



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 810**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06759739 .3**
96 Fecha de presentación : **12.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1891107**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para modular las respuestas inmunitarias.**

30 Prioridad: **12.05.2005 US 680374 P**
13.04.2006 US 791626 P
26.04.2006 US 795005 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

73 Titular/es: **ZYMOGENETICS, Inc.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

72 Inventor/es: **Levin, Steven, D.;**
Bilsborough, Janine;
West, James, W.;
Brandt, Cameron;
Ramsdell, Frederick, J.;
Howard, Edward, D.;
Chadwick, Eric, M. y
Gao, Zeren

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 810 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

Composiciones y procedimientos para modular las respuestas inmunitarias

Antecedentes de la invención

5 Las señales coestimuladoras positivas y negativas desempeñan papeles cruciales en la modulación de la actividad de los linfocitos T y se ha demostrado que las moléculas que median en estas señales son dianas eficaces para los agentes inmunomoduladores. La coestimulación positiva, además de la unión al receptor de los linfocitos T (TCR), es necesaria para la activación óptima de los linfocitos T no activados previamente, mientras que se cree que la coestimulación negativa es necesaria para la adquisición de autotolerancia inmunológica, así como la terminación de las funciones de los linfocitos T efectores. Tras la interacción con B7-1 o B7-2 sobre las células presentadoras de antígenos (CPA), el CD28, el prototipo de molécula coestimuladora de linfocitos T, emite señales que estimulan la proliferación y diferenciación de linfocitos T en respuesta a la unión al TCR, mientras que el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) homólogo del CD28 participa en la inhibición de la proliferación de los linfocitos T y las funciones efectoras (Chambers y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 19:565-594,2001; Egen y col., *Nature Immunol.*, 3:611-618, 2002).

15 Se han descubierto varias moléculas nuevas con homología con la familia B7 (Abbas y col., *Nat. Med.*, 5: 1345-6,1999; Coyle y col., *Nat. Immunol.*, 2: 203-9,2001; Carreno y col., *Annu. Rev. Immunol.*, 20: 29-53, 2002; Liang y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 384-90, 2002), y solo se está comenzando a aclarar su papel en la activación de los linfocitos T. Estos nuevos contra receptores coestimuladores incluyen B7h2, PD-L1, PD-L2, B7-H3 y B7-H4

20 B7h2 (Swallow y col., *Immunity*, 11: 423-32, 1999), también conocido como B7RP-1 (Yoshinaga y col., *Nature*, 402: 827-32, 1999), GL50 (Ling, y col., *J. Immunol.*, 164:1653-7, 2000), B7H2 (Wang y col., *Blood*, 96: 2808-13, 2000), y LICOS (Brodie y col., *Curr. Biol.*, 10: 333-6, 2000), se une al coestimulador inducible (ICOS) sobre los linfocitos T activados y coestimula la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas como la interleucina 4 (IL-4) y la IL-10.

25 PD-L1 (Freeman y col., *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34, 2000), también conocido como B7-R1 en seres humanos (Dong y col., *Nat. Med.*, 5, 1365-9, 1999), y PD-L2 (Latchman y col., *Nat. Immunol.*, 2: 261-8, 2001), también conocido como B7-DC (Tseng y col., *J. Exp. Med.*, 193, 839-46, 2001) se unen al receptor 1 de muerte programada (PD-1) sobre los linfocitos T y B, aunque en la actualidad, la función de estas interacciones es controvertida. Algunos informes han demostrado que PD-L1 y PD-L2 tienen efectos inhibidores de las respuestas de los linfocitos T (Freeman y col., *J. Exp. Med.*, 192: 1027-34, 2000; Latchman y col., *Nat. Immunol.*, 2: 261-8, 2001), aunque en otros se ha demostrado que ambos contrarreceptores (B7-R1 y B7-DC) regulan positivamente la proliferación de linfocitos T y específicamente potencia la producción de IL-10 o el interferón gamma (IFN- γ) (Dong y col., *Nat. Med.*, 5, 1365-9, 1999; Tseng y col., *J. Exp. Med.*, 193, 839-46, 2001).

35 Por último, B7-H3 y B7-H4, ambos homólogos de B7 recién identificados, se unen y como contrarreceptores todavía desconocidos sobre los linfocitos T activados y se ha comunicado que potencian la proliferación de los linfocitos T colaboradores (Th) CD4+ y los linfocitos T citotóxicos (CTL o Tc) CD8+ y potencian de forma selectiva la expresión del IFN- γ (Chapoval y col., *Nat. Immunol.*, 2, 269-74, 2001; Sun y col., *J. Immunol.*, 168, 6294-7, 2002).

40 Con la excepción de los contrarreceptores PD-1, que muestran alguna expresión sobre tejidos no linfoides, la expresión de miembros de la familia B7 conocidos está en gran medida restringida a células linfoides. En conjunto, estos estudios han revelado que los miembros de la familia B7 son contrarreceptores sobre las células linfoides que interaccionan con receptores conocidos sobre linfocitos para proporcionar señales coestimuladoras positivas o negativas que desempeñan papeles cruciales en la regulación de respuestas inmunitarias mediadas por células.

45 En particular, se sabe que muchos trastornos autoinmunitarios implican linfocitos T autorreactivos y autoanticuerpos. Son muy deseables los agentes que sean capaces de inhibir o eliminar los linfocitos autorreactivos sin comprometer la capacidad del sistema inmunológico para defenderse contra patógenos. Por el contrario, muchas inmunoterapias para el cáncer, tales como la inmunoterapia adoptiva, expanden las poblaciones de linfocitos T específicas de tumor y las dirigen a atacar y matar células tumorales (Dudley y col., *Science* 298:850-854, 2002; Pardoll, *Nature Biotech.*, 20:1207-1208, 2002; Egen y col., *Nature Immunol.*, 3:611-618, 2002). Son muy deseables agentes capaces de aumentar el ataque a los tumores. Además, las respuestas inmunitarias a muchos antígenos diferentes (p. ej., antígenos microbianos o antígenos tumorales), aunque detectables, con frecuencia tienen una magnitud insuficiente para conferir protección contra un proceso de enfermedad mediado por agentes (p. ej., microorganismos infecciosos o células tumorales) que expresan dichos antígenos. A menudo es deseable administrar al sujeto, junto con el antígeno, un adyuvante que sirva para potenciar la respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. También es deseable inhibir las respuestas inmunitarias normales al antígeno en ciertas circunstancias. Por ejemplo, es deseable la supresión de las respuestas inmunitarias normales en un paciente receptor de un transplante y son muy deseables agentes que exhiban dicha actividad inmunosupresora.

55 Las señales coestimuladoras, particularmente señales coestimuladoras positivas, también desempeñan un papel en la modulación de la actividad de los linfocitos B. Por ejemplo, la activación de linfocitos B y la supervivencia de linfocitos B del centro germinal requieren señales derivadas de los linfocitos B además de estimulación por antígeno.

El contrarreceptor CD40 presente sobre la superficie de los linfocitos T colaboradores interacciona con CD40 sobre la superficie de los linfocitos B y media en muchos de estos efectos dependientes de linfocitos T en los linfocitos B. Es interesante el hecho de que no se han identificado receptores coestimuladores negativos análogos al CTLA-4 sobre los linfocitos B. Esto sugiere que pueden existir diferencias fundamentales en el modo en el que se inducen los linfocitos T y los linfocitos B para responder al antígeno, lo que tiene implicaciones en los mecanismos de autotolerancia, así como la inhibición de las funciones efectoras de los linfocitos B, tal como la producción de anticuerpos. Si se encuentra una molécula funcional similar al CTLA sobre los linfocitos B, el hallazgo cambiaría espectacularmente nuestra comprensión de los mecanismos de la estimulación de linfocitos B.

Además, la identificación de dichos receptores podría proporcionar el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos capaces de modular la activación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos, y útiles en la modulación de las respuestas inmunológicas. El documento WO 03/68943 describe proteínas secretadas humanas (SECP) y los correspondientes polinucleótidos y anticuerpos, y procedimientos y usos relacionados. Los documentos WO 04/24072 y WO 04/24068 describen composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad. Nobis y col., J. Gen. Virol. (1985) Vol. 66, páginas 2563-2569, describen la producción de un anticuerpo monoclonal contra un epítipo sobre las células HeLa que es el sitio de unión para el poliovirus funcional. El documento WO 01/74853 describe procedimientos y productos para regular la motilidad celular.

De acuerdo con esto, existe la necesidad en la técnica de identificar miembros adicionales de la familia B7, sus contrarreceptores y moléculas derivadas de los mismos que tienen cualquiera de una actividad coestimuladora de linfocitos T y/o una actividad coestimuladora de linfocitos B, o ambas. Esta necesidad se basa en gran medida en su importancia biológica fundamental y el potencial terapéutico de los agentes capaces de afectar a su actividad. Dichos agentes capaces de modular señales coestimuladoras tendrían un uso significativo en la modulación de las respuestas inmunitarias y son muy deseables.

La presente memoria descriptiva proporciona dichos polipéptidos para éstos y otros usos que deberían ser evidentes para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento.

Descripción detallada de la invención

1. Visión general

La presente memoria descriptiva describe la identificación y caracterización de zB7R1, un nuevo receptor linfocítico inhibidor y el descubrimiento de su capacidad para unirse a CD155 (PVR). Por tanto, la presente memoria descriptiva describe un receptor de B7 recién identificado que es una molécula similar a PD-1 y se expresa en los linfocitos T. El nuevo receptor descrito en el presente documento se denomina "zB7R1" y es distinto de CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 y zB7R1. También se proporcionan procedimientos y composiciones para modular la señalización de los linfocitos mediados por zB7R1, tal como, por ejemplo, modular la interacción natural de zB7R1 y su contrarreceptor, que tienen múltiples aplicaciones terapéuticas para tolerancia inmunológica, autoinmunidad, inmunosupresión e inmunoterapia, incluida la inmunoterapia para el cáncer.

Como se ha divulgado por primera vez en el presente documento, zB7R1 actúa como regulador negativo de la actividad de los linfocitos T, en el que la señalización mediada por zB7R1 tiene como resultado la inhibición de la actividad de los linfocitos positivos a zB7R1. En los linfocitos T positivos para zB7R1, la señalización de zB7R1 podría, por ejemplo, inhibir las respuestas de los linfocitos T inducidas por TCR, tales como la progresión del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la producción de citocinas y la activación citolítica. Además, en los linfocitos B positivos para zB7R1, la señalización de zB7R1 podría inhibir las respuestas de los linfocitos B inducidas por el receptor antigénico de linfocitos B, tales como la progresión del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la presentación del antígeno y la producción de anticuerpos. Estos hallazgos permiten el uso de agentes terapéuticos capaces de interferir en la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor para modular la actividad de los linfocitos con el fin de tratar, entre otras afecciones, cáncer y enfermedades autoinmunitarias,

CD155 (PVR) se identificó como la contraestructura para zB7R1. Se ha notificado que CD155 es la contraestructura de al menos otros 2 receptores, incluidos CD226 (DNAM-1) y CD96 (Tactile). Se ha demostrado que CD226 y CD96 son receptores activadores que se expresan sobre los linfocitos T y las células NK y el CD155 puede desencadenar la activación a través de estas moléculas. Se ha comunicado que el CD155 se expresa ampliamente en tejidos no hematopoyéticos y puede sobreexpresarse en un gran número de tumores y tipos de células transformadas. El papel del CD155 sobre las respuestas de los linfocitos T a estos tumores es, principalmente, la unión a CD155 de zB7R1, que suprime las respuestas de linfocitos T y células NK al tumor. Por tanto, un reactivo que bloquea la interacción zB7R1-CD155, incluidos los anticuerpos de bloqueo de cualquiera de las dos moléculas o las formas solubles de cualquiera de las dos proteínas, facilitará las respuestas de los linfocitos T y las células NK al tumor eliminando o minimizando la señal inhibidora a través de zB7R1. Dado el efecto inhibidor demostrado de la fijación de zB7R1 sobre los linfocitos T con anticuerpos agonistas, como se muestra en el presente documento los anticuerpos agonistas anti-zB7R1 o los receptores solubles son candidatos adecuados para suprimir las respuestas de los linfocitos T en enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias mediadas por los linfocitos T.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona usos nuevos para los agonistas de zB7R1. Estos moduladores son anticuerpos frente a zB7R1. La presente memoria descriptiva describe fragmentos polipeptídicos solubles de zB7R1 y proteínas de fusión para usar en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias humanas. Los anticuerpos zB7R1 y los receptores de zB7R1 solubles de la presente invención se pueden usar para modular, ser agonistas, bloquear, incrementar, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1 o de su(s) contrarreceptor(es) (es decir, CD155) en el tratamiento de enfermedades humanas específicas, tales como cáncer, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis, endotoxemia, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis y otras afecciones inflamatorias divulgadas en el presente documento.

Una secuencia nucleotídica ilustrativa que codifica zB7R1 humano (también conocido de forma intercambiable como zB7R1x1) se proporciona en la SEC ID N° 1, el polipéptido codificado se muestra en la SEC ID N° 2. zB7R1 es un receptor de B7 que se une a otro miembro más de la familia B7, o contrarreceptor. El análisis del clon de ADNc humano que codifica zB7R1 (SEC ID N° 1) reveló un marco de lectura abierto que codifica 244 aminoácidos (SEC ID N° 2), que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 125 residuos de aminoácidos (residuos 16-140 de SEC ID N° 2; SEC ID N° 3), un dominio transmembranal de aproximadamente 23 residuos de aminoácidos (residuos 141-163 de SEC ID N° 2) y un dominio intracelular de aproximadamente 81 residuos de aminoácidos (residuos 164 a 244 de SEC ID N° 2). zB7R1 también tiene un dominio IgV de aproximadamente 96 residuos de aminoácidos (Residuos 32-127 de SEC ID N° 2).

En zB7R1 hay dos dominios ITIM, YFNV (residuos de aminoácidos 225-228 de SEC ID N° 2) e YRSL (residuos de aminoácidos 231-234). La presencia de un dominio ITIM es una indicación de que zB7R1 puede tener un efecto inhibidor. En zB7R1 también hay dos dominios de unión SH-3-quinasa, PSAP (residuos de aminoácidos 191-194 de SEC ID N° 2) y PSPP (residuos de aminoácidos 194-197).

zB7R1 también tiene un polimorfismo en el polinucleótido 289 de la SEC ID N° 1, indicado como n, en el que n puede ser C o T. zB7R1 también tiene al menos un segundo polimorfismo en el polinucleótido 359 de la SEC ID N° 1, indicado como n, en el que n puede ser A o G, y en el que la conversión de A a G conduce a un cambio en el residuo de aminoácido 117 de la SEC ID N° 2 (indicado como Xaa) de Thr a Ala.

Otra secuencia nucleotídica ilustrativa que codifica un zB7R1 humano variante (también conocido de forma intercambiable como zB7R1x2) se proporciona en la SEC ID N° 5, el polipéptido codificado se muestra en la SEC ID N° 6. zB7R1 es un receptor de B7 que se une a otro miembro más de la familia B7, o contrarreceptor. El análisis del clon de ADNc humano que codifica zB7R1x2 (SEC ID N° 5) reveló un marco de lectura abierto que codifica 311 aminoácidos (SEC ID N° 6), que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 182 residuos de aminoácidos (residuos 27-208 de SEC ID N° 6; SEC ID N° 7), un dominio transmembranal de aproximadamente 22 residuos de aminoácidos (residuos 209-230 de SEC ID N° 6) y un dominio intracelular de aproximadamente 81 residuos de aminoácidos (residuos 231 a 311 de SEC ID N° 6).

Una secuencia nucleotídica ilustrativa que codifica un zB7R1 murino se proporciona en la SEC ID N° 8; el polipéptido codificado se muestra en la SEC ID N° 9. El dominio extracelular se muestra en la SEC ID N° 10.

Una secuencia nucleotídica ilustrativa que codifica CD155 humano (también conocido de forma intercambiable como PVR) se proporciona en la SEC ID N° 17; el polipéptido codificado se muestra en la SEC ID N° 18. Se ha mostrado que CD155 se une a zB7R1 y, por tanto, es un contrarreceptor de este miembro de la familia B7. El análisis del clon de ADNc humano que codifica zB7R1 (SEC ID N° 17) reveló un marco de lectura abierto que codifica 417 aminoácidos (SEC ID N° 18), que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 316 residuos de aminoácidos (residuos 28-343 de SEC ID N° 18; SEC ID N° 19), un dominio transmembranal de aproximadamente 24 residuos de aminoácidos (residuos 344-367 de SEC ID N° 18) y un dominio intracelular de aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (residuos 368-417 de SEC ID N° 18).

Una secuencia nucleotídica ilustrativa que codifica CD155 murino se proporciona en la SEC ID N° 20; el polipéptido codificado se muestra en la SEC ID N° 21. El dominio extracelular se muestra en la SEC ID N° 22. El análisis del clon de ADNc humano que codifica el CD155 murino reveló un marco de lectura abierto que codifica 408 aminoácidos (SEC ID N° 21), que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 319 residuos de aminoácidos (residuos 29-367 de SEC ID N° 21; SEC ID N° 22), un dominio transmembranal de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos (residuos 348-367 de SEC ID N° 21) y un dominio intracelular de aproximadamente 40 residuos de aminoácidos (residuos 368-408 de SEC ID N° 21).

De acuerdo con esto, la memoria descriptiva describe secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de zB7R1 que son útiles en la modulación de la actividad de los linfocitos T y en el tratamiento de trastornos inmunitarios, incluidos enfermedades autoinmunitarias, inflamación, psoriasis, EII, colitis ulcerosa y LES.

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos y epítomos aislados que comprenden al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 o 3. Polipéptidos ilustrativos incluyen polipéptidos que comprenden, o consisten en, la SEC ID N° 3, un epítomo antigénico de la misma, o un fragmento de unión funcional a zB7R1 de la misma. Además, la presente memoria descriptiva describe polipéptidos aislados, tal como se ha divulgado anteriormente, que son agonistas, se unen, bloquean, inhiben, reducen, incrementan,

antagonizan o neutralizan la actividad de zB7R1.

La presente invención proporciona además anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (como se define en las reivindicaciones) que se unen específicamente a dichos polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos son anticuerpos agonistas, tales como anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos humanizados
5 derivados de anticuerpos monoclonales murinos y anticuerpos monoclonales humanos. Fragmentos de anticuerpos ilustrativos incluyen F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv, y unidades de reconocimiento mínimas. Los anticuerpos neutralizantes se unen, preferentemente, a zB7R1, de modo que su interacción con su contrarreceptor o contrarreceptores se bloquea, inhibe, reduce, antagoniza o neutraliza; los anticuerpos neutralizantes anti-zB7R, de modo que su interacción con su contrarreceptor o contrarreceptores se bloquea, inhibe, reduce, antagoniza o
10 neutraliza, también entran dentro de la presente invención. La presente memoria descriptiva describe composiciones que comprenden un vehículo y un péptido, polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento.

Se proporcionan antagonistas de la señalización de zB7R1 para incrementar la activación de los linfocitos T y, posiblemente, la activación de los linfocitos B. Dichos antagonistas comprende agentes de bloqueo capaces de interferir en la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor o contrarreceptores, de modo que se inhibe la
15 señalización negativa mediada por zB7R1 y tiene como resultado un incremento de la activación y proliferación de linfocitos y de la función efectora.

En una realización, se proporcionan agonistas de la señalización de zB7R1 para inhibir la activación de los linfocitos T y, posiblemente, la activación de los linfocitos B. En una realización preferida, dichos agentes bioactivos comprenden agentes de imitación capaces de unirse a zB7R1 e imitar y/o aumentar la interacción natural de zB7R1
20 con su contrarreceptor o contrarreceptores, de modo que tiene como resultado la inhibición de la activación y la proliferación de los linfocitos T (y posiblemente de los linfocitos B) y de la función efectora.

Se proporcionan agentes bioactivos y procedimientos para incrementar y/o regular por incremento la actividad de los linfocitos B y T. Dichos agentes bioactivos comprenden antagonistas de la señalización mediada por zB7R1. Dichos agentes bioactivos pueden comprender agentes de bloqueo tal como se describen en el presente documento y
25 pueden ser capaces de interferir en la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor. Se proporcionan composiciones adyuvantes usando agentes de bloqueo de zB7R1 y/o de su contrarreceptor y otros antagonistas de la señalización mediada por zB7R1.

