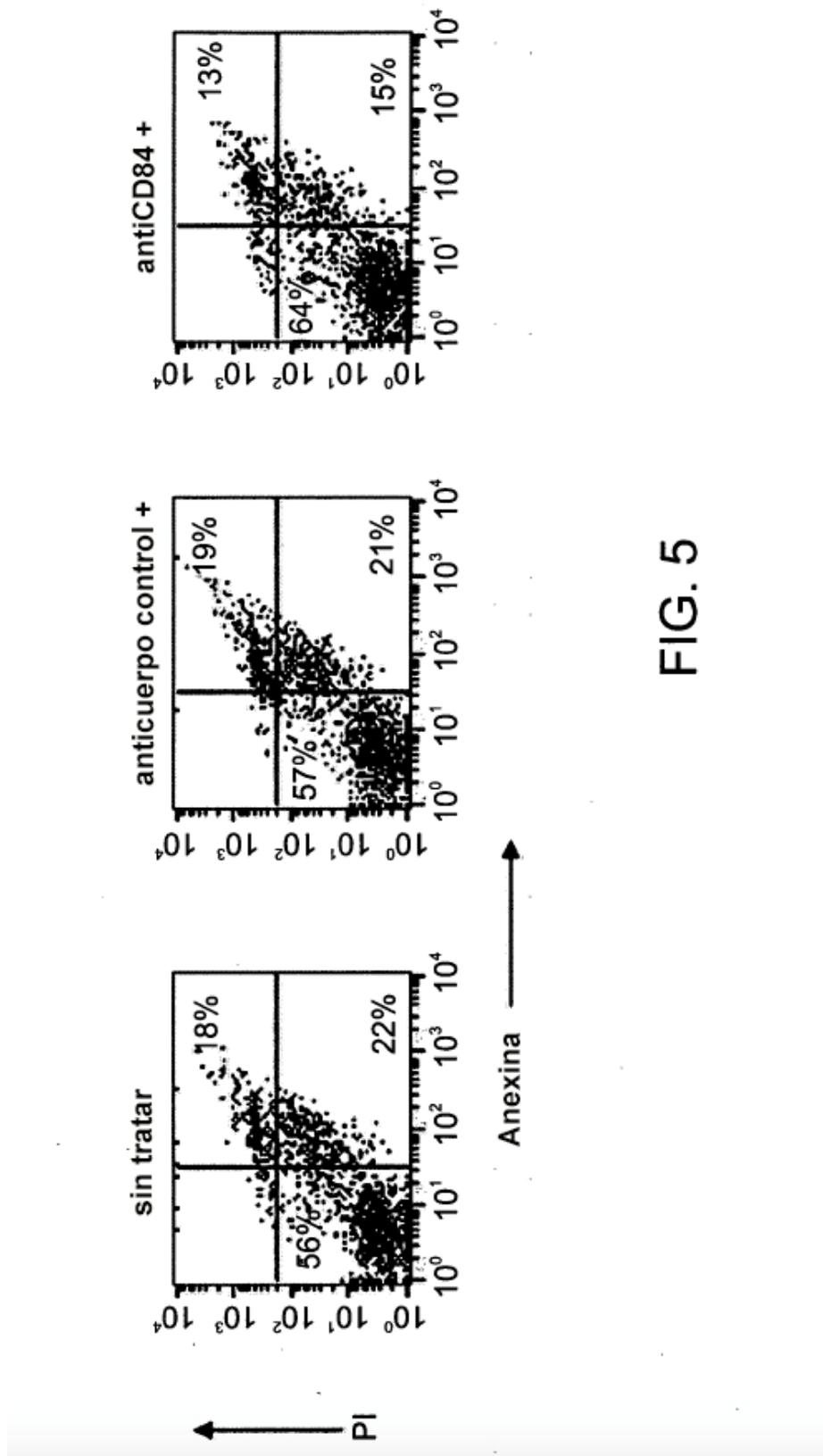


FIG. 5

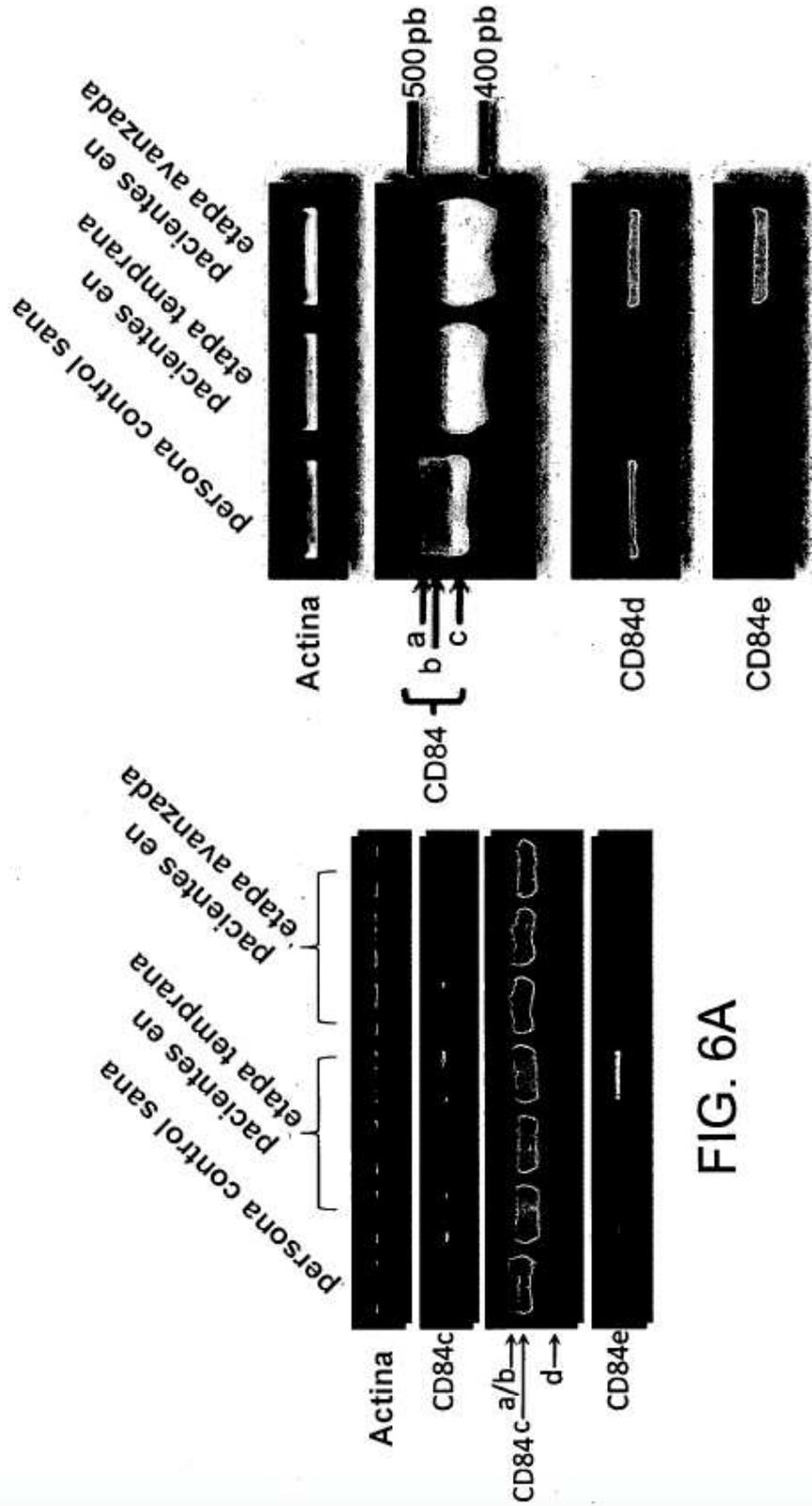


FIG. 6B

FIG. 6A

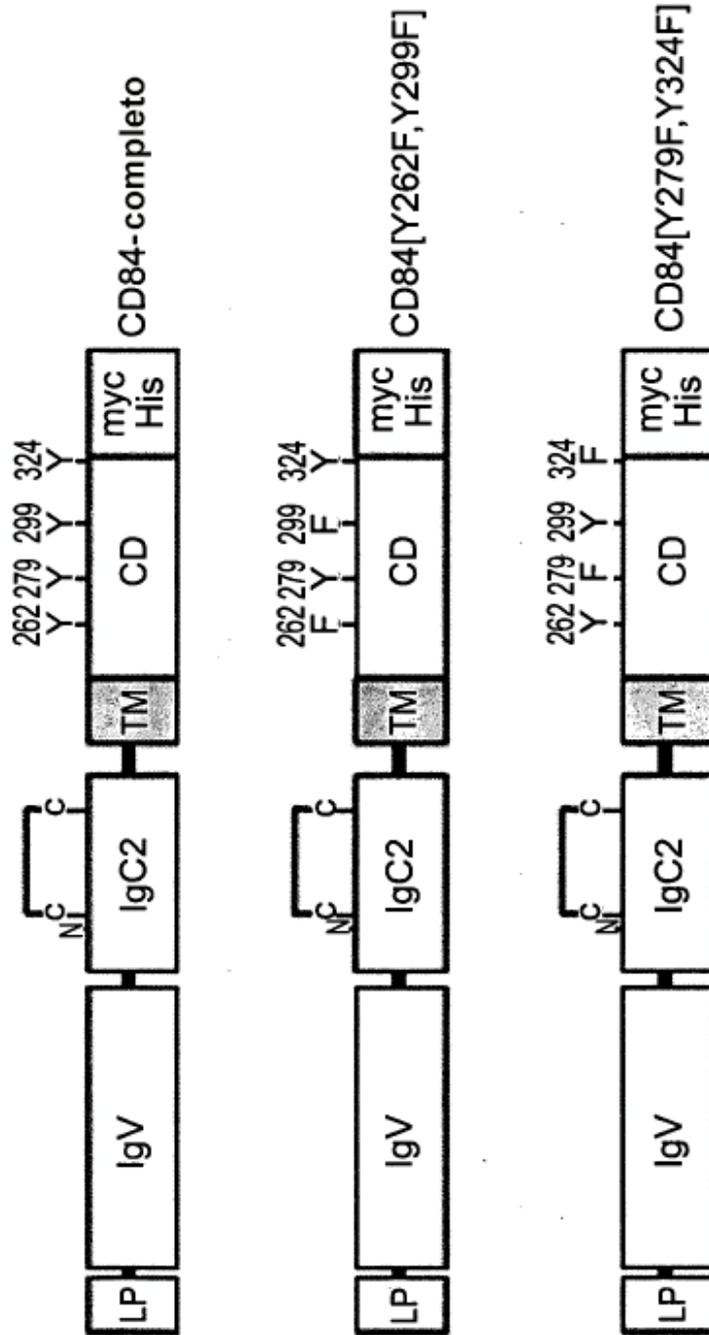


FIG. 7

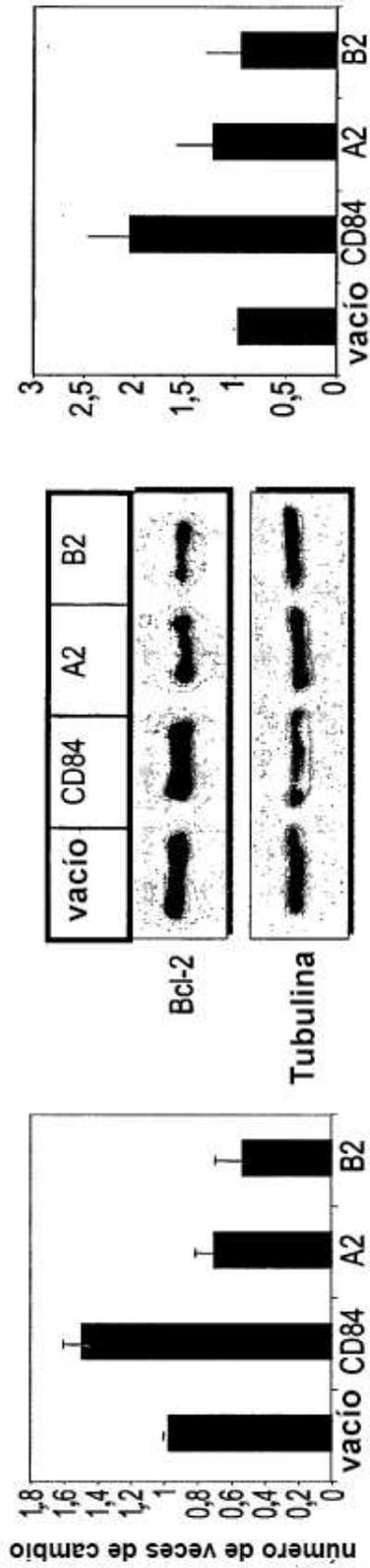