En una realización alternativa, se proporcionan agentes bioactivos y procedimientos para inhibir y/o regular por disminución la actividad de los linfocitos B y T. En una realización preferida, dichos agentes bioactivos comprenden
30 agonistas de la señalización mediada por zB7R1. En una realización particularmente preferida, dichos agentes bioactivos comprenden agentes imitadores tal como se ha descrito en el presente documento, y en una realización específica, dichos agentes imitadores son capaces de sustituir y/o aumentar la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor. En otra realización, se proporcionan composiciones inmunosupresoras usando agentes imitadores de zB7R1 y/o de su contrarreceptor y otros agonistas de la señalización mediada por zB7R1.

35 Se proporcionan procedimientos y composiciones para modular la producción de inmunoglobulina por los linfocitos B.

Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento tendrán un uso ventajoso en la inmunoterapia, incluidos, por ejemplo, autoinmunidad, supresión inmunitaria, inmunoterapia del cáncer y adyuvantes
inmunitarios.

40 Además, la presente memoria descriptiva proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos uno de vectores de expresión o virus recombinantes que comprendan dichos vectores de expresión. La presente memoria descriptiva incluye además composiciones que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de anticuerpos antiidiotipo que se unen específicamente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o 6, o un fragmento del mismo. Un ejemplo de anticuerpo antiidiotipo se une a un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste a la SEC ID
45 N° 3 o 7.

La presente memoria descriptiva describe proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de zB7R1 y un resto inmunoglobulina. En dichas proteínas de fusión, el resto inmunoglobulina puede ser una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, tal como un fragmento Fc humano. La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican dichas proteínas de fusión.
50

La presente memoria descriptiva describe una proteína multimérica de zB7R1, así como un procedimiento de preparar dicha proteína multimérica, preferentemente una proteína tetramérica, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfeccionada con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de fosfoproteína estimulada vasodilatadora (VASP) y una proteína heteróloga, tal como zB7R1 o CD155. Específicamente, la porción de zB7R1 o CD155 incluida en la proteína de fusión es el dominio
55

extracelular de dicha proteína (es decir, SEC ID N° 3 o 7 para zB7R1 o SEC ID N° 22 para CD155) y la proteína de fusión resultante es soluble. En otra realización, la proteína de fusión comprende una secuencia enlazadora. El dominio VASP se puede usar para identificar secuencias que tiene patrones de estructura proteica similares y dichos dominios similares se usan para fabricar una proteína de fusión que multimeriza una proteína heteróloga o dominio proteico.

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento de preparar una proteína zB7R1 o CD155 soluble, homo o heterotetramérica cultivando una célula huésped transformada o transfeccionada con al menos uno, pero hasta cuatro, vectores de expresión diferentes que codifican una proteína de fusión que comprende un dominio VASP y una proteína heteróloga tal como zB7R1 o CD155 o un dominio proteico de la misma. Los cuatro dominios VASP forman, preferentemente, un homo o heterotetrámero. Este cultivo se puede producir en la misma o en diferentes células huésped. Los dominios VASP pueden ser iguales o diferentes y la proteína de fusión puede además comprender una secuencia enlazadora. La presente memoria descriptiva describe secuencias de ADN, vectores de expresión u células huésped transformadas usadas en el presente procedimiento y proteínas de fusión producidas mediante el presente procedimiento.

La presente invención también proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales tal como se define en las reivindicaciones, que se unen a los polipéptidos, que comprenden un dominio extracelular de zB7R1, tal como receptores monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos, incluidos receptores solubles.

En otro aspecto, se proporciona procedimientos para modular la actividad de los linfocitos, que comprenden poner en contacto un linfocito B y/o T con un agente bioactivo capaz de modular la actividad de zB7R1. En una realización, el agente bioactivo comprende un antagonista de la actividad de zB7R1, tal como, por ejemplo, un agente de bloqueo de zB7R1 o del contrarreceptor de zB7R1 (es decir, CD155) que tiene como resultado una regulación por incremento o el aumento de la actividad de los linfocitos mediante la prevención de la señalización negativa mediada por zB7R1. En una realización alternativa, el agente bioactivo comprende un agonista de la actividad de zB7R1, tal como, por ejemplo, un agente imitador de zB7R1 o del contrarreceptor de zB7R1, que tiene como resultado una regulación por disminución de la actividad de los linfocitos mediante sustitución o aumento de la señalización negativa mediada por zB7R1.

En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para modular la actividad de los linfocitos, que comprenden poner en contacto un linfocito B y/o T con un agente bioactivo capaz de modular la interacción de zB7R1 con un contrarreceptor de zB7R1. En una realización, un agente bioactivo capaz de interferir con la interacción natural de zB7R1 o del contrarreceptor de zB7R1 (es decir, CD155) se emplea para incrementar la actividad y la proliferación de los linfocitos, tal como, por ejemplo, un antagonista de zB7R1, tal como un agente de bloqueo de zB7R1 o del contrarreceptor de zB7R1. En una realización alternativa, un agente bioactivo capaz de aumentar o sustituir la interacción natural de zB7R1 o del contrarreceptor de zB7R1 (es decir, CD155) se emplea para inhibir la actividad y la proliferación de los linfocitos.

Agentes de bloqueo de zB7R1 adecuados se pueden seleccionar del grupo que comprende o consiste en polipéptidos y proteínas de fusión de zB7R1 solubles, anticuerpos anti-zB7R1 capaces de unirse a al menos una porción del dominio extracelular de zB7R1 y que interfiere en la señalización mediada por anti-zB7R1, inhibidores de molécula pequeña de la interacción del receptor de anti-zB7R1 con sus ligandos y similares. Antagonistas de zB7R1 alternativos incluyen además oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la secuencia de ácido nucleico de zB7R1, secuencias de ARN inhibidoras, inhibidores de molécula pequeña de la expresión de zB7R1 y/o señalización intracelular, y similares.

De forma similar, los agentes de bloqueo o antagonistas del contrarreceptor de zB7R1 adecuados se pueden seleccionar del grupo que comprende, o consiste en anticuerpos contrarreceptores anti-zB7R1 capaces de unirse a al menos una porción del dominio extracelular de un contrarreceptor de zB7R1 (es decir, CD155; SEC ID N° 22) y que interfiere en la interacción de un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, inhibidores de molécula pequeña de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, polipéptidos contrarreceptores de zB7R1 y proteínas de fusión que tienen secuencias de aminoácidos del contrarreceptor de zB7R1 modificadas de modo que interfieran en la interacción de un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1 y sean incapaces de activar la señalización mediada por zB7R1 y similares. Como alternativa a los antagonistas de zB7R1 se incluyen oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la secuencia de ácido nucleico del contrarreceptor de zB7R1 (es decir, CD155; SEC ID N° 20), moléculas de ARN inhibidoras, inhibidores de molécula pequeña de la expresión del contrarreceptor de zB7R1 y similares.

Agentes imitadores de zB7R1 o agonistas adecuados se pueden seleccionar del grupo que comprende o consiste en anticuerpos anti-zB7R1 activadores de función ("anticuerpos agonistas") capaces de unirse a al menos una porción del dominio extracelular de zB7R1 (SEC ID N° 3 o 7) y que estimulan la señalización mediada por zB7R1, vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas de zB7R1 funcionales intracelularmente, potenciadores de molécula pequeña de la expresión de zB7R1 y/o señalización mediada por zB7R1, y similares. De forma similar, los agentes imitadores de un contrarreceptor de zB7R1 adecuados se pueden seleccionar del grupo que comprende o consiste en polipéptidos de contrarreceptores de zB7R1 solubles, tales como CD155, y proteínas de fusión capaces de activar la señalización mediada por zB7R1, potenciadores de molécula pequeña de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, así como potenciadores de la expresión de un

contrarreceptor de zB7R1, vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas contrarreceptoras de un contrarreceptor de zB7R1 funcional intracelularmente, y similares.

Por tanto, en una realización más específica se proporcionan procedimientos para estimular, aumentar y/o incrementar la actividad de los linfocitos, que comprenden poner en contacto un linfocito B o T con un antagonista de la señalización mediada por zB7R1, comprendiendo dicho antagonista al menos un agente bioactivo seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos de zB7R1 soluble, proteínas de fusión de zB7R1 soluble, anticuerpos anti-zB7R1 capaces de unirse a al menos una porción del dominio extracelular de zB7R1 e interferir con la señalización mediada por zB7R1, inhibidores de molécula pequeña de la expresión de zB7R1 y/o señalización mediada por zB7R1, anticuerpos contrarreceptores anti-zB7R1 capaces de unirse a al menos una porción del dominio extracelular del contrarreceptor de zB7R1 e interferir con la interacción del contrarreceptor de zB7R1, inhibidores de molécula pequeña de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, polipéptidos del contrarreceptor de zB7R1 soluble y proteínas de fusión del contrarreceptor de zB7R1 soluble incapaces de activar la señalización mediada por zB7R1 y de interferir en las secuencias de ARN.

En una realización particularmente preferida se proporcionan procedimientos para incrementar la respuesta inmunitaria del huésped a la estimulación antigénica, que comprende la administración al huésped de al menos uno de los antagonistas mencionados anteriormente de la señalización mediada por zB7R1. De manera deseable, la estimulación antigénica puede proceder de antígenos de patógenos, antígenos de vacunas y/o antígenos tumorales.

En una realización específica, se proporcionan procedimientos para estimular una respuesta inmunitaria celular contra antígenos tumorales, aparte de un contrarreceptor de zB7R1, que comprende administrar a un paciente de cáncer al menos uno de los antagonistas o agentes de bloqueo objeto para inhibir la señalización negativa mediada por zB7R1 y, de este modo, incrementar la respuesta de los linfocitos T dirigida contra los antígenos tumorales aparte de un contrarreceptor de zB7R1 presente en el tejido canceroso.

En otra realización específica, se proporcionan procedimientos para inhibir, atenuar y/o disminuir la actividad de los linfocitos, que comprenden poner en contacto los linfocitos B o T con un agonista de la señalización mediada por zB7R1, estando dicho agonista seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos contrarreceptores de zB7R1 solubles y proteínas de fusión del contrarreceptor de zB7R1 capaces de activar la señalización mediada por zB7R1, anticuerpos anti-zB7R1 activadores de función capaces de unirse a al menos una porción del dominio extracelular de zB7R1 y estimular la señalización mediada por zB7R1, vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas de zB7R1 funcionales intracelularmente, potenciadores de molécula pequeña de la expresión de zB7R1 y/o señalización mediada por zB7R1, potenciadores de molécula pequeña de la interacción entre el contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, potenciadores de molécula pequeña de la expresión de un contrarreceptor de zB7R1 y vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas contrarreceptoras de zB7R1 funcionales intracelularmente.

En una realización particularmente preferida se proporcionan procedimientos para incrementar la respuesta inmunitaria del huésped a la estimulación antigénica, que comprende la administración al huésped de al menos uno de los agonistas mencionados anteriormente de la señalización mediada por zB7R1. De manera deseable, la estimulación antigénica puede proceder de autoantígenos en el contexto de enfermedad autoinmunitaria o de antígenos de donantes presentes en órganos y tejidos transplantados.

En un aspecto alternativo, la presente invención proporciona la modulación de la interacción de una célula que expresa el contrarreceptor de zB7R1 y un linfocito que expresa zB7R1. En una realización preferida, se proporcionan agentes bioactivos y procedimientos para interferir con la interacción de células tumorales positivas para el contrarreceptor de zB7R1 con linfocitos T, que tienen como resultado la inhibición de la señalización negativa mediada por zB7R1. En una realización especialmente preferida, el linfocito T es un linfocito CD4+ o un linfocito CD8+. En otra realización, el un linfocito T CD4+ es una célula Th1.

En otra realización preferida, se proporcionan agentes bioactivos y procedimientos para simular o potenciar la interacción de células no linfoides no tumorales positivas para el contrarreceptor de zB7R1/CD155 con linfocitos T, positivos para zB7R1, de modo que disminuyen la actividad de los linfocitos T. En una realización especialmente preferida, el linfocito T es un linfocito T CD4+ o un linfocito T CD8+. En otra realización, el un linfocito T CD4+ es una célula Th1.

En otro aspecto se proporcionan procedimientos para tratar cánceres, que se caracterizan por la presencia de células tumorales que expresan el contrarreceptor de zB7R1. En una realización, estos procedimientos comprenden administrar a un sujeto mamífero al menos uno de los antagonistas de la señalización mediada por zB7R1 divulgados en el presente documento, bien solo o junto con protocolos alternativos de inmunoterapia, quimioterapia y/o radioterapia contra el cáncer. En una realización preferida, se administra al menos un antagonista de zB7R1 o un antagonista de CD155 a un sujeto que tiene células tumorales positivas para contrarreceptores de zB7R1, en la que dicho agente de bloqueo es capaz de interferir en la interacción de zB7R1 y un contrarreceptor de zB7R1 e inhibir la señalización mediada por zB7R1. Preferentemente, la administración de dichos agentes de bloqueo es eficaz para incrementar la actividad de los linfocitos T dirigida contra antígenos tumorales distintos a un contrarreceptor de zB7R1 sobre las células tumorales y, en particular, para incrementar la actividad de los linfocitos T citotóxicos.

Todavía más preferentemente, la administración de los antagonistas objeto es eficaz para inhibir el crecimiento de las células tumorales que expresan contrarreceptores de zB7R1.

5 También se contempla que el bloqueo de zB7R1 y/o del contrarreceptor de zB7R1/CD155 proporcionado en el presente documento puede encontrar una combinación sinérgica con el bloqueo de CTLA-4, tal como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.855.887; 5.811.097; y 6.051.227, y la publicación internacional WO 00/32231, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.

10 En otro aspecto se proporcionan procedimientos para tratar enfermedades autoinmunitarias, que se caracterizan por la ausencia o la expresión aberrante de un contrarreceptor de zB7R1 en células huésped no tumorales no linfoides sometidas al ataque autoinmunitario. En una realización, estos procedimientos comprenden administrar a un sujeto mamífero al menos uno de los agonistas de la señalización mediada por zB7R1 divulgados en el presente documento, bien solo o junto con protocolos alternativos de inmunoterapia y/o inmunosupresores. En una realización preferida, se administra al menos un agonista de zB7R1 o de CD155 a un sujeto que tiene linfocitos autorreactivos positivos a zB7R1, en la que dicho agonista es capaz de sustituir y/o aumentar la interacción de zB7R1 y de CD155 y sustituir o aumentar la señalización mediada por zB7R1. Preferentemente, la administración de dichos agonistas es eficaz en la disminución de la actividad linfocitaria autorreactiva dirigida contra células huésped no tumorales no linfoides y, particularmente, de la actividad autorreactiva de CTL CD8+ y Th1 CD4+ y la actividad de los linfocitos B.

15 En otro aspecto más se proporcionan procedimientos para mejorar el resultado de trasplantes de órganos y tejidos y prolongar la supervivencia del injerto. En una realización, estos procedimientos comprenden administrar a un receptor de trasplante al menos un agente de los agonistas o antagonistas de la señalización mediada por zB7R1 divulgados en el presente documento, bien solo o junto con protocolos alternativos de inmunoterapia y/o inmunosupresores. En una realización preferida, al menos un agente imitador de zB7R1 (por ejemplo, un receptor soluble que bloquea la unión de zB7R1 de la superficie celular a su contrarreceptor, o un anticuerpo agonista que se une a zB7R1 e induce señalización) se administra al receptor del trasplante, en el que dicho agente imitador es capaz de sustituir y/o aumentar la interacción de agente imitador y un contrarreceptor de zB7R1 y sustituir o aumentar la señalización mediada por zB7R1. Preferentemente, la administración de dichos agentes imitadores es eficaz para disminuir la respuesta inmunitaria del receptor contra los antígenos donantes presentes en el injerto, particularmente la respuesta CTL citolítica y la respuesta de los linfocitos B. Todavía más preferentemente, la administración de los agentes imitadores objeto es eficaz para sesgar la respuesta de los linfocitos T colaboradores de una respuesta desfavorable de tipo Th-1 a una respuesta más favorable de tipo Th-2, como se describe con mayor detalle en el presente documento.

Tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria

20 La presente invención también proporciona la inhibición de respuestas autoinmunitarias. En una realización preferida se proporciona inhibición de linfocitos T y B autorreactivos que reconocen específicamente autoantígenos. De manera deseable, estas composiciones y procedimientos se pueden usar para inhibir la muerte de células no tumorales mediadas por uno o más autoantígenos.

25 Composiciones preferidas para usar en el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria comprenden agentes que median en la señalización de zB7R1, tal como se define en las reivindicaciones. Fragmentos proteicos de zB7R1 que comprenden el dominio extracelular de zB7R1 (SEC ID Nº 3 o 7) o una porción de los mismos; proteínas de fusión Ig-zB7R1 que comprenden el dominio extracelular de zB7R1 (SEC ID Nº 3) o una porción de las mismas; anticuerpos anti-zB7R1 o frente a CD155 de activación de función; péptidos que imitan el zB7R1 o su contrarreceptor, CD155 (miméticos); y composiciones químicas de molécula pequeña imitan la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor. Las composiciones son capaces de unirse a zB7R1, bien mediante sobrecruzamiento o como mezclas policlonales.

30 En el presente documento también se describen estrategias genéticas para la enfermedad autoinmunitaria. En particular, se puede usar terapia génica para incrementar el nivel de expresión de zB7R1 sobre los linfocitos T y/o incrementar el nivel de expresión de su contrarreceptor en células no linfoides que son objeto del ataque por linfocitos autorreactivos. El uso de isoformas o variantes de zB7R1 que exhiben una actividad específica elevada también se contempla, siendo el objeto de cada procedimiento potenciar la señalización que es supresora de la activación de los linfocitos T.

35 La presente memoria descriptiva describe composiciones y procedimientos para tratar el cáncer y, en particular, para incrementar la actividad de los linfocitos positivos para zB7R1 contra células tumorales positivas para B7. De manera deseable, estas composiciones y procedimientos se pueden usar para inhibir el crecimiento de células tumorales capaces de expresar un miembro de la familia B7.

40 Las composiciones para usar en el tratamiento del cáncer son los antagonistas de la señalización mediada por zB7R1 descritos en el presente documento, por ejemplo agentes de bloqueo de zB7R1. Agentes especialmente preferidos incluyen anticuerpos anti-zB7R1; fragmentos de proteínas que comprenden el dominio extracelular de zB7R1, o una porción de las mismas; proteínas de fusión de zB7R1-Ig que comprenden el dominio extracelular de BTLA, o una porción de las mismas; anticuerpos anti-zB7R1 de bloqueo de función; péptidos que simulan el zB7R1

(miméticos); y composiciones químicas de molécula pequeña que interfieren en la interacción natural de zB7R1 y su contrarreceptor.

También se contemplan estrategias genéticas para el tratamiento del cáncer. En particular, se puede usar terapia génica para disminuir el nivel de expresión de zB7R1 sobre los linfocitos T y/o disminuir el nivel de expresión de zB7R1 o de su contrarreceptor (es decir, CD155) sobre las células tumorales. El uso de isoformas de zB7R1 que exhiben una actividad negativa dominante también se contempla, siendo el objeto de cada procedimiento inhibir la señalización que normalmente es supresora de la activación de los linfocitos T. Estrategias genéticas pueden implicar el uso de promotores específicos de tejido y de célula para dirigirse a la expresión de variantes negativas dominantes de zB7R1, ácidos nucleicos antisentido o ARN pequeños inhibidores de linfocitos T y de células tumorales, respectivamente. Los procedimientos pueden implicar adicionalmente el uso de virus dirigidos a tumores u otros vehículos de liberación que reconocen específicamente células tumorales. Los procedimientos pueden implicar adicionalmente el uso de virus dirigidos a linfocitos T u otros vehículos de liberación que reconocen específicamente linfocitos T.

Particularmente preferidos son agentes que pueden dirigirse de forma selectiva a células tumorales y producir una disminución de la expresión de zB7R1 en células tumorales sin reducir el nivel de expresión de zB7R1 en células no tumorales a niveles perjudiciales. Muy preferidos son los agentes que tengan una forma precursora. Estos "profármacos" se convierten en su forma activa en las proximidades del tejido tumoral, normalmente mediante una actividad enzimática cuya distribución está restringida a las proximidades del tumor.

También son muy preferidos los agentes que se pueden combinar con restos dirigidos que liberan de forma selectiva el agente en un tumor. Estos restos dirigidos proporcionan una concentración local elevada del agente en las proximidades del tejido tumoral y reducen la cantidad de agente que debe administrarse para efectuar la respuesta deseada.

También se contempla el uso de terapia de combinación para tratar el cáncer, como se ha descrito anteriormente.