FIG. 8A

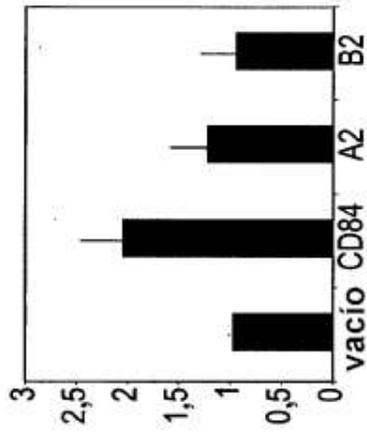


FIG. 8B

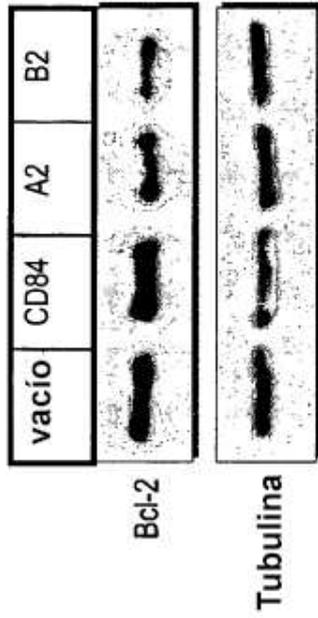


FIG. 8C

CD-84 completo+CD-84-ECD
 CD-84 completo
 Vector vacío

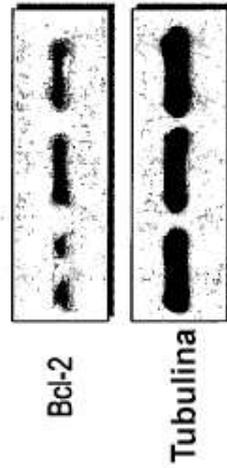