En una realización preferida se realiza inmunización para estimular una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica de tumor. En esta realización se administra un agente bioactivo que inhibe la activación de zB7R1 en combinación con un antígeno asociado con un tumor. La combinación de un antígeno asociado con un tumor y un mimético funcional contrarreceptor/inhibidor de zB7R1 estimula una respuesta de linfocitos T específica de un tumor, en la que los linfocitos T encuentran un nivel de inhibición menor que el ejercido por el tejido tumoral en ausencia del agente bioactivo.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un medicamento para el tratamiento del cáncer.

La presente invención también proporciona la modulación de respuestas inmunitarias normales pero indeseadas en las que hay actividad de los linfocitos T y B. En una realización preferida se proporcionan composiciones y procedimientos para inhibir la respuesta linfocitaria del huésped a tejidos y órganos transplantados. De manera deseable, estas composiciones y procedimientos se pueden usar para prolongar la supervivencia del tejido injertado. Composiciones preferidas para usar en la prevención del rechazo agudo y/o crónico de injertos comprenden los agonistas de la señalización mediada por zB7R1 descritos en el presente documento, incluidos, por ejemplo, los agentes imitadores descritos anteriormente. Polipéptidos de zB7R1 que el dominio extracelular de zB7R1 (SEC ID N° 3 o 7) o una porción del mismo; proteínas de fusión Ig-zB7R1 que comprenden el dominio extracelular de zB7R1 (SEC ID N° 3 o 7) o una porción de las mismas; anticuerpos anti-BTLA de activación de función; péptidos que imitan a su contrarreceptor (es decir, CD155) (miméticos); y composiciones químicas de molécula pequeña imitan la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor. Además de su utilidad en estrategias inmunosupresoras generales, los agonistas objeto de la señalización mediada por zB7R1 descritos en el presente documento pueden también tener implicaciones importantes en la inducción de tolerancia en transplantes de tejidos y de órganos al influir sobre la respuesta inmunitaria de los linfocitos T colaboradores del receptor lejos de una respuesta desfavorable de tipo Th1 y hacia una respuesta más favorable de tipo Th2.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva describe un medicamento para usar en transplantes y la supresión inmunitaria.

También se proporcionan composiciones adyuvantes que comprenden al menos uno de los agentes de bloqueo de zB7R1 y/o del contrarreceptor de zB7R1 CD155 o de otro tipo descritos anteriormente, así como otros antagonistas de la señalización mediada por zB7R1. También se proporcionan composiciones inmunosupresoras que comprenden al menos uno de los agentes imitadores de zB7R1 y/o del contrarreceptor de zB7R1 descritos anteriormente, así como otros antagonistas de la señalización mediada por zB7R1.

Además se contempla que las composiciones y procedimientos objeto se pueden combinar de forma sinérgica con inmunoterapias basadas en la modulación de otras vías coestimuladoras de linfocitos T y con la modulación de ICOS, PD-1, CTLA-4 y/o BTLA en concreto.

En un aspecto alternativo, la presente memoria descriptiva describe procedimientos de detección selectiva para agentes bioactivos que son útiles para modular la activación de linfocitos T. Agentes bioactivos identificados

mediante los procedimientos de detección selectiva proporcionados en el presente documento se pueden usar para reaccionar con células que expresan un contrarreceptor de zB7R1 o células que expresan zB7R1 con el fin de interferir en la interacción entre linfocitos Y y/o B que expresan zB7R1 y células no linfoides que expresan un contrarreceptor de zB7R1 y, de este modo, antagonizar la función de la interacción zB7R1/contrarreceptor de zB7R1. Como alternativa, se pueden usar agentes bioactivos para reaccionar con células que expresan un contrarreceptor de zB7R1 o células que expresan zB7R1 con el fin de imitar la interacción zB7R1/contrarreceptor de zB7R1, efectuando la inhibición de los linfocitos T en ausencia de una interacción zB7R1/contrarreceptor de zB7R1. Como alternativa, se pueden usar agentes bioactivos para modificar la interacción zB7R1/CD155 natural (o zB7R1 con otro contrarreceptor de zB7R1) de algún modo, para, por ejemplo, incrementar la asociación y aumentar la señal inhibidora.

En un aspecto alternativo, la memoria descriptiva describe vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácido nucleico de zB7R1 aislado y/o de un contrarreceptor de zB7R1 divulgadas en el presente documento (es decir, CD155; SEC ID N° 20), células huésped recombinantes que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes divulgadas en el presente documento y procedimientos para producir polipéptidos de zB7R1 y de contrarreceptor de zB7R1 que comprende cultivar las células huésped y, opcionalmente, aislar el polipéptido producido de este modo.

En otro aspecto, se proporcionan mamíferos no humanos transgénicos que comprenden un ácido nucleico que codifica un zB7R1, un CD155 y/o otra proteína contrarreceptor de zB7R1, como se divulga en el presente documento. Los nucleótidos de zB7R1, CD155 o de otro contrarreceptor de zB7R1 se introducen en el animal de un modo que permita un incremento de la expresión de los niveles de un polipéptido zB7R1 o del contrarreceptor de zB7R1, que puede incluir incrementar los niveles circulantes. Como alternativa, los fragmentos de ácido nucleico de zB7R1, Cd155 o de un contrarreceptor de zB7R1 se pueden usar para dirigirlos a los alelos de zB7R1, Cd155 o de un contrarreceptor de zB7R1 con el fin de evitar la expresión de los ácidos nucleicos de zB7R1 o de un contrarreceptor de zB7R1 endógenos (es decir, genera un animal transgénico que posee un gen defectivo en la proteína zB7R1 o del contrarreceptor zB7R1). Preferentemente, el animal transgénico es un mamífero y, más preferentemente, un roedor, tal como una rata o un ratón.

La invención será evidente tras la referencia a la siguiente descripción detallada. Además, a continuación se identifican varias referencias.

2. Definiciones

En la descripción siguiente se usan ampliamente una serie de términos. Las definiciones siguientes se proporcionan para facilitar la comprensión de la invención.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados mediante cualquier unión, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos naturales (tales como ADN y ARN) o análogos de los oligonucleótidos que se producen en la naturaleza (p. ej., formas α -enantioméricas de nucleótidos que se producen en la naturaleza) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases pirimidínicas o púricas. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, la sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, la totalidad del resto de azúcar se puede reemplazar con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoanilidato, fosforoamidato y similares. La expresión "molécula de ácido nucleico" también incluye los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que comprenden bases de ácido nucleico que se producen en la naturaleza o modificados unidas a un armazón de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

La expresión "complemento de una molécula de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia.

La expresión "secuencia de nucleótidos degenerada" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican ambos Asp).

La expresión "gen estructural" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se transcribe en un ARN mensajero (ARNm), que después se traduce a una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

- Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie concreta es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de dicha especie.
- Una “construcción de molécula de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico, monocatenaria o bicatenaria, que se ha modificado mediante intervención humana para contener segmentos de ácido nucleico combinados o yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.
- “ADN lineal” indica moléculas de ADN no circulares que tienen extremos 5' y 3' libres. El ADN lineal se puede preparar a partir de moléculas de ADN circular cerrado, tal como plásmidos, mediante digestión enzimática o alteración física.
- “ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de un molde de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Normalmente, para el inicio de la transcripción inversa se emplea un cebador complementario a las porciones de ARNm. Los expertos en la técnica también usan el término “ADNc” para hacer referencia a una molécula de ADN bicatenario que consiste en dicha molécula de ADN monocatenario y su hebra de ADN complementario. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de un molde de ARN.
- Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente, un promotor se localiza en la región no codificadora 5' de un gen, proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Elementos de secuencia dentro de los promotores que funcionan al inicio de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión para la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee y col., *Mol. Endocrinol.* 7:551 (1993)), elementos de respuesta al AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta al suero (SRE; Treisman, *Seminars in Cancer Biol* 1:47 (1990)), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE); y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly y col., *J. Biol. Chem.* 267: 19938 (1992)), AP2 (Ye y col., *J. Biol. Chem.* 269:25728 (1994)), SP1, proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3:253 (1993)) y factores octámeros (véase, en general, Watson y col., eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre y Rousseau, *Biochem. J.* 303:1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, la velocidad de la transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la velocidad de la transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores represibles.
- Un “promotor central” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor, incluida la caja TATA y el inicio de la transcripción. Mediante esta definición, un promotor central puede o no tener actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica de tejido.
- Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares, lo que permite la transcripción exclusiva o preferentemente en células, tejidos u órganos concretos. Estos tipos de elementos reguladores normalmente están asociados con genes que se expresan de un modo “específico de célula”, “específico de tejido” o “específico de órgano”.
- Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede incrementar la eficiencia de la transcripción, con independencia de la distancia u orientación del potenciador con respecto al sitio de inicio de la transcripción.
- “ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o una población de moléculas de ADN que no existe de forma natural dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas de una célula huésped concreta puede contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, ADN endógeno) siempre que el ADN huésped se combine con un ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido unido operablemente a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor de la transcripción se considera una molécula de ADN heterólogo. Por el contrario, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen endógeno unido operablemente a un promotor exógeno. Como otra ilustración, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula silvestre se considera ADN heterólogo si dicha molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen silvestre.
- Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos normalmente se denominan “péptidos”.

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína puede también comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. La célula en la que se produce la proteína puede añadir carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos y esto variará con el tipo de célula. En el presente documento, las proteínas se definen en términos de sus estructuras armazón de aminoácido; en general, no se especifican sustituyentes tales como grupos carbohidrato, pero en cualquier caso pueden estar presentes.

Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido "heterólogo".

Un "vector de clonación" es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, un cósmido o un bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula huésped. Normalmente, los vectores de clonación contienen uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de un modo determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para usar en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Normalmente, los genes marcadores incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a ampicilina.

Un "vector de expresión" es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. Normalmente, la expresión génica está bajo el control de un promotor y se dice que dicho gen está "unido operablemente al" promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central están unidos operablemente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

Un "huésped recombinante" es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heterólogo, tal como un vector de clonación o vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un huésped recombinante es una célula que produce zB7R1 a partir de un vector de expresión. En contraste con ello, una célula, que es una "fuente natural" de zB7R1 y que carece de un vector de expresión, puede producir zB7R1.

"Transformantes de integración" son células huésped recombinantes en las que el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

Una "proteína de fusión" es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de al menos dos genes. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender al menos parte de un polipéptido de zB7R1 condensado con un polipéptido que se une a una matriz de afinidad. Dicha proteína de fusión proporciona un medio para aislar grandes cantidades de zB7R1 usando cromatografía de afinidad.

El término "receptor" indica una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva denominada "contrarreceptor". Esta interacción participa en el efecto del contrarreceptor sobre la célula. Los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares, monoméricos (p. ej., el receptor de la hormona estimulante del tiroides, receptor beta adrenérgico) o multiméricos (p. ej., un receptor de PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio extracelular de unión al contrarreceptor y un dominio efector intracelular que normalmente está implicado en la transducción de la señal. En ciertos receptores unidos a membrana, el dominio extracelular de unión al contrarreceptor y el dominio efector intracelular se localizan en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

En general, la unión del contrarreceptor al receptor tiene como resultado un cambio conformacional en el receptor que produce una interacción entre el dominio efector y otra(s) molécula(s) en la célula, lo que a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que a menudo están vinculados a interacciones receptor-contrarreceptor incluyen la transcripción génica, la fosforilación, la desfosforilación, incrementos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos.

Un "receptor soluble" es un polipéptido receptor que ni está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son, normalmente, polipéptidos de unión a contrarreceptores que carecen de dominios transmembranales y citoplásmicos, y de otras uniones a la membrana celular, tal como mediante glicofosfoinositol (gpi). Los receptores solubles pueden comprender residuos de aminoácidos adicionales, tales como marcadores de afinidad que proporcionan la purificación del polipéptido o proporcionan sitios de unión del polipéptido a un sustrato o secuencias de la región constante de inmunoglobulinas. Muchos receptores de superficie celular tienen homólogos solubles que se producen en la naturaleza que se producen mediante proteólisis o se traducen a partir de ARNm sometidos a cortes y empalmes alternativos. Los receptores solubles pueden ser monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos, de los que los receptores multiméricos generalmente no comprenden más de 9 subunidades, preferentemente no comprenden más de 6 subunidades y, más preferentemente, no comprenden más de 3 subunidades. Se dice que los polipéptidos receptores carecen sustancialmente de segmentos polipeptídicos transmembranales e intracelulares cuando carecen de suficientes porciones de estos segmentos para proporcionar anclaje a la membrana o transducción de señal, respectivamente. Por ejemplo, receptores solubles representativos

para zB7R1 incluyen, por ejemplo, el receptor soluble como se muestra en la SEC ID N° 3 o 7. Está dentro del nivel del experto en la técnica indicar qué secuencias de un miembro de la familia de B7 conocido comprenden el dominio extracelular libre de un dominio transmembranal y un dominio intracelular. Además, un experto en la técnica usando el código genérico puede determinar fácilmente polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos receptores solubles.

La expresión “secuencia señal secretora” indica una secuencia de ADN que codifica un péptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una vía secretora de una célula en la que se sintetiza. Normalmente, el polipéptido más grande se escinde para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que esencialmente carece de componentes celulares contaminantes, tales como hidratos de carbono, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Normalmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir una pureza de al menos aproximadamente 80 %, de al menos aproximadamente 90 %, de al menos aproximadamente 95 %, de una pureza superior al 95 %, tal como 96 %, 97 % o 98 % o más puro, o superior al 99 % de pureza. Un modo de mostrar que una preparación de proteínas concreta contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una única banda tras la electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación de proteínas y la tinción del gel con azul de Coomassie brillante. No obstante, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, como alternativa, formas glicosiladas o derivadas.

Los términos “amino terminal” y “carboxi terminal” se usan en el presente documento para indicar las posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción concreta de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia en posición carboxi terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no necesariamente está en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en el ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

La expresión “variante de corte y empalme” se usa en el presente documento para indicar formas alternativas de ARN transcrito a partir de un gen. La variación de corte y empalme surge de forma natural a través del uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrito o, con menor frecuencia, entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede tener como resultado varios ARNm transcritos desde el mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tengan alterada la secuencia de aminoácidos. La expresión “variante de corte y empalme” también se usa en el presente documento para indicar un polipéptido codificado por una variante de corte y empalme de un ARNm transcrito a partir de un gen.

Como se usa en el presente documento, el término “inmunomodulador” incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, moléculas coestimuladoras, factores hematopoyéticos y similares, y análogos sintéticos de estas moléculas.

La expresión “par de complemento/anti-complemento” indica restos no idénticos que forman un par estable asociado de forma no covalente en las condiciones adecuadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototipo de un par de complemento/anti-complemento. Otros pares complemento/anti-complemento de ejemplo incluyen pares de receptor/contrarreceptor, anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando se desea la posterior disociación del par complemento/anti-complemento, el par complemento/anti-complemento tiene, preferentemente, una afinidad de unión inferior a 10^9 M^{-1} .

Un “anticuerpo anti-idiotipo” es un anticuerpo que se une al dominio de la región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo antiidiotipo se une a la región variable de un anticuerpo anti-zB7R1 y, por tanto, un anticuerpo antiidiotipo imita a un epítipo de zB7R1.

Un “fragmento de anticuerpo” es una porción de un anticuerpo, tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab y similares. Con independencia de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-zB7R1 se une a un epítipo del zB7R1.

La expresión “fragmento de anticuerpo” también incluye un polipéptido sintético o sometido a ingeniería genética que se une a un antígeno específico, tal como polipéptidos que consisten en la región variable de la cadena ligera, fragmentos “Fv” que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptido monocatenario recombinante en las que las regiones variables de las cadenas pesada y ligera están conectadas por un enlazador peptídico (“proteínas scFv”) y unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.

Un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinantes de la complementariedad derivadas de un anticuerpo de roedores, mientras que el resto de la molécula anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.

5 "Anticuerpos humanizados" son proteínas recombinantes en las que las regiones determinantes de la complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal se han transferido desde cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano. La construcción de anticuerpos humanizados para uso terapéutico en seres humanos que derivan de anticuerpos murinos, tales como los que se unen o neutralizan una proteína humana, está dentro de la experiencia del experto en la técnica.

10 Como se usa en el presente documento, un "agente terapéutico" es una molécula o átomo que está conjugada a un resto anticuerpo para producir un conjugado que es útil para terapia. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes o pigmentos fotoactivos y radioisótopos.

15 Un "indicador detectable" es una molécula o átomo que puede estar conjugada a un resto anticuerpo para producir una molécula útil para diagnóstico. Ejemplos de indicadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.

20 La expresión "marcador de afinidad" se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que se puede fijar a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios de unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, se puede usar cualquier péptido o proteína para la cual existe un anticuerpo u otro agente de unión específico como marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen una cola de polihistidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4: 1075 (1985); Nilsson y col., Methods Enzymol. 198:3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31 (1988)), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp y col., Biotechnology 6:1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2:95 (1991): Las moléculas de ADN que codifica marcadores de afinidad están disponibles en proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo completo, frente a un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, así como ciertos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "componente de anticuerpo" incluye un anticuerpo completo y un fragmento de anticuerpo.

Un "inmunoconjugado" es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o un indicador detectable.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de fusión anticuerpo" se refiere a una molécula recombinante que comprende un componente anticuerpo y un componente polipéptido zB7R1. Ejemplos de una proteína de fusión anticuerpo incluyen una proteína que comprende un dominio extracelular de zB7R1 y un dominio Fc o una región de unión a antígeno.

40 Un "polipéptido diana" o un "péptido diana" es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un epítipo y que se expresa en una célula diana, tal como una célula tumoral o una célula portadora de un antígeno de un agente infeccioso. Los linfocitos T reconocen epítopos peptídicos presentados por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad a un polipéptido diana o péptido diana y normalmente lisan la célula diana o reclutan otras células inmunitarias para el lugar de la célula diana, de modo que matan la célula diana.

45 Un "péptido antigénico" es un péptido que se unirá a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad para formar un complejo MHC-péptido que es reconocido por un linfocito T, de modo que inducen una respuesta de linfocitos citotóxicos tras la presentación al linfocito T. Por tanto, los péptidos antigénicos son capaces de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad adecuada e inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos, tal como lisis celular o liberación específica de citocinas contra la célula diana que se une o expresa el antígeno. El péptido antigénico se puede unir en el contexto de una del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II sobre una célula presentadora de antígeno o sobre una célula diana.

50 En eucariotas, la ARN polimerasa II cataliza la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Se puede diseñar una molécula de ácido nucleico para que contenga un molde para la ARN polimerasa II en el que el transcrito de ARN tiene una secuencia que es complementaria a la de un ARNm específico. El transcrito de ARN se denomina "ARN antisentido" y una molécula de ácido nucleico que codifica el ARN antisentido se denomina "gen antisentido". Las moléculas de ARN antisentido son capaces de unirse a las moléculas de ARNm, lo que tiene como resultado una inhibición de la traducción del ARNm.

55

Un "oligonucleótido antisentido específico de zB7R1" o un "oligonucleótido antisentido de zB7R1" es un oligonucleótido que tiene una secuencia (a) capaz de formar un triplex estable con una porción del gen zB7R1, o (b) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen zB7R1.

5 Una "ribozima" es una molécula de ácido nucleico que contiene un centro catalítico. El término incluye enzimas de ARN, ARN de autocorte y empalme, ARN de autoescisión y moléculas de ácido nucleico que realizan estas funciones catalíticas. Una molécula de ácido nucleico que codifica una ribozima se denomina "gen de ribozima".

10 Una "secuencia guía externa" es una molécula de ácido nucleico que dirige la ribozima endógena, la ARNasa P, a una especie concreta de ARNm intracelular, que tiene como resultado la escisión del ARNm por la ARNasa P. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia guía externa se denomina un "gen de secuencia guía externa".

15 La expresión "gen variante de zB7R1" se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido que es una modificación de la SEC ID N° 2 (es decir, SEC ID N° 6). Dichas variantes incluyen polimorfismos que se producen en la naturaleza de los genes zB7R1, así como genes sintéticos que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2. Formas variantes adicionales de los genes zB7R1 son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o deleciones de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Un gen zB7R1 variante se puede identificar, por ejemplo, determinando si el gen hibrida con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 1 o su complemento, en condiciones rigurosas.