FIG. 8D

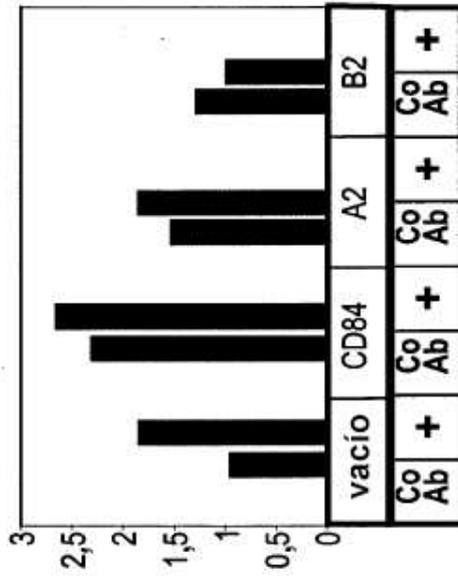


FIG. 8E

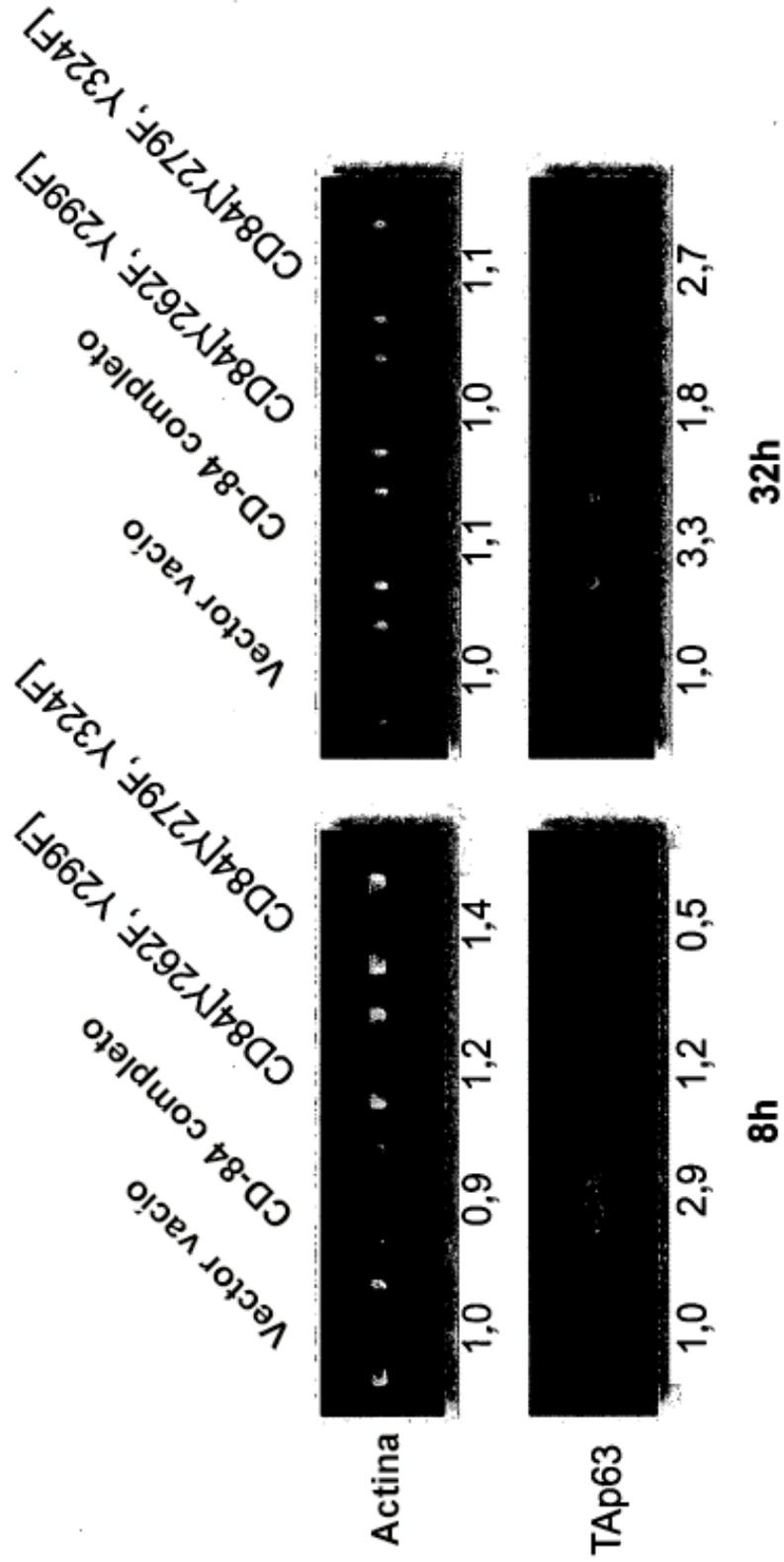


FIG. 9

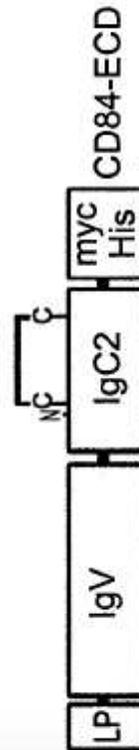
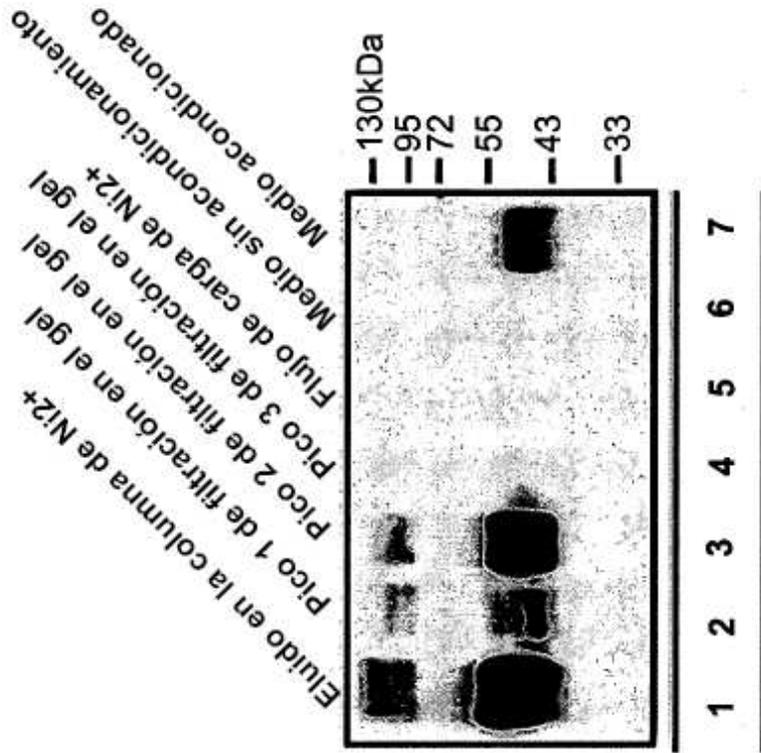