20 Como alternativa, los genes zB7R1 variantes se pueden identificar mediante comparación de secuencia. Dos secuencias de aminoácidos tienen una "identidad de secuencia de aminoácidos del 100 %" si los residuos aminoácido de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean por una correspondencia máxima. De forma similar, dos secuencias de nucleótidos tienen una "identidad de secuencia de nucleótidos del 100 %" si los residuos nucleotídicos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean por una correspondencia máxima. Las comparaciones de secuencia se pueden realizar usando programas de software estándar tales como los incluidos en la suite informática LASERGENE bioinformatics, producida por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros procedimientos para comparar dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos determinando la alineación óptima son bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997), Wu y col. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," en Methods in Gene Biotechnology, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), y Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2ª Edición (Academic Press, Inc. 1998)). Más adelante se describen procedimientos concretos para determinar la identidad de la secuencia.

30 Con independencia del procedimiento concreto usado para identificar un gen zB7R1 variante o un polipéptido zB7R1 variante, un gen variante o polipéptido codificado por un gen variante puede caracterizarse funcionalmente la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-zB7R1. Un gen zB7R1 variante o un polipéptido zB7R1 variante pueden también caracterizarse funcionalmente por la capacidad de unión a su contrarreceptor o contrarreceptores usando un ensayo biológico o bioquímico descrito en el presente documento.

35 La expresión "variante alélica" se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica aparece de forma natural a través de mutación y puede tener como resultado un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silentes (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

40 El término "ortólogo" indica un polipéptido o proteína obtenido de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

45 "Parálogos" son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas producidas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen por duplicación génica. Por ejemplo, α -globina, β -globina y mioglobina son parálogos unas de otras.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunológica" incluye respuestas de linfocitos T y/o B, es decir respuestas inmunológicas celulares y/o humorales. En una realización, las composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar para reducir o potenciar las respuestas de linfocitos T colaboradores (Th) y, más preferentemente, las respuestas de linfocitos Th. En otra realización, las composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar para reducir o potenciar las respuestas de linfocitos T citotóxicos (Tc). Los procedimientos reivindicados se pueden usar para reducir o potenciar las respuestas inmunitarias primarias y secundarias y la función efectora (p. e., actividad citolítica, producción de citocinas y anticuerpos, y presentación de antígeno). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la respuesta inmunitaria de un sujeto usando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo analizando la producción de anticuerpos, la proliferación de células inmunitarias, la liberación de citocinas, la expresión de

marcadores de superficie celular, la citotoxicidad etc.

5 Por "señalización de zB7R1", "señalización mediada por zB7R1", "señalización negativa mediada por zB7R1" y variaciones de los mismos se quiere decir señalización intracelular en linfocitos causada por la unión y/o activación del receptor zB7R1 por su(s) ligando(s) correspondiente(s) resultante en atenuación y/o regulación por disminución de la actividad linfocitaria. En un aspecto, la señalización mediada por zB7R1 comprende la activación de SHP-1 y/o SHP-2.

10 Como se usa en el presente documento, "actividad linfocitaria" se refiere a los procesos inmunológicos de la activación de los linfocitos B y T, proliferación, diferenciación y supervivencia, así como las funciones inmunitarias efectoras asociadas en células linfocitos, incluida la actividad citolítica (linfocitos Tc), la producción de citocinas (linfocitos Th), la producción de anticuerpos (linfocitos B) y la presentación de antígeno (linfocitos B). Como se ha indicado anteriormente, hay numerosos ensayos bien conocidos para el experto en la técnica para detectar y/o monitorizar dichos procesos, incluidos, entre otros, los ensayos descritos en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "interacción de zB7R1 y su contrarreceptor" o "interacción de zB7R1 y CD155) se refiere a la interacción física directa (p. ej., unión) y/u otra interacción indirecta de una molécula contrarreceptor de zB7R1 funcional (es decir, CD155) con un receptor zB7R1 funcional en un linfocito, que tiene como resultado la estimulación del receptor zB7R1 y la señalización de zB7R1 intracelular asociada. De forma similar, la expresión "interacción natural de zB7R1 y su contrarreceptor" se refiere a la interacción física directa (es decir, unión) y/u otra interacción indirecta de un contrarreceptor funcional y expresado de forma endógena, tal como
20 CD155, con un receptor zB7R1 funcional y expresado de forma endógena sobre un linfocito, que tiene como resultado la estimulación del receptor zB7R1 y la señalización de zB7R1 intracelular asociada.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de bloqueo" incluye los agentes que interfieren en la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor y/o que interfieren con la capacidad del contrarreceptor para inhibir la actividad linfocitaria, por ejemplo medida mediante la producción y/o proliferación de citocinas. La expresión "agente de bloqueo" incluye además agentes que inhiben la capacidad de zB7R1 para unirse a un ligando natural y/o que interfieren con la capacidad de zB7R1 para inhibir la actividad de los linfocitos T. Agentes de ejemplo incluyen anticuerpos de función de tipo burla (Mocking), así como péptidos que bloquean la unión de zB7R1 con su contrarreceptor pero que no estimulan la señalización mediada por zB7R1 en un linfocito (p. ej., proteínas de fusión de zB7R1), peptidomiméticos, moléculas pequeñas y similares. Agentes de bloqueo preferidos incluyen agentes
30 capaces de inhibir la asociación inducible de zB7R1 con SHP-1 y/o SHP-2, o la transducción de señal que deriva de la interacción de SHP-1 y/o SHP-2 con zB7R1

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente imitador" incluye los agentes que imitan la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor y/o que aumentan, potencian o incrementan la capacidad de zB7R1 y/o contrarreceptor para inhibir la actividad linfocitaria. Agentes de ejemplo incluyen anticuerpos de función de activación, así como péptidos que aumentan o potencian la capacidad de zB7R1 para unirse a su contrarreceptor o sustituto del papel del contrarreceptor en la estimulación de la señalización mediada por zB7R1 (p. ej., proteínas de fusión de su contrarreceptor), peptidomiméticos, moléculas pequeñas y similares.

40 La presente invención incluye fragmentos funcionales de genes zB7R1. Dentro del contexto de la presente invención, un "fragmento funcional" de un gen zB7R1 se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una porción de un polipéptido de zB7R1 que es un dominio descrito en el presente documento o, al menos, se une específicamente a un anticuerpo anti-zB7R1.

Debido a la imprecisión de los procedimientos analíticos estándar, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como "alrededor de" X o "aproximadamente" X, se entenderá que el valor indicado de X es preciso a $\pm 10\%$.

45 3. Producción de polinucleótidos o genes zB7R1

Se pueden obtener moléculas de ácido nucleico que codifican un gen zB7R1 humano mediante detección selectiva de una biblioteca genómica o de ADNc humana usando sondas polinucleotídicas basadas en las SEC ID N° 1 o 5. Estas técnicas son estándar y bien establecidas y se pueden conseguir usando kit de clonación disponibles en proveedores comerciales. Véase, por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), *Shore Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición, John Wiley & Sons 1995; Wu y col., *Methods in Gene Biotechnology*, CRC Press, Inc. 1997; Aviv and Leder, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:1408 (1972); Huynh y col., "Constructing and Screening cDNA Libraries in .gt10 and .gt11," in *DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I*, Glover (ed.), página 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) en las páginas 47-52.

55 Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen zB7R1 humano también se pueden obtener usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleotídicos que tienen secuencias de nucleótidos basadas en las secuencias de nucleótidos del gen o ADNc de zB7R1. Se proporcionan procedimientos generales para detección selectiva con PCR por, por ejemplo, Yu y col., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries," in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White

(ed.), Humana Press, Inc., 1993. Además, Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members," en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), Humana Press, Inc. 1993 describen técnicas para usar PCR para aislar genes relacionados. Como alternativa, se puede obtener un gen zB7R1 sintetizando moléculas de ácido nucleico usando como cebadores mutuos oligonucleótidos largos y las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Ausubel (1995)). Técnicas establecidas usando la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad para sintetizar moléculas de ADN de una longitud de al menos dos kilobases (Adang y col., *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993), Bambot y col., *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993), Dillon y col., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes," en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993), y Holowachuk y col., *PCR Methods Appl.* 4:299 (1995)). Para revisiones de la síntesis de polinucleótidos, véase, por ejemplo, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press 1994), Itakura y col., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984), y Climie y col., *Proc Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633 (1990).

15 *4. Producción de los polinucleótidos de zB7R1 y CD155 y variantes génicas*

La presente memoria descriptiva describe diversas moléculas de ácido nucleico, incluidas las moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos de zB7R1 divulgados en el presente documento. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que, a la luz de la degeneración del código genético, es posible una considerable variación de la secuencia entre estas moléculas polinucleotídicas. Además, la presente memoria descriptiva describe polipéptidos receptores solubles monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos aislados, que comprenden al menos una subunidad receptora de zB7R1 que es sustancialmente homóloga al polipéptido receptor de las SEC ID N° 2 o 5. Por tanto, la presente invención contempla moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de zB7R1 que comprenden nucleótidos degenerados de SEC ID N° 1 y sus equivalentes en ARN.

La Tabla 1 expone los códigos de una letra para indicar las posiciones de los nucleótidos degenerados. "Resoluciones" son los nucleótidos indicados por un código de una letra. "Complemento" indica el código para el(los) nucleótido(s) complementario(s). Por ejemplo, el código Y indica C o T y su R complementaria indica A o G, siendo A complementaria de T y siendo G complementaria de C.

Tabla 1

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

Los códigos degenerados, que abarcan todos los posibles codones para un aminoácido dado, se indican en la Tabla 2.

Tabla 2

Aminoácido	Código de una letra	Codones	Codón degenerado
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	-	TAATAGTGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Any	X		NNN

- 5 Un experto en la técnica apreciará que se introduce alguna ambigüedad en la determinación de un codón degenerado representante de todos los posibles codones que codifican un aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR) y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre codones que codifican fenilalanina y leucina. Por tanto, alguna polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto en la técnica puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N° 2. Las secuencias variantes se pueden analizar con facilidad para determinar la funcionalidad, tal como se describe en el presente documento.
- 10

Diferentes especies pueden exhibir “uso preferencial de codón”. En general, véase Grantham y col., Nucl. Acids Res. 8: 1893 (1980), Haas y col. Curr. Biol. 6:315 (1996), Wain-Hobson y col., Gene 13:355 (1981), Grosjean y Fiers, Gene

18:199 (1982), Holm, Nuc. Acids Res. 14:3075 (1986), Ikemura, J. Mol. Biol. 158:573 (1982), Sharp y Matassi, Curr. Opin. Genet. Dev. 4:851 (1994), Kane, Curr. Opin. Biotechnol. 6:494 (1995), y Makrides, Microbiol. Rev. 60:512 (1996). Como se usa en el presente documento, la expresión “uso preferencial de codón” o “codones preferenciales” es una expresión de la técnica en referencia a los codones de traducción de proteínas que se usan con mayor frecuencia en células de una determinada especie, favoreciendo de este modo uno o algunos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (Véase la Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede estar codificado por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamífero ACC es el codón más usado; en otras especies, por ejemplo células de insecto, levaduras, virus o bacterias, diferentes codones de Thr pueden ser preferenciales. Los codones preferenciales para una especie concreta se pueden introducir en polinucleótidos mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales en ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína haciendo la traducción proteica más eficiente dentro de un tipo o especie de célula concreta. Por tanto, las secuencias de codones degenerados divulgadas en el presente documento sirven como molde para optimizar la expresión de polinucleótidos en varios tipos de células y especies de uso habitual en la técnica y divulgados en el presente documento. Las secuencias que contienen codones preferenciales se pueden analizar y optimizar según su expresión en varias especies y se puede analizar su funcionalidad, tal como se ha divulgado en el presente documento.

Un ADNc que codifica zB7R1 se puede aislar mediante diversos procedimientos, tal como mediante sondaje con un ADNc humano completo o parcial o con uno o más grupos de sondas degeneradas basadas en las secuencias divulgadas. Un ADNc también se puede clonar usando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores diseñados a partir de las secuencias de zB7R1 humanas representativas divulgadas en el presente documento. Además, se puede usar una biblioteca de ADNc para transformar o transfeccionar células huésped y la expresión del ADNc de interés se puede detectar con un anticuerpo frente al polipéptido zB7R1.

Los expertos en la técnica reconocerá que la secuencia divulgada en la SEC ID N° 1 representa un único alelo del zB7R1 humano y que cabe esperar que se produzca variación alélica y corte y empalme alternativa (es decir, SEC ID N° 5). Las variantes alélicas de esta secuencia se pueden clonar sondando bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos estándar. En el presente documento se describen variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento, incluidas las que contienen mutaciones silentes y aquéllas en las que las mutaciones tienen como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, así como proteínas que son variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento. En el presente documento se describen moléculas de ADNc generadas a partir de ARNm sometidos a corte y empalme alternativos, que conservan las propiedades del polipéptido zB7R1, así como polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y las variantes de corte y empalme de estas secuencias se pueden clonar sondando bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Usando los procedimientos tratados anteriormente, un experto en la técnica puede preparar varios polipéptidos que comprenden un receptor zB7R1 soluble que es sustancialmente homólogo a la SEC ID N° 2 o 5 o que codifica aminoácidos de las SEC ID N° 3, 4 o 6 o variantes alélicas de las mismas, y que conservan las propiedades de unión al contrarreceptor del receptor zB7R1 silvestre. Dichos polipéptidos pueden también incluir segmentos polipeptídicos adicionales tal como generalmente se divulgan en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden hibridar en condiciones estrictas con moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos divulgados en el presente documento. Por ejemplo, dichas moléculas de ácido nucleico puede hibridar en condiciones estrictas con moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1 o con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEC ID N° 1, o fragmentos de la misma.

En general, las condiciones estrictas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5 °C menos que el punto de fusión térmica (T_f) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La T_f es la temperatura (a un pH y fuerza iónica definidos) a la cual el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Tras la hibridación, las moléculas de ácido nucleico se pueden lavar para eliminar las moléculas de ácido nucleico que no han hibridado en condiciones estrictas o en condiciones muy estrictas. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel y col., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227 (1990)). Software de análisis de secuencia como LIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) and Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), así como sitios en la red, son herramientas disponibles para analizar una secuencia dada y calcular la T_f en base a criterios definidos por el usuario. Está dentro de las capacidades del experto en la técnica adaptar las condiciones de hibridación y lavado para usar con un híbrido polinucleotídico concreto.

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos de zB7R1 aislados que tienen una identidad de secuencia sustancialmente similar a la de los polipéptidos de las SEC ID N° 2, 3, 6 o 7, o sus ortólogos. La expresión "identidad de secuencia sustancialmente similar" se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que tienen al menos un 70 %, al menos 80 %, al menos 90%, al menos 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 % o más del 95 % de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en la SEC ID N° 3, o sus ortólogos. Por ejemplo, se pueden usar receptores zB7R1 variantes u ortólogos para generar una respuesta inmunitaria y producir anticuerpos de reacción cruzada frente al zB7R1 humano. Dichos anticuerpos pueden humanizarse y modificarse tal como se describe en el presente documento y se pueden usar terapéuticamente para tratar la psoriasis, la artritis psoriásica, la EII, la colitis, la endotoxemia, así como en otras aplicaciones terapéuticas descritas en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico variantes de zB7R1 que se pueden identificar usando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, y un ensayo de hibridación. Dichas variantes de zB7R1 incluyen moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEC ID N° 1 (o su complementaria) en condiciones de lavado estrictas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5 x 2 SSC con SDS al 0,1 % a 55-65 °C, y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 de al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o superior a 95 %, tal como 96%, 97 %, 98 % o 99 %. Como alternativa las variantes de zB7R1 se pueden caracterizar como moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEC ID N° 1 (o su complementaria) en condiciones de lavado muy estrictas, en las que la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x - 0,2 x SSC con SDS al 0,1 % a 50-65 °C y (2) que codifican un polipéptido que tiene identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 de al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o superior al 95 %, tal como 96%, 97 %, 98 % o 99 % o mayor.

El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986), y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992). En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (ibid.) como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican con los códigos convencionales de una letra). A continuación, el porcentaje de identidad se calcula como: [(Número total de coincidencias idénticas)/ [longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear las dos secuencias]] (100).

Tabla 3

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

Los expertos en la técnica aprecian que se disponen de muchos algoritmos establecidos para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitudes "FASTA" de Pearson y Lipman es un procedimiento de alineación de proteínas adecuado para analizar el nivel de identidad compartido por una secuencia

de aminoácidos divulgada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una variante putativa de zB7R1. Pearson and Lipman, Proc.Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) y Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990) describen el algoritmo FASTA. En resumen, el FASTA caracteriza primero la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia consultada (p. ej. SEC ID N° 2 o SEC ID N° 3) y una secuencia de prueba que tiene bien la mayor densidad de identidades (si la variable ktup ES 1) o pares de identidades (si ktup= 2) sin considerar sustituciones, inserciones o deleciones conservadoras de aminoácidos. Las diez regiones con la mayor densidad de identidades se vuelven a puntuar después comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados usando una matriz de sustitución de aminoácidos y los extremos de las regiones se "cortan" para inducir únicamente los residuos que contribuyen a la puntuación más alta. Si hay varias regiones con puntuaciones superiores al valor de "corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor ktup), las regiones iniciales cortadas se analizan para determinar si las regiones se pueden unir para formar una alineación aproximada con huecos. Por último, las regiones con mayor puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787 (1974)), que permite inserciones y deleciones de aminoácidos. Parámetros ilustrativos del análisis FASTA son: ktup=1, penalización por abertura de hueco= 10, penalización por extensión de hueco= 1, y matriz de sustitución= BLOSUM62. Estos parámetros se pueden introducir en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Anexo 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990).

El FASTA también se puede usar para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una proporción tal como se ha divulgado con anterioridad. Para las comparaciones de las secuencias de nucleótidos, el valor ktup puede variar entre de uno a seis, preferentemente de tres a seis, más preferentemente tres, con otros parámetros fijados tal como se ha descrito anteriormente.

La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene un cambio conservador de aminoácido en comparación con una secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Por ejemplo, se pueden obtener variantes que contienen una o más sustituciones de aminoácidos de SEC ID N° 2, en las que un alquilaminoácido es sustituido por un alquilaminoácido en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido aromático es sustituido por un aminoácido aromático en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido que contiene azufre es sustituido por aminoácido que contiene azufre en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido que contiene hidroxilo es sustituido por un aminoácido que contiene hidroxilo en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido ácido es sustituido por un aminoácido ácido en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido básico es sustituido por un aminoácido básico en una secuencia de aminoácidos de zB7R1 o un aminoácido monocarboxílico dibásico es sustituido por aminoácido monocarboxílico dibásico en una secuencia de aminoácidos de zB7R1. Entre los aminoácidos habituales, por ejemplo una "sustitución conservadora de aminoácido" se ilustra mediante una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los grupos siguientes: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina, y (6) lisina, arginina e histidina. La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineaciones múltiples locales de segmentos de secuencias de proteínas, que representan regiones muy conservadas de más d 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)). De acuerdo con esto, las frecuencias de sustitución BLOSUM62 se pueden usar para definir sustituciones de aminoácidos conservadoras que se pueden introducir en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Aunque es posible diseñar las sustituciones de aminoácidos en base únicamente a las propiedades químicas (como se ha tratado con anterioridad), el lenguaje "sustitución conservadora de aminoácido" se refiere, preferentemente, a una sustitución representada por un valor BLOSUM62 superior a -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor BLOSUM62 de 0, 1, 2 o 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones conservadoras de aminoácidos preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 1 (p. ej., 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones de aminoácido conservadoras se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 2 (p. ej., 2 o 3). Variantes concretas de zB7R1 se caracterizan por tener una identidad de secuencia de al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o superior a 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor con la correspondiente secuencia de aminoácidos (p. ej., SEC ID N° 2, 3, 6 o 7), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos se debe a una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Se pueden introducir cambios conservadores de aminoácidos en un gen zB7R1 mediante, por ejemplo, sustitución de nucleótidos por los nucleótidos citados en la SEC ID N° 1 o 5. Dichas variantes de "aminoácidos conservadores" se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida a los oligonucleótidos, mutagénesis de barrido con ligador, mutagénesis usando la reacción en cadena de la polimerasa y similares (véase Ausubel (1995); y McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991)). Se puede identificar un polipéptido variante de zB7R1 mediante la capacidad de unirse específicamente a anticuerpos anti-zB7R1.

La proteína también puede comprender residuos de aminoácidos que no se producen en la naturaleza. Aminoácidos que no se producen en la naturaleza incluyen, sin limitaciones, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, ácido tiazolidincarboxílico, dehidroprolina y 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y

4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen varios procedimientos para incorporar residuos de aminoácidos que no se producen en la naturaleza en proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que se suprimen las mutaciones sin sentido usando ARNt supresores químicamente aminoacilados. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar el ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido normalmente se lleva a cabo en un sistema acelular que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos comercialmente disponibles. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, J. Am. Chem. Soc. 113:2722 (1991), Ellman y col., Methods Enzymol. 202:301 (1991), Chung y col., Science 259:806 (1993), y Chung y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:10145 (1993).

En un segundo procedimiento, la traducción se lleva a cabo en oocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti y col., J. Biol. Chem. 271:19991 (1996)). En un tercer procedimiento, las células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que tiene que reemplazarse (p. ej., fenilalanina) y en presencia del(los) aminoácido(s) que no se producen en la naturaleza deseado(s) (p. ej., 1-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido que no se produce en la naturaleza se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase Koide y col., Biochem. 33:7470 (1994). Los residuos aminoácidos que se producen en la naturaleza se pueden convertir en especies no naturales mediante modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida a sitio para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2:395 (1993)).

Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genérico, aminoácidos que no se producen en la naturaleza y aminoácidos no naturales.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis de barrido con alanina (Cunningham y Wells, Science 244:1081 (1989), Bass y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:4498 (1991), Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering," en Proteins: Analysis and Design, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En la última técnica, se introducen mutaciones puntuales de alanina en cada residuo de la molécula y en las moléculas mutantes resultantes se determina la actividad biológica para identificar residuos de aminoácidos que son cruciales para la actividad de la molécula. Véase también Hilton y col., J. Biol. Chem. 271:4699 (1996)..

Aunque el análisis de la secuencia se puede usar para definir adicionalmente la región de unión del contrarreceptor de zB7R1, los aminoácidos que desempeñan un papel en la actividad de unión de zB7R1 (tal como la unión de zB7R1 a su contrarreceptor o sus contrarreceptores o a un anticuerpo anti-zB7R1) se pueden determinar mediante análisis físico de la estructura, tal como se determina mediante dichas técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con mutación de los aminoácidos putativos de sitio de contacto. Véase, por ejemplo, de Vos y col., Science 255:306 (1992), Smith y col., J. Mol. Biol. 224:899 (1992), y Wlodaver y col., FEBS Lett. 309:59 (1992).

Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos y analizar usando procedimientos conocidos de mutagénesis y detección selectiva, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241:53 (1988)) o Bowie y Sauer (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:2152 (1989)). En resumen, estos autores divulgan procedimientos para aleatorizar de forma simultánea dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionando polipéptidos funcionales y, después, secuenciando los polipéptidos mutageneizados para determinar el espectro de sustituciones permitidas en cada posición. Otros procedimientos que se pueden usar incluyen expresión en fagos (p. ej., Lowman y col., Biochem. 30:10832 (1991), Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.223.409, Huse, publicación internacional n° WO 92/06204, y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire y col., Gene 46:145 (1986), y Ner y col., DNA 7:127, (1988)). Además, el zB7R1 arcado con biotina o FITC se puede usar para la clonación para expresión de contrarreceptores de zB7R1.

Variantes de las secuencias de nucleótidos y de polipéptidos de zB7R1 divulgadas también se pueden generar mediante reestructuración de ADN tal como han divulgado Stemmer, Nature 370:389 (1994), Stemmer, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:10747 (1994) y la publicación internacional n° WO 97/20078. En resumen, las moléculas variantes de ADN se generan mediante recombinación homóloga *in vitro* mediante fragmentación aleatoria de un ADN parental, seguido por reensamblaje usando PCR, que tiene como resultado mutaciones puntuales introducidas de forma aleatoria. Esta técnica se puede modificar usando una familia de moléculas de ADN parental, tales como variantes alélicas o moléculas de ADN de especies diferentes, para introducir variabilidad adicional en el proceso. La selección o detección selectiva de la actividad deseada, seguida por repeticiones adicionales de la mutagénesis y en ensayo, proporciona una "evolución" rápida de las secuencias seleccionando las mutaciones deseables al tiempo que se seleccionan contra cambios perjudiciales.

Los procedimientos de mutagénesis, tal como se divulgan en el presente documento, se pueden combinar con procedimientos de detección selectiva automáticos de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos clonados mutageneizados en las células huésped. Las moléculas de ADN mutageneizadas que codifican polipéptidos biológicamente activos o polipéptidos que se unen con anticuerpos anti-zB7R1 se pueden recuperar de células huésped y secuencia rápidamente usando equipos modernos. Estos procedimientos permiten la rápida

determinación de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

La presente memoria descriptiva describe "fragmentos funcionales" de polipéptidos de zB7R1 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Se puede realizar análisis de delecciones de rutina de las moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de zB7R1. Como ilustración, las moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1 o 5 se pueden digerir con la nucleasa *Ba31* para obtener una serie de delecciones anidadas. Después, los fragmentos se insertan en los vectores de expresión en el marco de lectura adecuado y se aíslan los polipéptidos expresados y se analiza su capacidad para unirse a anticuerpos anti-zB7R1. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es usar mutagénesis dirigida al oligonucleótido para introducir delecciones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Como alternativa, se pueden sintetizar fragmentos concretos de un gen de zB7R1 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

Ejemplos de este enfoque general se tienen en estudios del truncamiento en uno o ambos extremos de los interferones resumidos por Horisberger y Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66:507 (1995). Además, por ejemplo, Treuter y col., *Molec. Gen. Genet.* 240:113 (1993), Content y col., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon," en *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, "The EGF Receptor," en *Control of Animal Cell Proliferation*, Vol. 1, Boynton y col., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985), Coumilleau y col., *J. Biol. Chem.* 270:29270 (1995); Fukunaga y col., *J. Biol. Chem.* 270:25291 (1995); Yamaguchi y col., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295 (1995), y Meisel y col., *Plant Molec. Biol.* 30:1 (1996) describen técnicas estándar para el análisis funcional de proteínas.

La presente memoria descriptiva describe fragmentos funcionales de un gen de zB7R1 que tienen cambios funcionales en comparación con una secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Se puede identificar un gen variante de zB7R1 en base a la estructura determinando el nivel de identidad con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos divulgadas, como se ha tratado anteriormente. Un enfoque alternativo para identificar un gen variante en base a la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un posible gen variante de zB7R1 puede hibridar con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, tales como la SEC ID N° 1 o 5.

La presente memoria descriptiva describe usando fragmentos funcionales de polipéptidos zB7R1, epítopos antigénicos, porciones portadoras de epítopos de zB7R1 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales, epítopos antigénicos, porciones portadoras de epítopos de los polipéptidos zB7R1. Dichos fragmentos se usan para generar polipéptidos para usar en la generación de anticuerpos y parejas de unión que son agonistas, se unen, bloquean, inhiben, incrementan, reducen, antagonizan o neutralizan la actividad de un receptor B7. Un polipéptido zB7R1 "funcional" o fragmento del mismo, tal como se define en el presente documento, se caracteriza por su capacidad para unirse a un contrarreceptor de zB7R1, tal como CD155, o bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la señalización mediada por zB7R1, la actividad proliferativa o de diferenciación; o por su capacidad para inducir o inhibir funciones celulares especializadas; o por su capacidad para unirse específicamente a un anticuerpo anti-zB7R1, célula o contrarreceptor de B7. Como se ha descrito previamente en el presente documento, zB7R1 se caracteriza como un miembro de la familia de B7 por la estructura de su receptor y los dominios, tal como se describe en el presente documento. Por tanto, la presente memoria descriptiva describe el uso de proteínas de fusión que abarcan: (a) moléculas polipeptídicas que comprenden uno o más de los dominios descritos anteriormente; y (b) fragmentos funcionales que comprenden uno o más de estos dominios. A la otra porción polipeptídica de la proteína de fusión puede contribuir otro receptor de la familia B7, tal como CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, HHLA2 o BTLA, o un péptido señal secretor no relacionado y/o no nativo que facilita la secreción de la proteína de fusión.

La presente memoria descriptiva describe fragmentos polipeptídicos o péptidos que comprenden una porción portadora de epítopos de un polipéptido zB7R1 descrito en el presente documento. Dichos fragmentos o péptidos pueden comprender un "epítipo inmunogénico" que es parte de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos cuando toda la proteína se usa como inmunógeno. Los péptidos portadores de epítopos inmunogénicos se pueden identificar usando procedimientos estándar (véase, por ejemplo, Geysen y col. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:3998 (1983)).

En contraste con ello, los fragmentos polipeptídicos o péptidos pueden comprender un "epítipo antigénico", que es una región de una molécula de proteína a la cual se puede unir específicamente un anticuerpo. Ciertos epítopos consisten en una tira lineal o contigua de aminoácidos y la antigeneicidad de dicho epítipo no se altera mediante agentes desnaturizantes. En la técnica se sabe que se pueden usar péptidos sintéticos relativamente cortos que pueden imitar a los epítopos de una proteína para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe y col., *Science* 219:660 (1983)). De acuerdo con esto, los péptidos portadores de epítopos antigénicos; péptidos antigénicos, epítopos y polipéptidos descritos en el presente documento son útiles para producir anticuerpos que se unen a los polipéptidos descritos en el presente documento, así como para identificar y efectuar detección selectiva de anticuerpos monoclonales anti-zB7R1 que son neutralizantes y que pueden ser agonistas, unirse, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de su contrarreceptor. Dichos

anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente invención se pueden unir a un epítipo antigénico de zB7R1. Se pueden usar los perfiles de hidrofiliidad de Hopp/ Woods para determinar las regiones que tienen el potencial más antigénico en la SEC ID N° 3 (Hopp y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88:1-18, 1986 y Triquier y col., Protein Engineering 11:153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana móvil de seis
 5 residuos. Los residuos G, S y T enterrados y los residuos H, Y y W expuestos se ignoraron. En zB7R1, un experto en la técnica puede determinar estas regiones. Además, los epítipos antigénicos de zB7R1 en la SEC ID N° 2, predicha mediante un gráfico de Jameson-Wolf, usando, por ejemplo, un programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI), sirven como epítipos antigénicos preferidos y un experto en la técnica puede determinarlos. Dichos epítipos antigénicos incluyen (1) residuos de aminoácidos 80 a 86 de la SEC ID N° 2; (2) residuos de
 10 aminoácidos 163 a 170 de la SEC ID N° 2; (3) residuos de aminoácidos 163 a 190 de la SEC ID N° 2; (4) residuos de aminoácidos 175 a 190 de la SEC ID N° 2; y (5) residuos de aminoácidos 211 a 221 de la SEC ID N° 2. En realizaciones preferidas, los epítipos antigénicos a los que se unen los anticuerpos neutralizantes de la presente invención contendrían residuos de la SEC ID N° 2 (y los correspondientes residuos de la SEC ID N° 3) que son importantes para la unión contrarreceptor-receptor.

15 Los polipéptidos y péptidos portadores de epítipos antigénicos pueden contener al menos de cuatro a diez aminoácidos, al menos de diez a quince aminoácidos o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Dichos polipéptidos y péptidos portadores de epítipos se pueden producir mediante fragmentación de un polipéptido zB7R1 o mediante síntesis peptídica química, tal como se describe en el presente documento. Además, los epítipos se pueden seleccionar mediante expresión en fagos de bibliotecas de péptidos aleatorias (véase, por ejemplo, Lane y Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5:268 (1993), y Cortese y col., Curr. Opin. Biotechnol. 7:616 (1996)). Procedimientos estándar para identificar epítipos y producir anticuerpos a partir de péptidos pequeños que comprenden un epítipo se describen en, por ejemplo, Mole, "Epitope Mapping," en Methods in Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992), Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter y Ladyman (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995), y Coligan y col. (eds.), Current Protocols in Immunology, páginas 9.3.1 - 9.3.5 y páginas 9.4.1 - 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

Para cualquier polipéptido de zB7R1, incluidas las variantes y las proteínas de fusión, un experto en la técnica puede generar fácilmente una secuencia polinucleotídica completamente degenerada que codifica dicha variante usando la información que se indica en las Tablas 1 y 2 anteriores. Además, los expertos en la técnica pueden usar el software estándar para concebir variantes de zB7R1 tras las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos descritas en el presente documento.

5. Producción de polipéptidos de zB7R1 y CD155

35 Los polipéptidos descritos en el presente documento, incluidos polipéptidos de longitud completa; receptores solubles monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos; receptores longitud completa; fragmentos de receptores (p. ej., fragmentos de unión al contrarreceptor y epítipos antigénicos), fragmentos funcionales y proteínas de fusión se pueden producir en células huésped recombinantes siguiendo técnicas convencionales. Para expresar un gen de zB7R1 o CD155, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido debe estar unida operablemente a secuencias reguladoras que controlan la expresión de la transcripción en un vector de expresión y, después, debe introducirse en una célula huésped. Además de las secuencias reguladoras de la transcripción, dichos promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de la transcripción y un gen marcador que es adecuado para la selección de células que portan el vector de expresión.

Los vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína extraña en células eucarióticas normalmente contienen (1) elementos de ADN procariontico que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibiótico para proporcionar el crecimiento y selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariótico que controlan el inicio de la transcripción, tal como un promotor, y (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de los transcritos, tal como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación. Como se ha tratado anteriormente, los vectores de expresión pueden también incluir secuencias nucleotídicas que codifican una secuencia secretora que dirige el polipéptido heterólogo en la vía secretora de una célula huésped. Por ejemplo, un vector de expresión de zB7R1 puede comprender un gen de zB7R1 y una secuencia secretora derivada de cualquier gen secretado.

Las proteínas zB7R1 o CD155 se pueden expresar en células de mamífero. Ejemplos de células huésped de mamífero adecuadas incluyen células de riñón de mono verde africano ((Vero; ATCC CRL 1587), células de riñón embrionario humano (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de riñón de hámster neonato (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón canino (MDCK; ATCC CRL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin y col., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986)), células de hipófisis de rata (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas en SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas ((NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

60 Para un huésped mamífero, las señales reguladoras de la transcripción y la traducción pueden derivar de fuentes

virales de mamífero, por ejemplo adenovirus, papilomavirus bovino, virus de simio o similares, en las que las señales reguladoras se asocian con un gen concreto que tiene un nivel de expresión elevado. También se pueden obtener secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción adecuadas de genes de mamífero, por ejemplo de genes de actina, colágeno, miosina y meta-lotioneína.

- 5 Las secuencias reguladoras de la transcripción incluyen una región promotora suficiente para dirigir el inicio de la síntesis de ARN. Promotores eucarióticos adecuados incluyen el promotor del gen de la *metalotioneína I* de ratón (Hamer y col., J. Molec. Appl. Genet. 1:273 (1982)), el promotor *TK* del virus *Herpes* (McKnight, Cell 31:355 (1982)), el promotor temprano de *SV40* (Benoist y col., Nature 290:304 (1981)), el promotor del virus del sarcoma de *Roats* (Gorman y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 79:6777 (1982)), el promotor del citomegalovirus (Foecking y col., Gene 45:101 (1980)), y el promotor del virus de tumor de mama de ratones (véase, en general, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

- 10 Como alternativa, se puede usar un promotor procariótico, tal como el promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T3, para controlar la expresión del gen *zB7R1* en células de mamífero si el promotor procariótico está regulado por un promotor eucariótico (Zhou y col., Mol. Cell. Biol. 10:4529 (1990), y Kaufman y col., Nucl. Acids Res. 19:4485 (1991)).

- 15 En ciertas realizaciones, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido del receptor soluble *zB7R1*, un fragmento del polipéptido de *zB7R1*, un receptor soluble *CD155* o un fragmento de un polipéptido de *CD155* está unido operablemente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, que incluyen, en general, un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. Habitualmente, el vector también contendrá uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que, dentro de ciertos sistemas, se pueden proporcionar marcadores seleccionables en vectores aparte y la replicación del ADN exógeno se puede proporcionar mediante integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es tema del diseño de rutina dentro del nivel de un experto en la técnica. Muchos de estos elementos se describen en la literatura y están disponibles a través de proveedores comerciales. Múltiples componentes de un complejo de receptor soluble se pueden co-transfeccionar en vectores de expresión individual o estar contenidos en un único vector de expresión. Dichas técnicas de expresión de múltiples componentes de complejos proteicos son bien conocidas en la técnica.

- 20 Se puede introducir un vector de expresión en células huésped usando varias técnicas estándar, incluidas transfección de fosfato cálcico, transfección mediada por liposomas, liberación mediada por microproyectil, electroporación y similares. Las células transfeccionadas se pueden seleccionar y propagar para proporcionar células huésped recombinantes que comprenden el vector de expresión integrado de forma estable en el genoma de la célula huésped. Técnicas para introducir vectores en células eucarióticas y técnicas para seleccionar dichos transformantes estables usando un marcador seleccionable dominante se describen en, por ejemplo, Ausubel (1995) y Murray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991).

- 25 Por ejemplo, un marcador seleccionable adecuado es un gen que proporciona resistencia al antibiótico neomicina. En este caso, la selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-148 o similares. También se pueden usar sistemas de selección para incrementar el nivel del gen de interés, un procedimiento denominado "amplificación". La amplificación se lleva a cabo cultivando transfectantes en presencia de un nivel bajo del agente selectivo y, después, incrementando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que produzcan niveles altos de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable adecuado es la dihidrofolato reductasa (DHFR), que confiere resistencia al metotrexato. También se pueden usar otros genes de resistencia a fármacos (p. ej., resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puomicina acetiltransferasa). Como alternativa, se pueden usar marcadores que introducen un fenotipo alterado, tal como la proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, fosfatasa alcalina placentaria del MHC clase I, para distinguir las células transfeccionadas de las células no transfeccionadas por medios tales como clasificación con FACS o tecnología de separación con perlas magnéticas.

- 30 Los polipéptidos de *zB7R1* también se pueden producir mediante células de mamífero cultivadas usando un sistema de liberación viral. Ejemplos de virus para este fin incluyen adenovirus, retrovirus, herpesvirus, virus vaccinia y virus adenoasociados (VAA). Actualmente, el adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es el vector de transferencia génica mejor estudiado para la liberación de ácido nucleico heterólogo (para una revisión, véase Becker y col., Meth. Cell Biol. 43:161 (1994), y Douglas y Curiel, Science & Medicine 4:44 (1997)). Las ventajas del sistema de adenovirus incluyen la acomodación de insertos de ADN relativamente grandes, la capacidad para crecer a un título elevado, la capacidad para infectar un amplio abanico de tipos de células de mamíferos y la flexibilidad que permite el uso con un gran número de vectores disponibles que contienen diferentes promotores.

- 35 Delecionando porciones del genoma del adenovirus se pueden acomodar insertos más grandes (de hasta 7 kb) de ADN heterólogo. Estos insertos se pueden incorporar en el ADN viral mediante unión directa o mediante recombinación homóloga con un plásmido cotransfeccionado. Una opción es delecionar el gen E1 esencial del vector viral, lo que tiene como resultado la incapacidad para replicarse a menos que la célula huésped proporcione

el gen E1. Células 293 humanas infectadas por un vector de adenovirus (n° ATCC CRL-1573, 45504, 45505), se pueden cultivar como células de adhesión o en cultivo de suspensión a una densidad celular relativamente alta para producir cantidades significativas de proteína (véase Garnier y col., Cytotechnol. 15:145 (1994)).

5 zB7R1 o CD155 también se pueden expresar en otras células eucarióticas superiores, tales como células de ave, fúngicas, de insecto, de levadura o vegetales. El sistema de baculovirus proporciona un medio eficiente para introducir genes clonados de zB7R1 en células de insecto. Los vectores de expresión adecuados se basan en el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y contienen promotores bien conocidos, tales como el promotor 70 de la *proteína del shock térmico de Drosophila* (*hsp*), el promotor del gen *temprano-inmediato* (*ie-1*) y el promotor *temprano retardado de 39K* del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*, el promotor del baculovirus *p10* y el promotor de la *metalotioneína de Drosophila*. Un segundo procedimiento para fabricar baculovirus recombinantes usa un sistema basado en transposones descrito por Luckow (Luckow, y col., J. Virol. 67:4566 (1993)). Este sistema, que usa vectores de transferencia, se comercializa en el kit BAC-to-BAC (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema usa un vector de transferencia PFASTBAC (Life Technologies) que contiene un transposón Tn7 para mover el ADN que codifica el polipéptido zB7R1 en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande denominado "bácmido". Véase, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71:971 (1990), Bonning, y col., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994), y Chazenbalk, y Rapoport, J. Biol. Chem. 270: 1543 (1995). Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión dentro del marco con ADN que codifica un marcador de epítipo en el extremo C o N del polipéptido de zB7R1 expresado, por ejemplo un marcador de epítipo Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. 82:7952 (1985)). Usando una técnica conocida en la materia, un vector de transferencia que contiene un gen de zB7R1 se transforma en *E. coli* y se somete a detección selectiva de bácmidos que contienen un gen *lacZ* interrumpido indicativo de baculovirus recombinantes. El ADN del bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante se aísla después usando técnicas habituales.