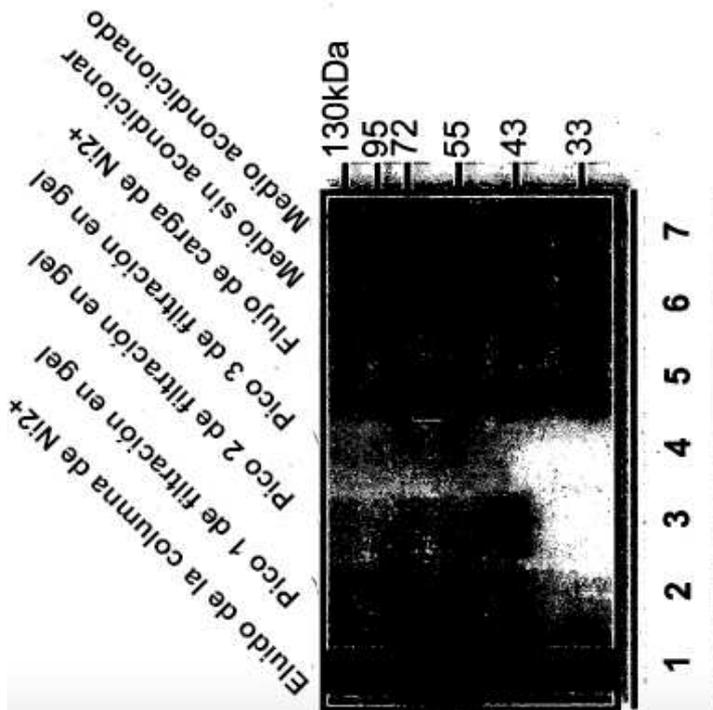
Imagen esquemática de CD84-ECD

FIG. 10A



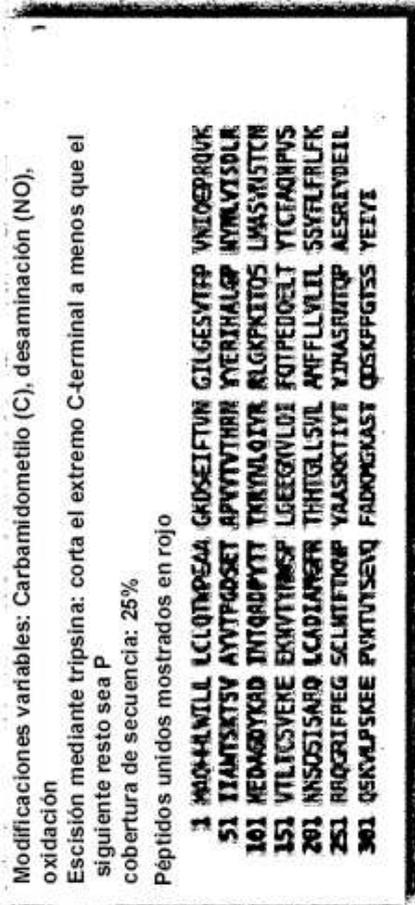
Análisis proteico de CD84-ECD

FIG. 10B



Análisis proteico de CD84-ECD
purificado

FIG. 10C



Identificación de la construcción de
CD84 por ESI-MS/MS

FIG. 10D

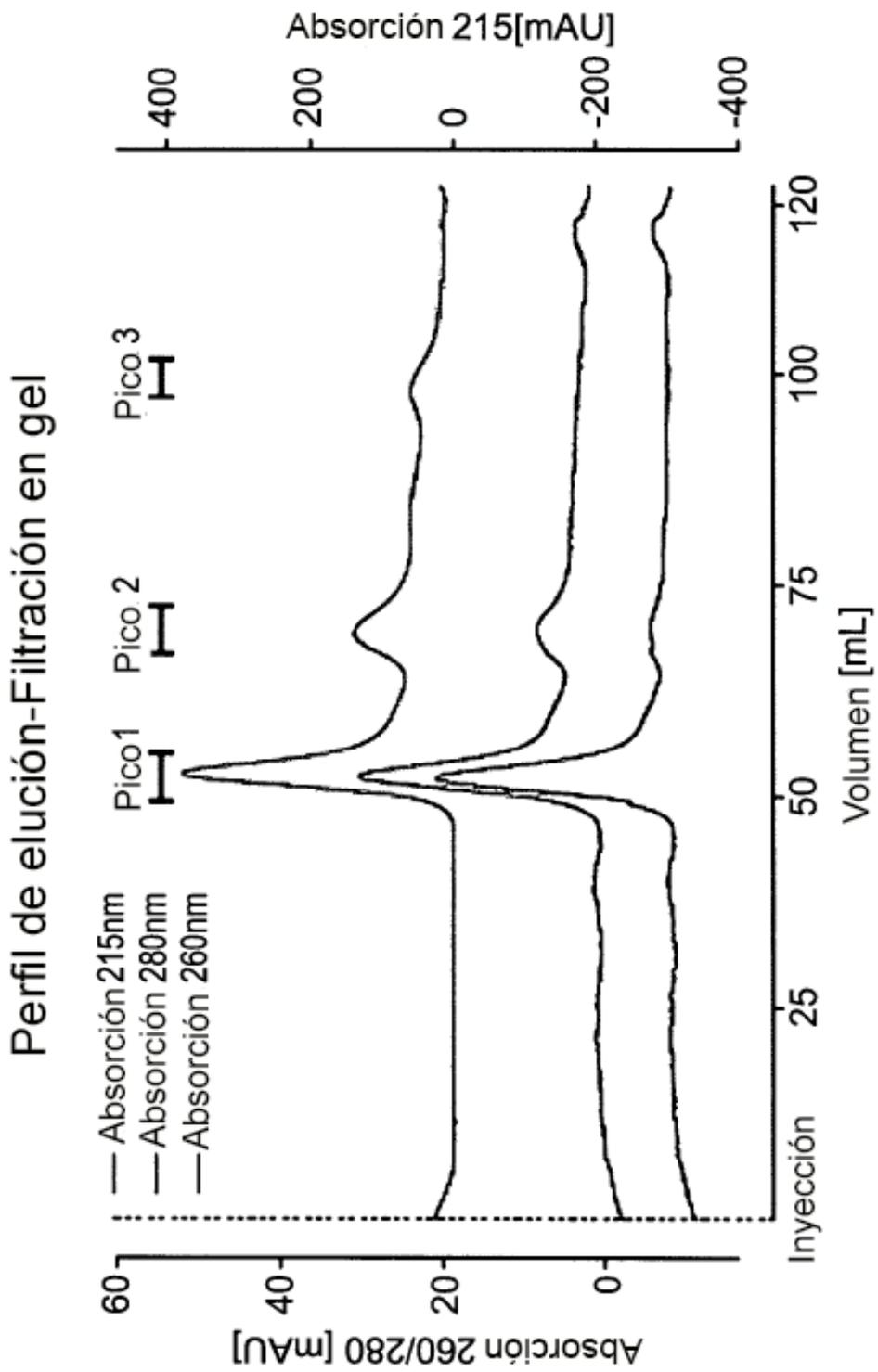


FIG. 11