25 El vector PFASTBAC ilustrativo se puede modificar hasta un grado considerable. Por ejemplo, el promotor de polihedrina se puede eliminar y sustituir con el promotor de la proteína básica de baculovirus (también conocido como *Pcor*, p6.9 o promotor MP) que se expresa antes en la infección por baculovirus y se ha demostrado que es ventajoso para expresar proteínas secretadas (véase, por ejemplo, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71:971 (1990), Bonning, y col., J. Gen. Virol. 75:1551 (1994), y Chazenbalk, y Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543 (1995). En dichos constructos de vectores de transferencia se puede usar una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, se pueden construir vectores de transferencia que sustituyen a las secuencias señal secretoras de zB7R1 nativas con secuencias señal secretoras derivadas de proteínas de insecto. Por ejemplo, una secuencia señal secretora de ecdiesteroido glucosiltransferasa (EGT), melitina de miel de abeja (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA) o gp67 de baculovirus (PharMingen; San Diego, CA) se puede usar en constructos para reemplazar la secuencia señal secretora de zB7R1 nativa.

35 El virus recombinante o bácmido se usa para transfeccionar las células huésped. Células huésped de insecto adecuadas incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-Sf-21, una línea de células de ovario pupal de *Spodoptera frugiperda*, tal como Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE y Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila* y la línea celular HIGH FIVEO (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (patente de EE.UU. n° 5.300.435). Para cultivar y mantener las células se pueden usar medios sin suero disponibles comercialmente. Medios adecuados son Sf900 II™ (Life Technologies) o ESF 921™ (Expression Systems) para las células Sf9; y Ex-cellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO™ (Life Technologies) para los linfocitos T. ni. Cuando se usan virus recombinantes, las células normalmente se cultivan desde una densidad de inoculación de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células hasta una densidad de $1,2 \times 10^6$ células, momento en el cual se añade una reserva de virus recombinante a una multiplicidad de infección (MDI) de 0,1 a 10, más habitualmente cerca de 3.

50 En Bailey y col., "Manipulation of Baculovirus Vectors," in *Methods in Molecular Biology*, Volumen 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed.), páginas 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), Patel y col., "The baculovirus expression system," en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover y col. (eds.), páginas 205-244 (Oxford University Press 1995), Ausubel (1995) en las páginas 16-37 to 16-57, Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995), y Lucknow, "Insect Cell Expression Technology," en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y col. (eds.), páginas 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) se proporcionan técnicas establecidas para producir proteínas recombinantes en sistemas de baculovirus.

55 También se pueden usar células fúngicas, incluidas células de levadura, para expresar los genes descritos en el presente documento. Especies de levaduras de interés concreto a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Promotores adecuados para expresión en levaduras incluyen promotores de *GAL1* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato quinasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *AOX1* (alcohol oxidasa), *HIS4* (histidinol deshidrogenasa) y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levaduras y están disponibles fácilmente. Estos vectores incluyen vectores basados en Ylp, tal como Ylp5, vectores YRp, tal como YRp17, vectores YEp, tal como YEp1, y vectores YCp, tal como YCp19. Procedimientos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes del mismo se divulgan en, por ejemplo, Kawasaki, patente de EE.UU. n° 4.599.311, Kawasaki y col., patente de EE.UU. n° 4.931.373, Brake, patente de EE.UU. n° 4.870.008, Welch y col., patente de EE.UU. n° 5.037.743, y Murray y col., patente de EE.UU.

nº 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado mediante el marcador seleccionable, habitualmente mediante resistencia a un fármaco o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente concreto (p. ej., leucina). Un sistema de vector adecuado para usar en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector *POT1* divulgado por Kawasaki y col. (patente de EE.UU. nº 4.931.373), que permite seleccionar las células transformadas según el crecimiento en medios que contienen glucosa. Promotores y terminadores adecuados adicionales para usar en levaduras incluyen los de los genes de las enzimas glicolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, patente de EE.UU. nº 4.599.311, Kingsman y col., , patente de EE.UU. nº 4.615.974 y Bitter, , patente de EE.UU. nº 4.977.092) y los genes de la alcohol deshidrogenasa. Véase también las patentes de EE.UU. nº 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454.

En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, incluidas *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véase, por ejemplo, Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. 132:3459 (1986) y Cregg, patente de EE.UU. nº 4.882.279. Se pueden usar células de *Aspergillus* de acuerdo con los procedimientos de McKnight y col., patente de EE.UU. nº 4.935.349. Sumino y col., patente de EE.UU. nº 5.162.228 divulgan procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum*. Lambowitz, patente de EE.UU. nº 4.486.533 divulgan procedimientos para transformar *Neurospora*.

Por ejemplo, el uso de *Pichia methanolica* como huésped para la producción de proteínas recombinantes se divulga en Raymond, patente de EE.UU. nº 5.716.808, Raymond, patente de EE.UU. nº 5.736.383, Raymond y col., Yeast 14:11-23 (1998), y en las publicaciones internacionales nº WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, y WO 98/02565. Normalmente, las moléculas de ADN para usar en la transformación de *P. methanolica* se prepararán como plásmidos circulares bicatenarios que, preferentemente, se linealizan antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolica*, el promotor y el terminador en el plásmido pueden ser los del gen de *P. methanolica*, tal como un gen de uso de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma del huésped se prefiere que todo el segmento de expresión del plásmido esté flanqueado en ambos extremos por secuencias del ADN del huésped. Un marcador seleccionable adecuado para usar en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *P. methanolica*, que codifica la fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), y que permite que las células huésped *ade2* crezcan en ausencia de adenina. Para los procesos industriales a gran escala en los que es deseable minimizar el uso de metanol se pueden usar células huésped en las que se haya delecionado ambos genes de uso de metanol (*AUG1* y *AUG2*). Para la producción de proteínas secretadas, las células huésped pueden ser deficientes en los genes de la proteasa vacuolar (*PEP4* y *PRB1*). Se usa electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolica*. Las células de *P. methanolica* se pueden transformar mediante electroporación usando un campo eléctrico pulsado en decadencia exponencial que tiene una fuerza de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferentemente aproximadamente 3,75 kV/cm y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, más preferentemente aproximadamente 20 milisegundos.

También se pueden introducir vectores de expresión en protoplastos vegetales, tejidos vegetales intactos o células vegetales aisladas. Procedimientos para introducir vectores de expresión en tejido vegetal incluyen infección directa o cocultivo del tejido vegetal con *Agrobacterium tumefaciens*, liberación mediada por microproyectiles, inyección de ADN, electroporación y similares. Véase, por ejemplo, Horschet y col., Science 227:1229 (1985), Klein y col., Biotechnology 10:268 (1992) y Miki y col., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants," en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick y col. (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

Como alternativa se pueden expresar genes de *zB7R1* en células huésped procariotas. Promotores adecuados que se pueden usar para expresar polipéptidos de *zB7R1* en una célula huésped procariota son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen promotores capaces de reconocer las polimerasas de T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P_R y P_L del bacteriófago lambda, los promotores *trp*, *recA*, del shock térmico, *lacUV5*, *tac*, *lpp-lacSpr*, *phoA* y *lacZ* del *E. coli*, promotores de *B. subtilis*, promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, promotores de *Streptomyces*, el promotor *int* del bacteriófago lambda, el promotor *bla* de of pBR322 y el promotor CAT del gen de la cloranfenicol acetiltransferasa. Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277 (1987), Watson y col., Molecular Biology of the Gene, 4ª Ed. (Benjamin Cummins 1987), y Ausubel y col. (1995) han revisado los promotores procariotas.

Huéspedes procariotas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Cepas adecuadas de *E. coli* incluyen BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF⁺, DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, y ER1647 (véase, por ejemplo, Brown (ed.), Molecular Biology Labfax (Academic Press 1991)). Cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120 y B170 (véase, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods," en DNA Cloning: A Practical Approach, Glover (ed.) (IRL Press 1985)).

Cuando se expresa un polipéptido *zB7R1* en bacterias como *E. coli*, el polipéptido puede quedar retenido en el citoplasma, normalmente como gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico a través de una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan y los gránulos se recuperan y desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. Después, el polipéptido desnaturalizado se puede volver a plegar y dimerizar diluyendo el desnaturalizante, como mediante diálisis contra una solución de urea

y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguida de diálisis contra una solución salina tamponada. En el último caso, el polipéptido se puede recuperar del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo las células (mediante, por ejemplo, ultrasonidos o shock osmótico) para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando de este modo la necesidad de desnaturalizar o replegar.

- 5 Procedimientos para expresar proteínas en huéspedes procariotas son bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Williams y col., "Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición, Glover y col. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995), Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995), y Georgiou, "Expression of
10 Proteins in Bacteria," en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), página 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Por ejemplo, Ausubel (1995) proporciona procedimientos generales para introducir vectores de expresión en células bacterianas, levaduras, insectos y vegetales.

- 15 Procedimientos generales para expresar y recuperar proteínas extrañas producidas por un sistema de células de mamífero se proporcionan en, por ejemplo, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," in Protein Engineering Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), página 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). En, por ejemplo, Grisshammer y col., "Purification of overproduced proteins from E. coli cells," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición, Glover y col. (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995) se proporcionan técnicas estándar para recuperar proteínas producidas por un sistema bacteriano. Richardson (ed.), Baculovirus
20 Expression Protocols (The Humana Press, Inc. 1995) describen procedimientos establecidos para aislar proteínas recombinantes de un sistema baculovirus.

- Como alternativa, se pueden sintetizar polipéptidos mediante síntesis exclusiva en fase sólida, procedimientos de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis clásica en solución. Estos procedimientos de síntesis son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963),
25 Stewart y col., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2ª Edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, Chem. Pept. Prot. 3:3 (1986), Atherton y col., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press 1989), Fields y Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis," Methods in Enzymology Volumen 289 (Academic Press 1997), y Lloyd-Williamsetal., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (CRC Press, Inc. 1997)). También son convencionales las variaciones en las estrategias de síntesis química total, tal como "unión química nativa" y "unión
30 de proteínas expresadas" (véase, por ejemplo, Dawson y col., Science 266:776 (1994), Hackeng y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287: 34 (1997), Muir y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:6705 (1998) y Severinov y Muir, J. Biol. Chem. 273:16205 (1998)).

- Los péptidos y polipéptidos descritos en el presente documento comprenden al menos seis, al menos nueve o al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 2. Como ilustración, los polipéptidos pueden comprender al menos seis, al menos nueve o al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 2. En ciertas realizaciones, los polipéptidos comprenden 20, 30, 40, 50, 100, o más residuos contiguos de estas secuencias de aminoácidos. Las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos péptidos y polipéptidos son útiles como cebadores y sondas para la reacción en cadena de la polimerasa.
35

- Además, los polipéptidos de zB7R1 o CD155 y fragmentos de los mismos se pueden expresar como monómeros, homodímeros, heterodímeros, tetrámeros (que se tratan más adelante) o multímeros dentro de células eucariotas superiores. Dichas células se pueden usar para producir polipéptidos receptores zB7R1 o CD155 monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos, tetraméricos y multiméricos que comprenden al menos un polipéptido zB7R1 o CD155 ("receptores zB7R1 o CD 155", "polipéptidos receptores que comprenden zB7R1", "receptores que comprenden CD155" o "polipéptidos receptores que comprenden CD155") o se pueden usar como células de ensayo en sistemas de detección selectiva. En un aspecto de la presente invención se produce un polipéptido que comprende el dominio extracelular de zB7R1 (SEC ID N° 3 O 7) mediante cultivo celular y la célula se usa para detectar de forma selectiva contrarreceptores para el receptor, incluido un contrarreceptor natural, así como agonistas y antagonistas del contrarreceptor natural. Para resumir este enfoque, un ADNc o gen que codifica el receptor se combina con otros elementos genéticos requeridos para su expresión (p. ej., un promotor de la transcripción) y el vector de expresión resultante se inserta en una célula huésped. Las células que expresan el ADN y producen el receptor funcional se seleccionan y se usan dentro de diversos sistemas de detección selectiva. Cada componente del complejo receptor monomérico, homodimérico, heterodimérico y multimérico se puede expresar en la misma célula. Además, los componentes del complejo receptor monomérico, homodimérico, heterodimérico y multimérico también se pueden condensar con un dominio transmembranal u otro resto de fusión de membrana para permitir el ensamblaje del complejo y realizar la detección selectiva de transfectantes, tal como se ha descrito con anterioridad.
50
55

6. Polinucleótidos tetraméricos de zB7R1 y CD155, polipéptidos y procedimientos de fabricación de los mismos

La presente memoria descriptiva describe procedimientos de producir un polipéptido multimérico, preferentemente tetramérico, de zB7R1 o CD155. Estas proteínas se describen con más detalle en la solicitud de patente provisional

de EE.UU. N° 60/60/791,626, presentada el 13 de abril de 2006 e incorporada en el presente documento en su totalidad. Estas proteínas de fusión comprenden un dominio VASP y un dominio de proteína heteróloga, tal como zB7R1 o CD155. Los dominios VASP derivan del gen VASP presente en muchas especies. Las secuencias se seleccionan según su capacidad prevista para formar una estructura de proteína en hélice superenrollada, ya que esta estructura es importante por la capacidad para formar formas de proteínas multiméricas. Particularmente deseada para la presente invención es la capacidad de las proteínas en hélice superenrollada para producir estructuras de proteínas tetraméricas. Una realización particularmente preferida usa los aminoácidos 343 a 376 de la secuencia del VASP humano (aminoácidos 5 a 38 de la SEC ID N° 23). La secuencia de ADN de longitud completa de esta proteína es la SEC ID N° 24 y la secuencia del polipéptido de longitud completa de esta proteína es la SEC ID N° 25.

Trabajos con otros tipos de multimerización de secuencias, por ejemplo la cremallera de leucina, han mostrado que a menudo se puede tolerar un número limitado de sustituciones conservadoras de aminoácidos (incluso en el residuo d) en secuencias cremallera sin perder la capacidad de las moléculas para multimerizar (Landschultz y col., (1989), *supra*). Por tanto, dentro del alcance de la invención se contemplan los cambios conservadores con respecto a la secuencia nativa para el dominio VASP. En la Tabla 4 se muestran los cambios conservadores que se prevé que serán tolerados por la estructura en hélice superenrollada.

Tabla 4

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Básicos	arginina	Aromáticos:	fenilalanina
	lisina		triptófano
	histidina		tirosina
Ácidos	ácido glutámico	Pequeños:	glicina
	ácido aspártico		alanina
Polares:	glutamina		serina
	asparagina		treonina
Hidrófobos	leucina		metionina
	isoleucina		
	valina		
	metionina		

Si se usa más de una proteína de fusión para producir proteínas hetero-multidiméricas, por ejemplo heterotetrámeros, el dominio VASP que se usa puede ser el mismo dominio para ambas proteínas de fusión o diferentes dominios VASP, siempre que los dominios tengan la capacidad de asociarse entre sí y formar proteínas multiméricas.

El dominio VASP puede introducirse en cualquiera de los extremos N o C de la proteína heteróloga de interés, en base a consideraciones de la función (es decir, si la proteína heteróloga es una proteína de membrana de tipo I o de tipo II) y facilidad de construcción del constructo. Adicionalmente, el dominio VASP puede estar localizado en el medio de la proteína, creando de forma eficaz una proteína de fusión doble con una secuencia heteróloga, un dominio VASP, y una segunda secuencia heteróloga. Las dos secuencias heterólogas de la proteína de fusión doble pueden ser iguales o diferentes.

Específicamente, zB7R1 o CD155 pueden unirse directamente a otra proteína para formar una proteína de fusión; como alternativa, las proteínas pueden estar separadas por una distancia suficiente para asegurar que las proteínas forman una estructura secundaria y terciaria adecuada necesaria para la actividad biológica. Secuencias ligadoras adecuadas adaptarán una conformación extendida flexible y no exhibirán propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que podría interactuar con los dominios de función de las proteínas de fusión y tendrán un carácter hidrofóbico o cargado mínimo que podría también interferir en la función de los dominios de fusión. Las secuencias ligadoras deberán construirse teniendo en mente la repetición de 15 residuos y es posible que no sea lo mejor producir una proteína biológicamente activa constreñir mucho el extremo N o C de la secuencia heteróloga. Más allá de estas consideraciones, la longitud de la secuencia ligadora puede variar sin que ello afecte

significativamente a la actividad biológica de la proteína de fusión. Las secuencias ligadoras pueden usarse entre todos y cada uno de los componentes de la proteína de fusión (o constructo de expresión), incluidos marcadores de afinidad y péptidos señales. Un ejemplo de ligador es la secuencia GSGG (SEC ID N° 26).

5 Otro componente de la proteína de fusión puede ser un marcador de afinidad. Dichos marcadores no alteran la actividad biológica de las proteínas de fusión, son altamente antigénicas y proporcionan un epítipo que pueden unirse de forma reversible mediante una molécula de unión específica. Tal como un anticuerpo monoclonal, lo que permite la detección y purificación de una proteína de fusión expresada. Los marcadores de afinidad también pueden portar resistencia a la degradación intracelular si las proteínas se producen en bacterias, como *E. coli*. Un ejemplo de marcador es el marcador FLAG (SEC ID N° 27) o el marcador HIS₆ (SEC ID N° 28). En la patente de EE.UU. n° 5.011.912 se describen procedimientos de producción de proteínas de fusión usando este marcador de afinidad para purificación.

10 Otro componente adicional de la proteína de fusión puede ser una secuencia señal o secuencia líder. En general, estas secuencias se usan para permitir la secreción de la proteína de fusión de la célula huésped durante la expresión y también se conocen como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre. La secuencia señal secretora puede ser la de la proteína heteróloga que se está produciendo, si tiene dicha secuencia, o puede derivar de otra proteína secretada (p. ej., t-PA) o sintetizada *de novo*. La secuencia señal secretora está unida operablemente a la secuencia de ADN de la proteína de fusión, es decir las dos secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y colocados para dirigir el polipéptido recién sintetizado en la vía secretora de la célula huésped. Las secuencias señal secretoras normalmente están en posición 5' de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal pueden estar colocadas en otros puntos de la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch y col., patente de EE.UU. n° 5.037.743; Holland y col., patente de EE.UU. n° 5.143.830).

15 Por tanto, las composiciones de ácido nucleico encuentran utilidad en la preparación de todo o una porción de las proteínas de fusión VASP-zB7R1 o VASP-CD155, como se ha descrito con anterioridad. Los polinucleótidos sujeto (incluido el ADNc o el gen de longitud completa) se pueden usar para expresar un producto génico parcial o completo. Los constructos que comprenden los polinucleótidos sujeto pueden generarse sintéticamente. Como alternativa, en Stemmer y col., *Gene (Amsterdam)* (1995) 164(1):49-53 se describe un ensamblaje en una sola etapa de un gen y un plásmido completo de gran número de oligodesoxirribonucleótidos. En este procedimiento se describe una PCR de ensamblaje (la síntesis de secuencias de ADN largas a partir de un número grande de oligodesoxirribonucleótidos (oligos). El procedimiento deriva de la reestructuración de ADN (Stemmer, *Nature* (1994) 370:389-391) y no depende de la ADN ligasa, sino que reside en la ADN polimerasa para construir fragmentos de ADN cada vez más largos durante el proceso de ensamblaje. Constructos de polinucleótidos adecuados se purifican usando técnicas de ADN recombinante estándar como se describe en, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., y en las normas actuales descritas en el Dept. de Estados Unidos del HHS, National Institute of Health (NIH), *Guidelines for Recombinant DNA Research*.

20 Las moléculas de polinucleótidos que comprenden una secuencia polinucleotídica proporcionada en la presente memoria descriptiva se propagan introduciendo la molécula en un vector. Se usan vectores virales y no virales, incluidos plásmidos. La elección del plásmido dependerá del tipo de célula en la que se desea la propagación y el fin de la propagación. Ciertos vectores son útiles para amplificar y fabricar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión en células en cultivo. Otros vectores más son adecuados para la transferencia y expresión en células en un animal o persona completo. La elección del vector adecuado está dentro de la habilidad de la técnica. Muchos de estos vectores están disponibles comercialmente. El polinucleótido parcial o de longitud completa se inserta en un vector normalmente por medio de unión a través de la DN ligasa a un sitio producido mediante escisión con una enzima de restricción en el vector. Como alternativa, la secuencia nucleotídica deseada se puede insertar mediante recombinación homóloga *in vivo*. Normalmente, esto se consigue uniendo regiones de homología con el vector en los flancos de la secuencia nucleotídica deseada. Las regiones de homología se añaden mediante unión de oligonucleótidos o mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprendan tanto la región de homología como una porción de la secuencia de nucleótidos deseada, por ejemplo.

25 Para la expresión se puede emplear un casete o sistema de expresión. El producto génico codificado por un polinucleótido de la invención se expresa en cualquier sistema de expresión conveniente, incluidos, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levaduras, de insectos, de anfibios y de mamíferos. En la patente de EE.UU. n° 5.654.173 se describen vectores y células huésped adecuados. En el vector de expresión, la proteína heteróloga que codifica polinucleótidos (tal como el dominio extracelular de zB7R1; es decir la SEC ID N° 3 O 7) está unida a una secuencia reguladora según sea adecuado para obtener las propiedades de expresión deseadas. Estos pueden incluir promotores (unidos en el extremo 5' de la hebra sentido o en el extremo 3' de la hebra antisentido), potenciadores, terminadores, operadores, represores e inductores. Los promotores pueden estar regulados o ser constitutivos. En algunas situaciones, puede ser deseable usar promotores activos condicionalmente, tales como promotores específicos de tejido o específicos del estadio de desarrollo. Estos se unen a la secuencia de nucleótidos deseada usando las técnicas descritas anteriormente para la unión a vectores. Se puede usar cualquier técnica conocida en la materia. En otras palabras, el vector de expresión proporcionará una región de inicio de la transcripción y la

traducción, que puede ser inducible o constitutiva, en la que la región codificadora esté unida operablemente bajo el control de la transcripción de la región de inicio de la transcripción, y una región de terminación de la transcripción y la traducción. Estas regiones control pueden ser nativas para el ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga-VASP o pueden derivar de fuentes exógenas.

- 5 En general, los vectores de expresión tienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas heterólogas. Puede haber presente un marcador seleccionable operativo en el huésped de expresión. Los vectores de expresión pueden usarse para la producción de proteínas de fusión, en las que el péptido de fusión exógeno proporciona una funcionalidad adicional, es decir mayor síntesis de proteínas, estabilidad, reactividad con antisueros definidos, un
10 marcador enzimático, p. ej., β -galactosidasa, etc.

Los casetes de expresión se pueden preparar de modo que comprendan una región de inicio de la transcripción, el gen o fragmento del mismo, y una región de terminación de la transcripción. De interés concreto es el uso de secuencias que permitan la expresión de epítomos o dominios funcionales, normalmente de una longitud de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, más normalmente de una longitud de al menos aproximadamente 15
15 aminoácidos, a aproximadamente 25 aminoácidos y hasta el marco de lectura abierto completo del gen. Tras la introducción del ADN, las células que contienen el constructo se pueden seleccionar por medio de un marcador seleccionable, se expanden las células y, después, se usan para expresión.

Las proteínas de fusión heterólogas-VASP se pueden expresar en procariontes o eucariontes de acuerdo con formas convencionales, en función del propósito de la expresión. Para la producción a gran escala de la proteína se puede
20 usar un organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de insecto en combinación con vectores baculovirus, o células de un organismo superior, tal como vertebrados, en particular mamíferos, por ejemplo células COS 7, HEK 293, CHO, oocitos de *Xenopus* etc., como células huésped para la expresión. En algunas situaciones, es deseable expresar una molécula de ácido nucleico VASP polimórfica en células eucariontes, en las que la proteína VASP polimórfica se beneficiará del plegamiento nativo y de las modificaciones
25 postraduccionales. También se pueden sintetizar péptidos pequeños en el laboratorio. Los polipéptidos que son subpoblaciones de la secuencia completa de VASP se pueden usar para identificar e investigar partes de la proteína importante para la función.

Sistemas de expresión específicos de interés incluyen sistemas de expresión células bacterianas, de levaduras, de insectos y de mamíferos. Sistemas representativos de cada una de estas características se proporcionan a
30 continuación. Bacterias. Sistemas de expresión en bacterias incluyen los descritos en Chang y col., *Nature* (1978) 275:615; Goeddel y col., *Nature* (1979) 281: 544; Goeddel y col., *Nucleic Acids Res.* (1980) 8:4057; el documento EP 0 036,776; la patente de EE.UU. nº 4.551.433; DeBoer y co., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1983) 80:21-25; y Siebenlist y col., *Cell* (1980) 20:269. Levaduras. Sistemas de expresión en levaduras incluyen los descritos en Hinnen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1978) 75:1929; Ito y col., *J. Bacteriol.* (1983) 153:163; Kurtz y col., *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:142; Kunze y col., *J. Basic Microbiol.* (1985)25:141; Gleeson y col., *J. Gen. Microbiol.* (1986) 132:3459; Roggenkamp y col., *Mol. Gen. Genet.* (1986) 202:302; Das y col., *J. Bacteriol.* (1984) 158:1165; De
35 Louvencourt y col., *J. Bacteriol.* (1983) 154:737; Van den Berg y col., *Bio/Technology* (1990)8:135; Kunze y col., *J. Basic Microbiol.* (1985)25:141; Cregg y col., *Mol. Cell. Biol.* (1985) 5:3376; las patentes de EE.UU. nº 4.837.148 y 4.929.555; Beach y Nurse, *Nature* (1981) 300:706; Davidow y col., *Curr. Genet.* (1985) 10:380; Gaillardin y col., *Curr. Genet.* (1985) 10: 49; Ballance y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) 112:284-289; Tilburn y col., *Gene* (1983) 26:205-221; Yelton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:1470-1474; Kelly y Hynes, *EMBO J.* (1985) 4:475479; el documento EP 0 244,234; y el documento WO 91/00357. Células de insecto. La expresión de genes heterólogos en insectos se consigue como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.745.051; Friesen y col., "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", en: *The Molecular Biology Of Baculoviruses* (1986) (W. Doerfler, ed.);
45 el documento EP 0 127,839; el documento EP 0 155,476; y Vlak y col., *J. Gen. Virol.* (1988) 69:765-776; Miller y col., *Ann. Rev. Microbiol.* (1988) 42:177; Carbonell y col., *Gene* (1988) 73:409; Maeda y col., *Nature* (1985) 315: 592-594; Lebacqz-Verheyden y col., *Mol. Cell. Biol.* (1988) 8:3129; Smith y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1985) 82: 8844; Miyajima y col., *Gene* (1987) 58:273; y Martin y col., *DNA* (1988) 7:99. Numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permitidas de los huéspedes se describen en Luckow y col., *Bio/Technology* (1988) 6: 47-55, Miller y col., *Generic Engineering* (1986) 8:277-279, y Maeda y col., *Nature* (1985) 315:592-594. Células de mamífero. La expresión en mamíferos se consigue tal como se describe en Dijkema y col., *EMBO J.* (1985) 4:761, Gorman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:6777, Boshart y col., *Cell* (1985) 41:521 y la patente de EE.UU. nº 4.399.216. Otras características de la expresión en mamíferos se facilitan como se describe en Ham y Wallace, *Meth. Enz.* (1979) 58:44, Barnes y Sato, *Anal. Biochem.* (1980) 102:255, las patentes
50 de EE.UU. nº 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, los documentos WO 90/103430, WO 87/00195 y la patente de EE.UU. nº RE 30.985

Cuando cualquiera de las células huésped anteriores, u otras células u organismos huésped adecuados, se usan para replicar y/o expresar polinucleótidos o ácidos nucleicos, el ácido nucleico, ARN replicado, proteína o polipéptido expresado resultante es un producto del organismo o célula huésped. El producto se recupera por cualquier medio
60 adecuado conocido en la técnica.

Una vez que se identifica el gen correspondiente a un polinucleótido seleccionado, su expresión se puede regular en la célula para la que el gen es nativo. Por ejemplo, un gen endógeno de una célula se puede regular mediante una secuencia reguladora exógena insertada en el genoma de la célula en un lugar suficiente para al menos potenciar la expresión del gen en la célula. La secuencia reguladora puede estar diseñada para integrarse en el genoma mediante recombinación homóloga, tal como se ha divulgado en las patentes de EE.UU. nº 5.641.670 y 5.733.761, o puede estar diseñada para integrarse en el genoma mediante recombinación no homóloga, como se describe en el documento WO 99/15650.

La memoria descriptiva describe vectores recombinantes u células huésped que comprenden polinucleótidos. En general, se aíslan los vectores recombinantes y las células huésped de la invención; no obstante, una célula huésped que comprende un polinucleótido de la invención puede ser parte de un animal modificado genéticamente.

5 La presente memoria descriptiva describe vectores recombinantes ("constructos" que comprenden un polinucleótido. Vectores recombinantes incluyen vectores usados para la propagación de un polinucleótido de la invención y vectores de expresión. Vectores útiles para la introducción del polinucleótido incluyen plásmidos y vectores virales, por ejemplo vectores basados en retrovirus, vectores adenovirus etc., que se mantienen transitoria o establemente en células de mamífero. Se puede emplear una amplia variedad de vectores para la transfección y/o integración del gen en el genoma de las células. Como alternativa se puede emplear microinyección, fusión o similar para la introducción de genes en una célula huésped adecuada.

10 En general, los vectores de expresión tienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas heterólogas. Puede haber presente un marcador seleccionable operativo en el huésped de expresión. Los vectores de expresión pueden usarse para la producción de proteínas de fusión, en las que el péptido de fusión exógeno proporciona una funcionalidad adicional, es decir mayor síntesis de proteínas, estabilidad, reactividad con antisueros definidos, un marcador enzimático, p. ej., β -galactosidasa, etc.

15 Los casetes de expresión se pueden preparar de modo que comprendan una región de inicio de la transcripción, el gen o fragmento del mismo, y una región de terminación de la transcripción. De interés concreto es el uso de secuencias que permitan la expresión de epítopos o dominios funcionales, normalmente de una longitud de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, más normalmente de una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos, al menos aproximadamente 45 aminoácidos y hasta el marco de lectura abierto completo del gen. Tras la introducción del ADN, las células que contienen el constructo se pueden seleccionar por medio de un marcador seleccionable, se expanden las células y, después, se usan para expresión.

20 Los casetes de expresión se pueden introducir en diversos vectores, por ejemplo, plásmidos, BAC, YAC, bacteriófagos tal como lambda, P1, M13, etc., virus animales o vegetales y similares, en los que los vectores normalmente se caracterizan por la capacidad para proporcionar la selección de células que comprenden los vectores de expresión. Los vectores pueden proporcionar mantenimiento extracromosómico, particularmente como plásmidos o virus, o la integración en el cromosoma huésped. Cuando se desea mantenimiento extracromosómico se proporciona una secuencia de origen para la replicación del plásmido, que puede ser un número de copias bajo o alto. Se dispone de una amplia variedad de marcadores para selección, en particular aquéllos que protegen contra toxinas, más particularmente contra antibióticos. El marcador concreto que se escoja se selecciona de acuerdo con la naturaleza del huésped, en el que, en algunos casos, se puede emplear complementación con huéspedes auxótrofos. La introducción del constructo de ADN puede usar cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo conjugación, transformación bacteriana, ADN precipitado con calcio, electroporación, fusión, transfección, infección con vectores virales, biolística, etc.

25 La presente invención proporciona además células huésped que pueden ser células huésped aisladas, que comprenden moléculas de ácido nucleico VASO polimórficas de la invención. Células huésped adecuadas incluyen procariotas, tales como *E. coli*, *B. subtilis*, eucariotas, incluidas células de insecto en combinación con vectores baculovirus, células de levaduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, o células de un organismo superior, tal como vertebrados, incluidos anfibios (p. ej., oocitos de *Xenopus laevis*) y mamíferos, en particular seres humanos, por ejemplo células COS, células CHO, células HEK 293, y similares, que pueden usarse las células huésped. Las células huésped se pueden usar para los fines de propagar una molécula de ácido nucleico VASP polimórfica, para la producción de un polipéptido VASP polimórfico o en procedimientos basados en células para identificar agentes que modulan un nivel de ARNm de VASP y/o proteína y/o actividad biológica en una célula.

30 Las células primarias o clonadas y las líneas celulares se pueden modificar mediante la introducción de vectores que comprenden un ADN que codifica el(los) polimorfismo(s) de la proteína de fusión heteróloga-VASP. La molécula de ácido nucleico VASP polimórfica aislada puede comprender una o más secuencias variantes, por ejemplo un haplotipo de combinaciones que se producen habitualmente. En una realización de la invención, un panel de dos o más líneas celulares modificadas genéticamente, en la que cada línea celular comprende un polimorfismo VASP se proporciona para ensayos con sustrato y/o de expresión, El panel puede además comprender células modificadas genéticamente con otras secuencias genéticas, incluidos polimorfismos, particularmente otras secuencias de interés para detección selectiva farmacogenética, por ejemplo otros genes/mutaciones génicas asociadas con la obesidad,

una serie de los cuales se conoce en la técnica.

Los ácidos nucleicos objeto se pueden usar para generar animales no humanos modificados genéticamente o modificaciones génicas específicas de sitio en las líneas celulares. Con el término "transgénico" se pretenden abarcar animales modificados genéticamente que tienen la adición de ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga-VASP o que tiene un ADN exógeno que codifica la proteína de fusión heteróloga-VASP que se transmite de forma estable en las células huésped. Los animales transgénicos pueden fabricarse mediante recombinación homóloga. Como alternativa, un constructo de ácido nucleico se integra de forma aleatoria en el genoma. Los vectores para integración estable incluyen plásmidos, retrovirus y otros virus animales, YAC y similares, Mamíferos transgénicos de interés son, por ejemplo, vacas, cerdos, cabras, caballos, etc. y, particularmente, roedores, por ejemplo ratas, ratones etc.

Los constructos de ADN para recombinación homóloga comprenderán al menos una porción del ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga-VASP se incluirán regiones de homología con el locus diana. De forma conveniente se incluyen marcadores para selección positiva y negativa. En la técnica se conocen procedimientos para generar células que tienen modificaciones génicas diana a través de redominación homóloga. Para varias técnicas para transfeccionar células de mamífero, véase Known y col. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537.

Para células madre embrionarias (ME) se puede emplear una línea celular ME o se pueden obtener células ME frescas de un huésped, por ejemplo ratón, rata, cobaya, etc. Dichas células se cultivan en una capa alimentadora-fibroblastos adecuada o se cultivan en presencia del factor inhibidor de leucemia (LIF). Cuando las células SE ME han transformado, se pueden usar para producir animales transgénicos. Tras la transformación, las células se siembran en una capa de alimentación en un medio adecuado. Las células que contienen el constructo se pueden detectar empleando un medio selectivo. Transcurrido tiempo suficiente para que las colonias crezcan, se capturan y se analizan para detectar la aparición de recombinación homóloga. Las colonias que muestran recombinación homóloga pueden usarse después para manipulación embrionaria e inyección en blastocistos. Los blastocistos se obtienen de: hembras superovuladas de 4 a 6 semanas. Las células ME se digieren con tripsina y las células modificadas se inyectan en el blastocelo del blastocisto. Tras la inyección, los blastocistos se devuelven a cada cavidad uterina de hembras pseudopreñadas. Después, se deja que las hembras lleguen a término y las camadas resultantes se sometieron a detección selectiva de células mutantes que tengan el constructo. Proporcionando un fenotipo diferente del blastocisto y las células ME se puede detectar fácilmente la progenie quimérica. Los animales quiméricos se someten a detección selectiva para determinar la presencia del ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga-VASP y se aparean los machos y las hembras que tienen la modificación con el fin de producir una progenia homocigota. Los animales transgénicos pueden ser cualquier mamífero no humano, tal como animales de laboratorio, animales domésticos etc. Los animales transgénicos pueden usarse para determinar el efecto de un fármaco candidato en un entorno in vivo.

La presente memoria descriptiva proporciona un procedimiento de preparar una proteína soluble homo o heterotrimérica cultivando una célula huésped transformada o transfeccionada con al menos uno o hasta cuatro vectores de expresión diferentes que codifican una proteína de fusión que comprende un dominio VASP y una proteína heteróloga. Con el fin de producir una proteína funcional biológicamente, los cuatro dominios VASP forman, preferentemente, un homo o heterotetramero. El cultivo también se puede producir en la misma célula huésped, si se puede mantener una producción eficiente, y, después, se aíslan del medio las proteínas homo o heterotetraméricas. Lo ideal es que las cuatro proteínas heterólogas se marquen diferencialmente con diversas secuencias marcadoras (p. ej., marcador His, marcador FLAG y marcador Glu-Glu) para permitir el análisis de la composición o la purificación de las moléculas resultantes. Como alternativa, los cuatro componentes se pueden producir por separado y combinar en proporciones deliberadas para dar como resultado las moléculas heterotetraméricas deseadas. Los dominios VASP usados para fabricar estas moléculas heterotriméricas pueden ser iguales o diferentes y la(s) proteína(s) de fusión pueden además comprender una secuencia enlazadora. En una realización concreta, las proteínas heterólogas usadas para formar las proteínas homotetraméricas es el dominio soluble de zB7R1.

Un resultado del uso del dominio de tetramerización VASP descrito en el presente documento es la capacidad de incrementar la afinidad y la avidéz de la proteína heteróloga por su ligando o pareja de unión mediante la formación de la forma tetramérica. Por avidéz se quiere decir la fuerza de la unión de múltiples moléculas a una molécula más grande, una situación de ejemplo pero no limitada a la unión de un antígeno complejo por un anticuerpo. Dicha característica se mejoraría o formaría para muchas proteínas heterólogas mediante, por ejemplo, la formación de múltiples sitios de unión por su ligando o ligandos a través de la tetramerización del receptor heterólogo usando el dominio VASP. Por afinidad se quiere decir la fuerza de la unión de un simple sistema receptor-ligando. Dicha característica se mejoraría para una subpoblación de proteínas heterólogas usando el dominio de tetramerización de la presente invención formando, por ejemplo, un sitio de unión con mejores características de unión para un ligando sencillo a través de la tetramerización del receptor, La avidéz y la afinidad se pueden medir usando ensayos estándar bien conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo los procedimientos descritos en los ejemplos siguientes. Se produce una mejora en la afinidad o la avidéz cuando el valor de la afinidad o la avidéz (por ejemplo, la constante de afinidad o K_a) para la fusión de proteína heteróloga-dominio de tetramerización y su ligando es mayor que el valor para la proteína heteróloga sola y su ligando. Un medio alternativo de medir estas características es la constante de equilibrio (K_d) en la que se observe una disminución con la mejora de la afinidad y la avidéz

usando el dominio de tetramerización VASP de la presente invención.

La actividad biológica de las proteínas de fusión heteróloga-VASP recombinante está mediada por la unión de la proteína de fusión recombinante a una molécula afín, tal como un receptor o receptor cruzado. Una molécula afín se define como una molécula que se une a la proteína de fusión recombinante en una interacción no covalente en base a la conformación adecuada de la proteína de fusión recombinante y la molécula afín. Por ejemplo, para una proteína de fusión recombinante que comprende una región extracelular de un receptor, la molécula afín comprende un ligando que se une a la región extracelular del receptor. Por el contrario, para una proteína de fusión soluble recombinante que comprende un ligando, la molécula afín comprende un receptor (o proteína de unión) que se une al ligando.

La unión de una proteína de fusión recombinante a una molécula afín es un marcador de actividad biológica. Dicha actividad de unión se puede determinar mediante, por ejemplo, competición por la unión al dominio de unión de la molécula afín (es decir, ensayos de unión competitiva). Una configuración de un ensayo de unión competitiva para una proteína de fusión recombinante que comprende un ligando usa un receptor soluble radiomarcado y las células intactas que expresan una forma nativa del ligando. De forma similar, un ensayo de unión competitiva para una proteína de fusión recombinante que comprende un ligando usa un ligando soluble radiomarcado y las células intactas que expresan una forma nativa del receptor. Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 3. En lugar de las células intactas que expresan una forma nativa de la molécula afín, se podría sustituir la molécula afín purificada unida a una fase sólida. Los ensayos de unión competitiva se pueden realizar usando metodología estándar. Los resultados cualitativos o semicuantitativos se pueden obtener mediante ensayos de unión en placa autoradiográfica competitivos o clasificación de células activadas con fluorescencia, o se pueden usar gráficos de Scatchard para generar resultados cuantitativos.