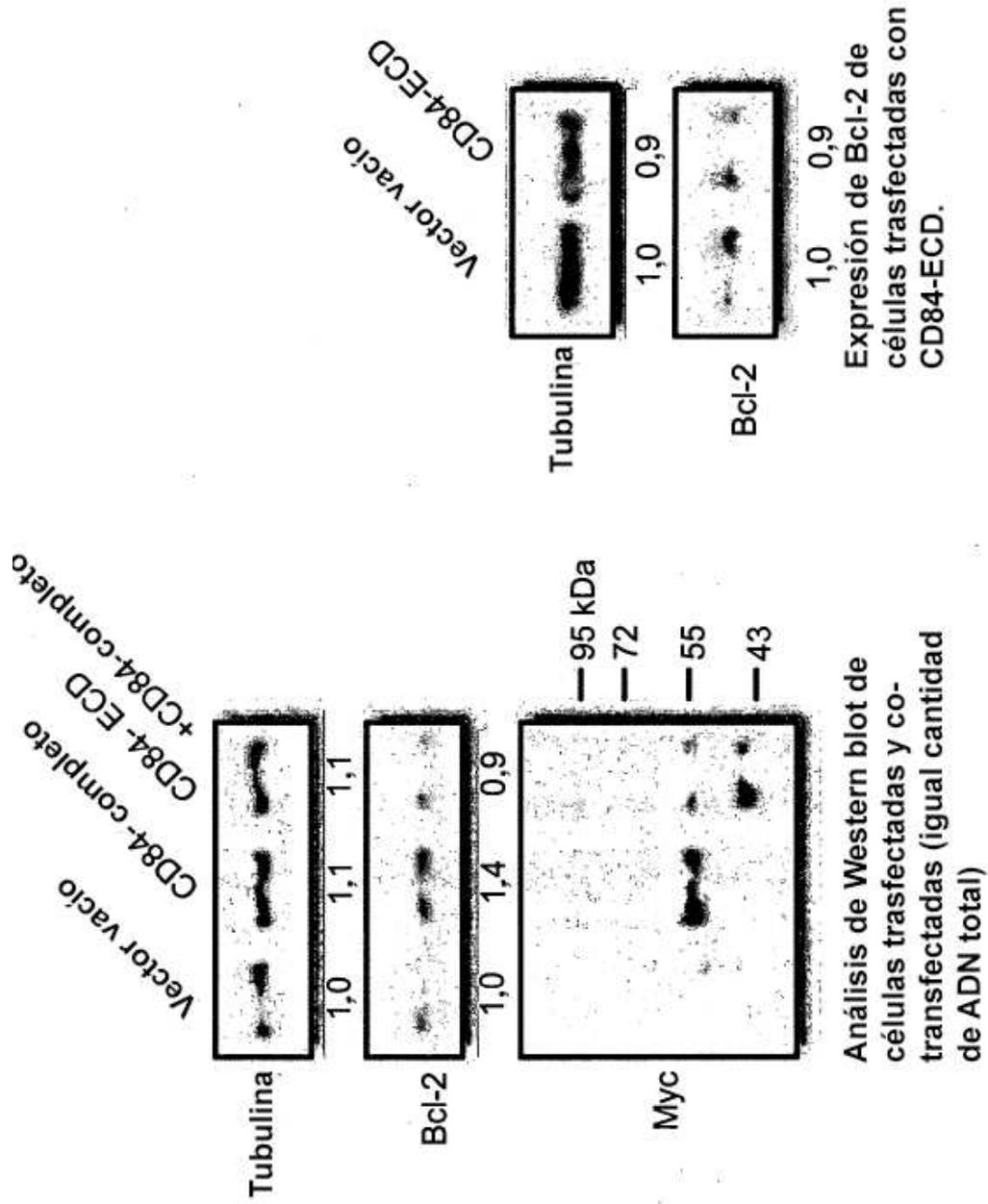


FIG. 12A

FIG. 12B

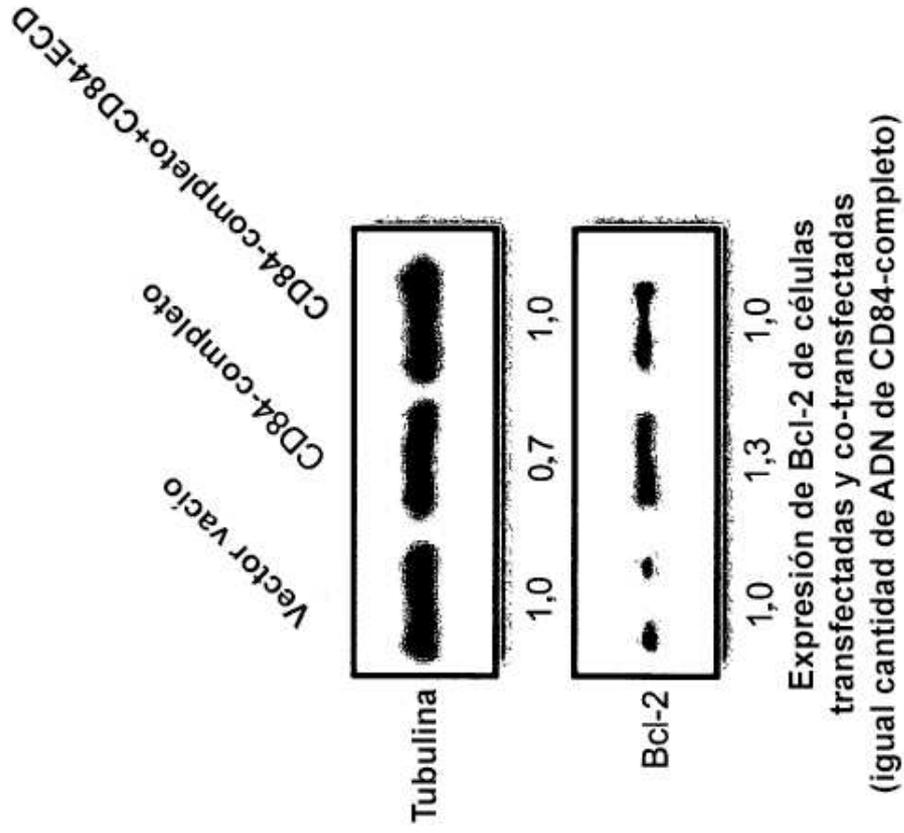


FIG. 12C

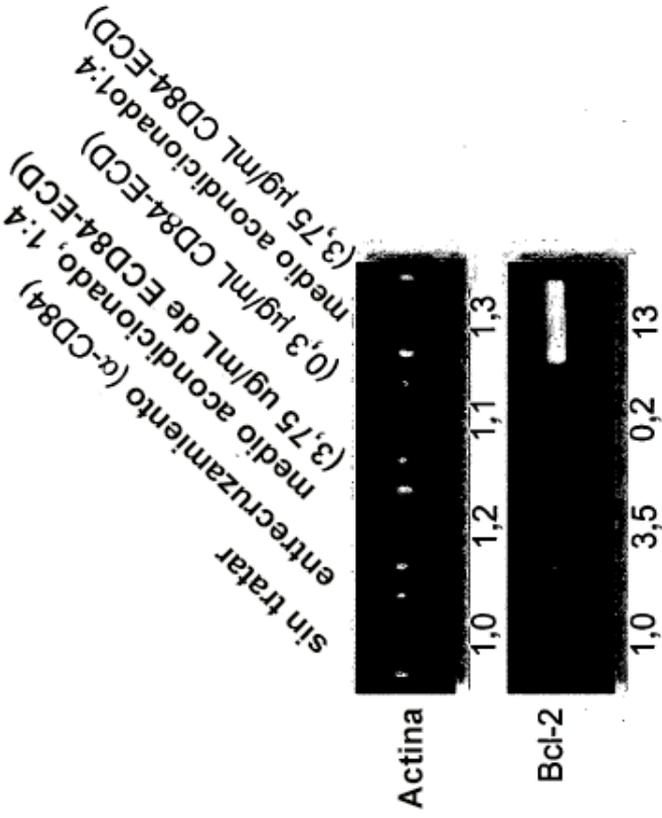
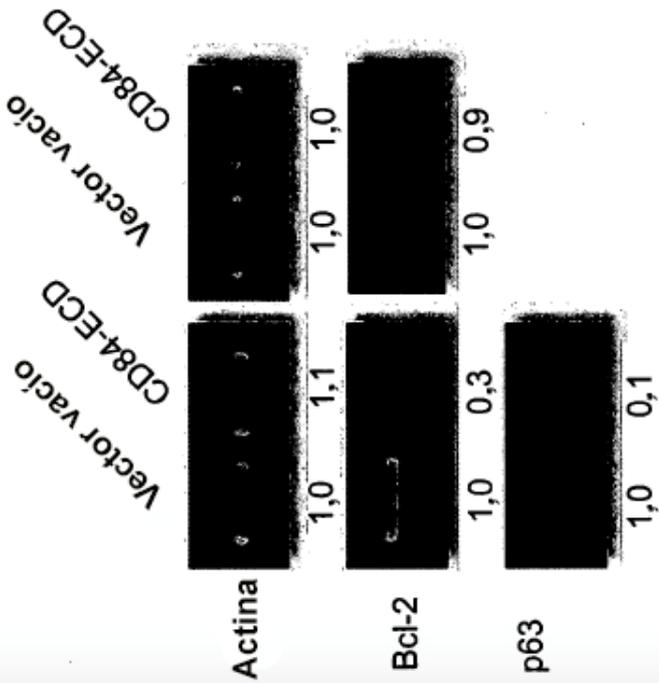


FIG. 14



Línea celular estable Células HER 293T de CD84 trasfectado transfectedas

FIG. 13

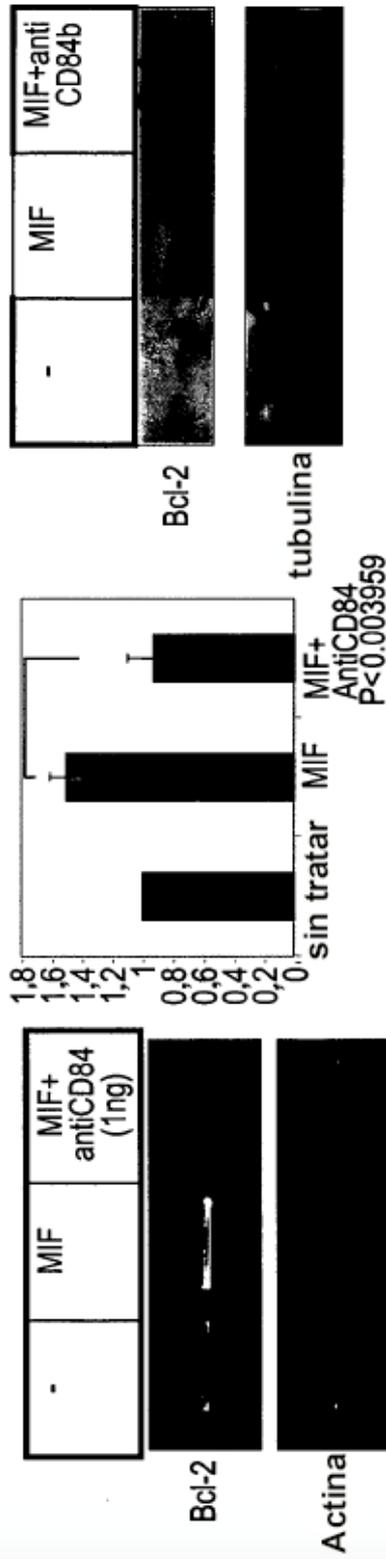


FIG. 15B

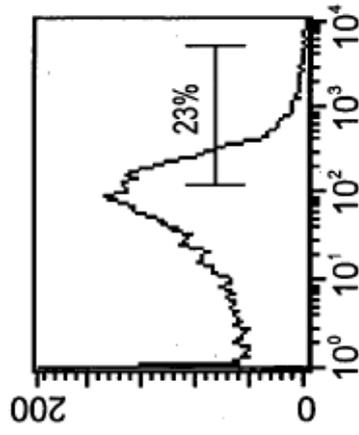
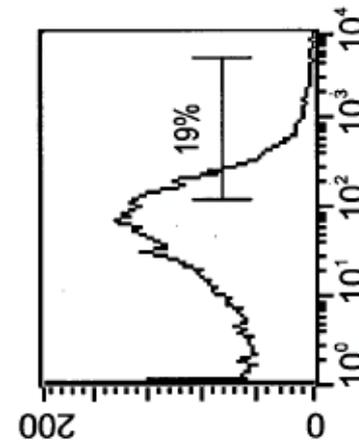
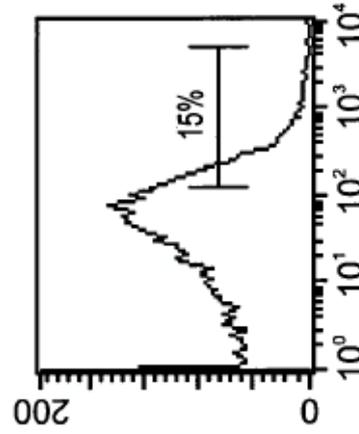


FIG. 15A



FLICA →

FIG. 15C

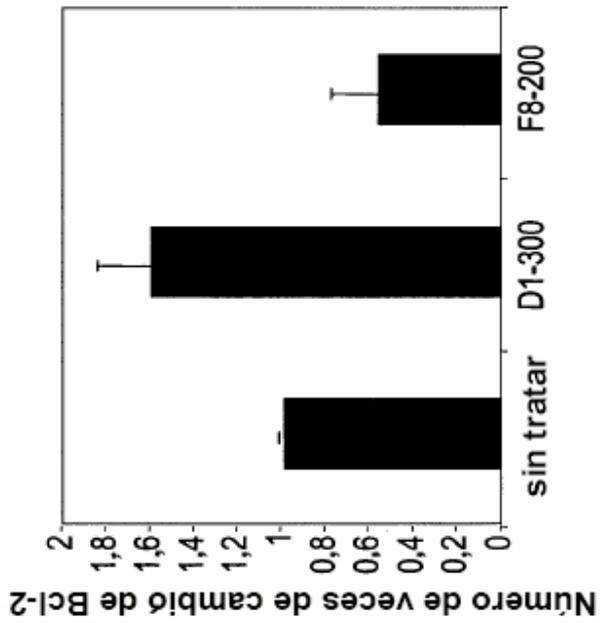
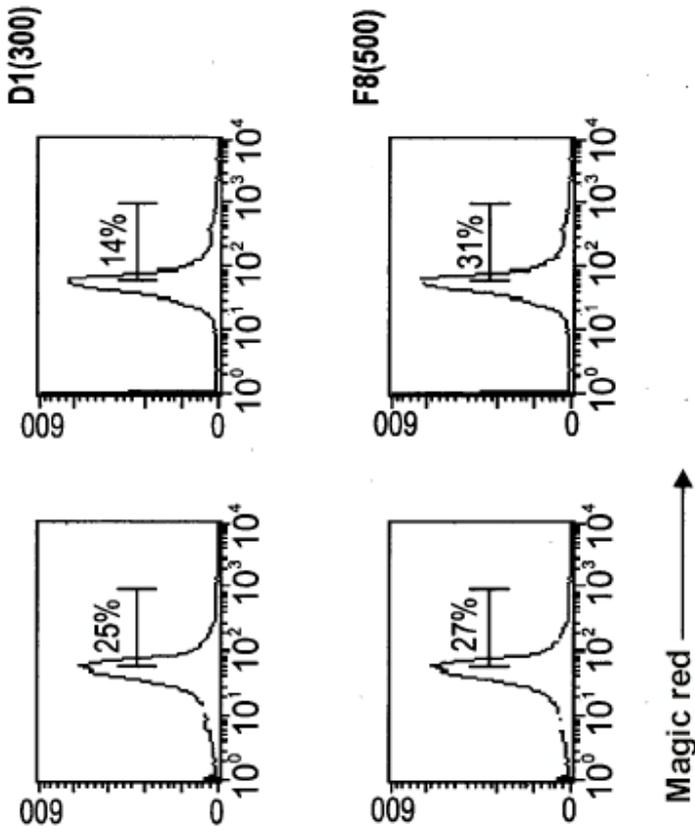


FIG. 16A

FIG. 16B

Magic red →

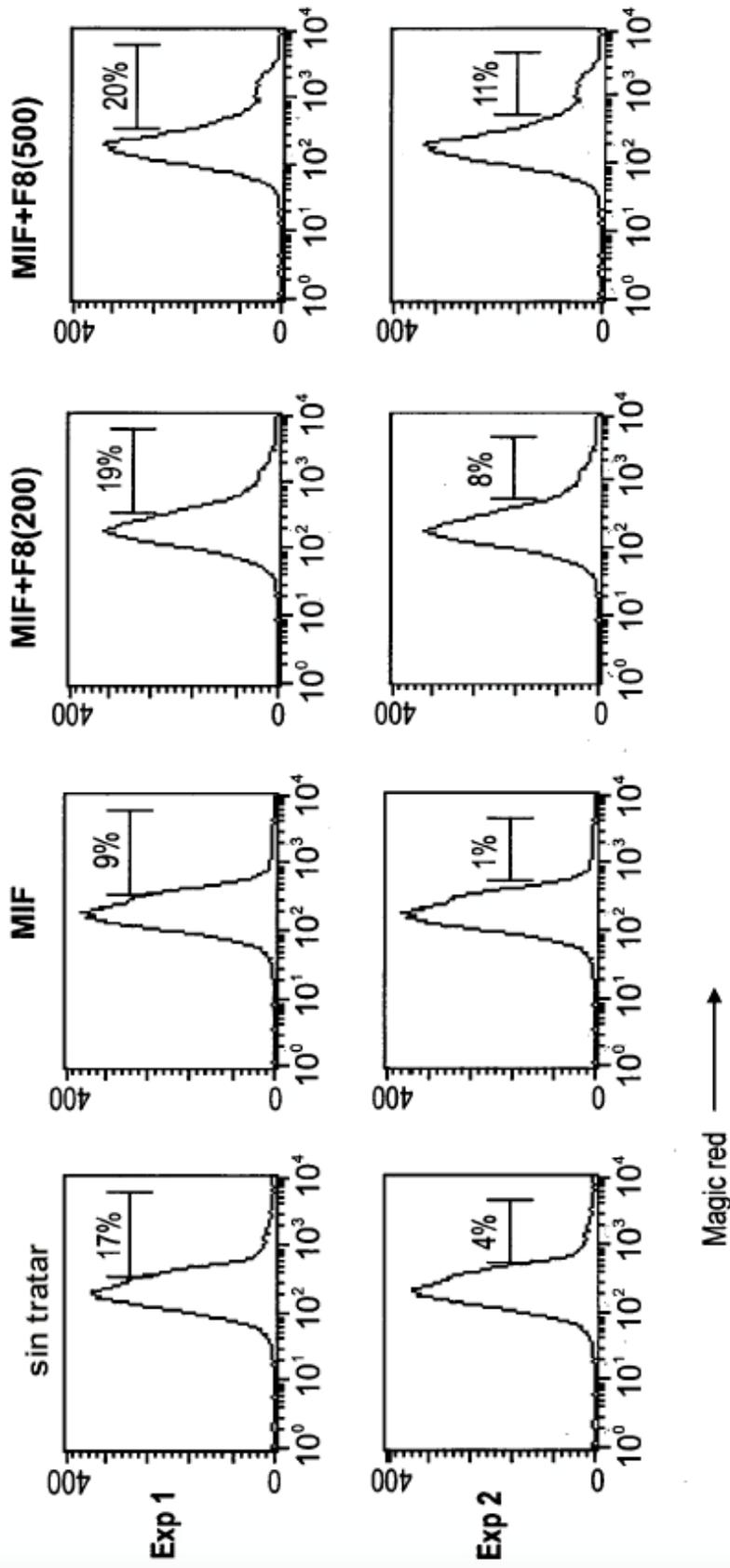


FIG. 17