La actividad biológica también se puede medir usando bioensayos conocidos en la técnica, tal como un ensayo de proliferación celular. Un ejemplo de bioensayo se describe en el Ejemplo 4. El tipo de ensayo de proliferación celular usado dependerá de la proteína de fusión soluble recombinante. Por ejemplo, un bioensayo para una proteína de fusión soluble recombinante que en su forma nativa actúa sobre los linfocitos T usará linfocitos T purificados obtenidos mediante los procedimientos conocidos en la técnica. Dichos bioensayos incluyen ensayos de coestimulación en los que los linfocitos T purificados se incuban en presencia de la proteína de fusión soluble recombinante y un nivel subóptimo de un mitógeno, tal como Con A o PHA. De forma similar, los linfocitos B purificados se usarán para una proteína de fusión soluble recombinante que en su forma nativa actúa sobre los linfocitos B. También se pueden seleccionar otros tipos de células en función del tipo de célula sobre la cual actúa la forma nativa de la proteína de fusión soluble recombinante. La proliferación se determina midiendo la incorporación de una sustancia radiomarcada, tal como timidina tritiada (^3H) de acuerdo con procedimientos estándar.

Otro tipo más de ensayo para determinar la actividad biológica es la inducción de la secreción de las moléculas secundarias. Por ejemplo, ciertas proteínas inducen secreción de citocinas por los linfocitos T. Los linfocitos T se purifican y estimulan con una proteína de fusión soluble recombinante en las condiciones necesarias para inducir la secreción de citocinas (por ejemplo, en presencia de un co-mitógeno). La inducción de secreción de citocinas se determina mediante bioensayo, midiendo la proliferación de una línea celular dependiente de citocinas. De forma similar, la inducción de secreción de inmunoglobulinas se determina midiendo la cantidad de inmunoglobulina secretada por los linfocitos B purificados estimulados con una proteína de fusión soluble recombinante que actúa sobre los linfocitos B en su forma nativa usando un ensayo cuantitativo (o semicuantitativo), tal como un ensayo de inmunoenzima.

Si la pareja de unión para una proteína heteróloga concreta se desconoce, se puede usar la proteína de fusión-VASP en un ensayo de unión para buscar dicha pareja de unión. Un procedimiento de hacer esto, denominado ensayo de atrapamiento de secreción, se describe en el Ejemplo 5, aunque un experto en la técnica conoce bien otros procedimientos de usar una proteína de fusión-VASP para identificar parejas de unión.

Para analizar los polipéptidos de zB7R1 agonistas y/o antagonistas y los anticuerpos de la presente invención, las células de mamífero adecuadas para usar en la expresión de receptores que comprenden zB7R1 y la transducción de una señal mediada por el receptor incluyen células que expresan otras subunidades de receptores que pueden formar un complejo funcional con zB7R1 (o zB7R1RA). En una realización preferida, la célula depende de un factor de crecimiento hematopoyético suministrado exógenamente para su proliferación. Líneas celulares de este tipo preferidas son la línea celular TF-1 humana (número ATCC CRL-2003) y la línea celular AML-193 (número ATCC CRL-9589), que son líneas celulares de leucemia humana dependientes de GM-CSF, y BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, (1985)) que es una línea celular pre linfocito B murina dependiente de IL-3. Otras líneas celulares incluyen células BHK, COS-1 y CHO. Células huésped adecuadas se pueden someter a ingeniería para producir las necesarias subunidades receptoras u otro componente celular necesario para la respuesta celular deseada. Este enfoque es ventajoso porque las líneas celulares se pueden someter a ingeniería para que expresen las subunidades receptoras de cualquier especie, superando de este modo las posibles limitaciones que surgen por la especificidad de especies. Especies ortólogas del ADNc del receptor humano se pueden clonar y usar dentro de las líneas celulares de la misma especie, tal como un ADNc de ratón en la línea celular BaF3.

Las células que expresan el receptor funcional se usan en ensayos de detección selectiva. En la técnica se conocen diversos ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en una célula diana. Uno de estos ensayos es un ensayo de proliferación. Las células se cultivan en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo y la proliferación celular se detecta mediante, por ejemplo, medición de la incorporación de timidina tritiada o mediante ensayo colorimétrico basado en la degradación metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, (1983)). Un formato de ensayo alternativo usa células que además se someten a ingeniería para expresar un gen indicador. El gen indicador está unido a un elemento promotor que responde a la vía ligada al receptor y el ensayo detecta la activación de la transcripción del gen indicador. Un elemento promotor preferido a este respecto es un elemento de respuesta sérico o ERS. Véase, por ejemplo, Shaw y col., Cell 56:563-572, (1989). Uno de estos genes indicadores preferidos es un gen de la luciferasa (de Wet y col., Mol. Cell. Biol. 7:725, (1987)). La expresión del gen de la luciferasa se detecta mediante luminiscencia usando procedimientos conocidos en la técnica (p. ej., Baumgartner y col., J. Biol. Chem. 269:29094-29101, (1994); Schenborn y Goiffin, Promega_Notes 41:11, 1993). Los kits de ensayo de la actividad luciferasa están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Promega Corp., Madison, WI. Se pueden usar líneas celulares diana de este tipo para realizar detección selectiva en bibliotecas de sustancias químicas, medios de cultivo acondicionados para células, caldos fúngicos, muestras de suelo, muestras de agua y similares. Por ejemplo, se puede analizar un banco de muestras de medios acondicionados para células en una célula diana para identificar células que produzcan el contrarreceptor. A continuación, las células positivas se usan para producir una biblioteca de ADNc en un vector de expresión en mamíferos, que se divide en grupos transfectados en células huésped, y se expresa. Las muestras de medio de las células transfectadas se someten después a ensayo, con la posterior división de los grupos, retransfección, subcultivo y repetición del ensayo de las células positivas para aislar un ADNc clonado que codifique el contrarreceptor.

En la técnica se conocen varias líneas celulares respondedoras a zB7R1 o, por ejemplo, se puede construir la línea celular Baf3/DIRS1/cytoR11 (publicación WIPO N° WO 02/072607). Además, se conocen varias líneas celulares respondedoras a IL-22 (Dumontier y col., J. Immunol. 164:1814-1819, 2000; Dumoutier, L. y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000; Xie MH y col., J. Biol. Chem. 275: 31335-31339, 2000; Kotenko SV y col., J. Biol. Chem. 276:2725-2732, 2001), así como las que expresan la subunidad zB7R1 receptora de IL-22. Por ejemplo, las siguientes células son respondedoras a IL-22: TK-10 (Xie MH y col., supra.) (carcinoma renal humano); SW480 (ATCC N° CCL-228) (adenocarcinoma de colon humano); HepG2 (ATCC N° HB-8065) (hepatoma humano); PC12 (ATCC N° CRL-1721) (modelo de células neuronales murinas; feocromocitoma de rata); y MES13 (ATCC N° CRL-1927) (línea de células mesangiales renales murinas). Además, algunas líneas celulares expresan zB7R1 (receptor de IL-22) también son candidatas a líneas celulares respondedoras a IL-22. A549 (ATCC N° CCL-185) (carcinoma pulmonar humano); G-361 (ATCC N° CRL-1424) (melanoma humano); y Caki-1 (ATCC N° HTB-46) (carcinoma renal humano). Además, se pueden construir líneas celulares respondedoras a IL-22, por ejemplo, la línea celular Baf3/DIRS1/cytoR11 descrita en el presente documento (publicación WIPO N° WO 02/12345). Estas células se pueden usar en ensayos para evaluar la funcionalidad de zB7R1 como un zB7R1 antagonista de IL-22 o como factor antiinflamatorio.

7. Producción de proteínas de fusión y conjugados de zB7R1 o CD155

Una clase general de análogos de zB7R1 o CD155 son variantes que tienen una secuencia de aminoácidos que es una mutación de la secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Otra clase general de análogos de zB7R1 o CD155 se proporciona mediante anticuerpos antiidiotipo, y fragmentos de los mismos, como se describe más adelante. Además, los anticuerpos recombinantes que comprenden dominios variables antiidiotipo se pueden usar como análogos (véase, por ejemplo, Monfardini y col., Proc. Assoc. Am. Physicians 108:420 (1996)) Dado que los dominios variables de los anticuerpos frente a zB7R1 antiidiotipo imitan al zB7R1, estos dominios pueden proporcionar actividad de unión a zB7R1. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para producir anticuerpos catalíticos antiidiotipo (véase, por ejemplo, Joron y col., Ann. N Y Acad. Sci. 672:216 (1992), Friboulet y col., Appl. Biochem. Biotechnol. 47:229 (1994), y Avelle y col., Ann. N Y Acad. Sci. 864:118 (1998)).

Otra estrategia para identificar análogos de zB7R1 o Cd155 se proporciona mediante el uso de bibliotecas combinatorias. Se proporcionan procedimientos para construir y realizar detección selectiva de expresión en fagos y otras bibliotecas combinatorias en, por ejemplo, Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press 1996), Verdine, patente de EE.UU. n° 5.783.384, Kay, y col., patente de EE.UU. n° 5.747.334, y Kauffman y col., patente de EE.UU. n° 5.723.323.

Los polipéptidos zB7R1 and CD155 tienen usos tanto *in vivo* como *in vitro*. Como ilustración, se puede añadir al medio de cultivo celular una forma soluble de zB7R1 para inhibir los efectos del contrarreceptor de zB7R1 producido por las células cultivadas.

Las proteínas de fusión de zB7R1 se pueden usar para expresar zB7R1 en un huésped recombinante y para aislar el zB7R1 producido. Como se describe más adelante, proteínas de fusión de zB7R1 concretas también tienen usos en diagnóstico y terapia. Un tipo de proteína de fusión comprende un péptido que guía un polipéptido de zB7R1 procedente de una célula huésped recombinante. Para dirigir un polipéptido de zB7R1 hacia la vía secretora de una

célula huésped eucariota se proporciona una secuencia señal secretora (También conocida como péptido señal, secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión de zB7R1. Aunque la secuencia señal secretora puede derivar de zB7R1, también se puede obtener una secuencia señal adecuada de otra proteína secretada o se puede sintetizar *de novo*. La secuencia señal secretora está unida operablemente a la secuencia codificadora de zB7R1 de modo que las dos secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y colocadas para dirigir el polipéptido recién sintetizado en la vía secretora de la célula huésped. Las secuencias señal secretoras normalmente están en posición 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal secretoras pueden estar colocadas en otros puntos de la secuencia de nucleótidos de interés (véase, por ejemplo, Welch y col., patente de EE.UU. n° 5.037.743; Holland y col., patente de EE.UU. n° 5.143.830).

Aunque la secuencia señal secretora de zB7R1 u otra proteína producida por células de mamífero (p. ej., la secuencia señal activadora del plasminógeno de tipo tisular, como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.641.655) es útil para la expresión de zB7R1 en huéspedes de mamífero recombinantes, se prefiere una secuencia señal de levaduras para la expresión en células de levadura. Ejemplos de secuencias señal de levaduras adecuadas son las derivadas del factor α prehormonal de apareamiento de levaduras (codificado por el gen *MF α 1*), invertasa (codificada por el gen *SUC2*) o fosfatasa ácida (codificada por el gen *PHO5*). Véase, por ejemplo, Romanos y col., "Expression of Cloned Genes in Yeast," en *DNA Cloning 2: A Practical Approach* 2ª edición, Glover and Hames (eds.), páginas 123-167 (Oxford University Press 1995).

Los polipéptidos del receptor soluble zB7R1 se pueden preparar expresando un ADN truncado que codifica el dominio extracelular, por ejemplo un polipéptido que contiene la SEC ID N° 2 o 5, o la correspondiente región de un receptor no humano. Se prefiere que los polipéptidos del dominio extracelular se preparen en forma sustancialmente sin segmentos polipeptídicos transmembranales e intracelulares. Para dirigir la exportación del dominio del receptor desde la célula huésped, el ADN del receptor se une a un segundo segmento de ADN que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor de t-PA. Para facilitar la purificación del dominio del receptor secretado, una extensión en el extremo C, tal como un marcador de poli-histidina, sustancia P, el péptido Flag™ (Hopp y col., *Biotechnology* 6:1204-1210, (1988); disponible en Eastman Kodak Co., New Haven, CT) u otro polipéptido o proteína para el cual se dispone de un anticuerpo u otro agente de unión específica se puede fusionar con el polipéptido receptor. Además, los epítomos antigénicos de zB7R1 de los dominios extracelulares de unión a citocinas también se preparan tal como se ha descrito con anterioridad.

En una estrategia alternativa se puede expresar un dominio extracelular del receptor zB7R1 u otro componente del receptor B7 como una fusión con las regiones constantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina, normalmente un fragmento F_c, que contiene dos dominios de región constante y una región bisagra, pero carece de la región variable (véase, Sledziewski, AZ y col., patente de EE.UU. n° 6.018.026 y 5.750.375). Los polipéptidos de zB7R1 soluble de la presente invención incluyen dichas fusiones. Normalmente, dichas fusiones se secretan como moléculas multiméricas, en las que las porciones F_c están unidas mediante puentes disulfuro entre sí y dos polipéptidos receptores están dispuestos en estrecha proximidad entre sí. Las fusiones de este tipo se pueden usar para purificar por afinidad el contrarreceptor afín de la solución, como herramienta de ensayo *in vitro*, para bloquear, inhibir o reducir señales *in vitro* titulando específicamente el contrarreceptor y, como antagonistas *in vivo*, mediante su administración por vía parenteral para unirse al contrarreceptor y eliminarlo de la circulación. Para purificar el contrarreceptor, se añade una quimera zB7R1-Ig a una muestra que contiene el contrarreceptor (p. ej., medio de cultivo acondicionado para células o extractos tisulares) en condiciones que facilitan la unión al contrarreceptor (normalmente, temperatura, pH y fuerza iónica cerca de los valores fisiológicos). Después, el complejo quimera-contrarreceptor se separa mediante la mezcla usando la proteína A, que se inmoviliza sobre un soporte sólido (p. ej., perlas de resina insoluble). A continuación, el contrarreceptor se eluye usando técnicas químicas convencionales, tales como con una sal o gradiente de pH. En la alternativa, la misma quimera puede unirse a un soporte sólido, realizándose la unión y la elución como se ha indicado anteriormente. Las quimeras se pueden usar *in vivo* para regular las respuestas inflamatorias, incluidas las respuestas de fase aguda tales como amiloide A en suero (SAA), proteína C reactiva (CRP) y similares. Las quimeras con alta afinidad de unión se administran por vía parenteral (p. ej., mediante inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa). Las moléculas circulantes se unen al contrarreceptor y se eliminan de la circulación mediante procesos fisiológicos normales. Para uso en ensayos, las quimeras se unen a un soporte a través de la región F_c y se usan en un formato de ELISA.

Para ayudar a aislar anti-zB7R1 y las parejas de unión de la presente invención, se puede emplear de forma ventajosa un sistema de ensayo que usa un receptor de unión a contrarreceptor (o un anticuerpo, un miembro de un par complemento/anticomplemento) o un fragmento de unión del mismo, y un instrumento biosensor disponible comercialmente (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Dicho receptor, anticuerpo, miembro de un par complemento/anticomplemento o fragmento se inmoviliza sobre la superficie de una porción del receptor. El uso de este instrumento se divulga en Karlsson, J. *Immunol. Methods* 145:229-40, 1991 y Cunningham and Wells, J. *Mol. Biol.* 234:554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento se unen de forma covalente, usando química de aminas o de sulfhidrilo, a las fibras de dextrano que están fijadas a la película de oro dentro de la celda de flujo. Una muestra de ensayo se pasa a través de la celda. Si en la muestra hay un contrarreceptor, epítomo o miembro opuesto del par complemento/anticomplemento se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, lo que producirá un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio

en la resonancia en plasmón superficial de la película de oro. Este sistema permite la determinación de las tasas "on" y "off", a partir de las que se puede calcular la afinidad de unión, y la evaluación de la estequiometría de la unión. Como alternativa, la unión contrarreceptor/receptor se puede analizar usando tecnología SELDI(TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA). Además, se puede usar la tecnología BIACORE para usar en experimentos de

5 competición para determinar si diferentes anticuerpos monoclonales se unen al mismo o a diferentes epítomos sobre el polipéptido zB7R1 y, como tal, se usará para ayudar a mapear el epítomo de los anticuerpos de la presente invención.

Los polipéptidos de unión al contrarreceptor (es decir, CD155) también se pueden usar en otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen el análisis de Scatchard para la determinación de la afinidad de

10 unión (véase Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham y col., Science 253:545-48, 1991; Cunningham y col., Science 245:821-25, 1991).

La presente memoria descriptiva describe otros diversos polipeptídicos de fusión y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, se puede preparar un receptor zB7R1 soluble como una fusión a una proteína dimerizante, tal como se divulga en las patentes de EE.UU. n°

15 5.155.027 y 5.567.584. Proteínas dimerizantes preferidas a este respecto incluyen los dominios de la región constante de la inmunoglobulina, por ejemplo IgG.1 y la cadena ligera humana. Las fusiones de inmunoglobulina-zB7R1 soluble se pueden expresar en células sometidas a ingeniería genética para producir diversos análogos de receptores zB7R1 multiméricos. Los dominios auxiliares se pueden fusionar con el receptor zB7R1 soluble para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicos (p. ej., colágeno o células que expresan los

20 contrarreceptores de zB7R1). Un polipéptido de zB7R1 se puede fusionar con dos o más restos, tal como un marcador de afinidad para la purificación y un dominio diana. Las fusiones polipeptídicas pueden también comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan y col., Connective Tissue Research 34:1-9, 1996.

En células bacterianas, a menudo es deseable expresar una proteína heteróloga como una proteína de fusión para

25 disminuir la toxicidad, incrementar la estabilidad y potenciar la recuperación de la proteína expresada. Por ejemplo, zB7R1 se puede expresar como una proteína de fusión que comprende un polipéptido de glutatión-S-transferasa. Normalmente, las proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa son solubles, se pueden purificar con facilidad de lisados de *E. coli* sobre columnas con glutatión inmovilizado. En estrategias similares, una proteína de fusión de zB7R1 que comprende un polipéptido de la proteína de unión maltosa se puede aislar con una columna de resina

30 con amilosa, mientras que una proteína de fusión que comprende el extremo C-terminal de un gen truncado de la proteína A se puede generar usando IgG-sefarosa. Técnicas establecidas para expresar proteínas un polipéptido heterólogo como proteína de fusión en una célula bacteriana se describen en, por ejemplo, Williams y col., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," en DNA Cloning 2: A Practical Approach 2ª edición, Glover and Hames (Eds.), páginas 15-58 (Oxford University Press

35 1995). Además, se dispone de dichos sistemas de expresión disponibles comercialmente. Por ejemplo, el sistema de purificación de proteínas PINPOINT Xa (Promega Corporation; Madison, WI) proporciona un procedimiento para aislar una proteína de fusión que comprende un polipéptido que se biotiniila durante la expresión con una resina que comprende avidina.

Marcadores peptídicos que son útiles para aislar los polipéptidos heterólogos expresados por células procariontas o

40 eucariotas incluyen marcadores de polihistidina (que tienen afinidad por la resina quelante de níquel), marcadores *c-myc*, proteína de unión a calmodulina (aislada con cromatografía de afinidad por calmodulina), sustancia P, el marcador RYIRS (que se une con anticuerpos anti-RYIRS), marcador Glu-Glu y el marcador FLAG (que se une con anticuerpos anti-FLAG). Véase, por ejemplo, Luo y col., Arch. Biochem. Biophys. 329:215 (1996), Morganti y col., Biotechnol. Appl. Biochem. 23:67 (1996), y Zheng y col., Gene 186:55 (1997). Se dispone de moléculas de ácido nucleico que codifican dichos marcadores peptídicos en, por ejemplo, Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO).

45

Otra forma de proteína de fusión comprende un polipéptido de zB7R1 y una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, normalmente un fragmento F_c, que contiene dos o tres dominios de la región constante y una

50 región bisagra, pero carece de la región variable. Como ilustración Chang y col., patente de EE.UU. n° 5.723.125, describen una proteína de fusión que comprende un interferón humano y un fragmento F_c de inmunoglobulina humana. El extremo C del interferón está unido al extremo N del fragmento F_c por un resto ligador peptídico. Un ejemplo de un ligador peptídico es un péptido que comprende principalmente una secuencia inerte de linfocitos T, que es inmunológicamente inerte. En esta proteína de fusión, un resto F_c ilustrativo es una cadena γ 4 humana, que es estable en solución y tiene poca o ninguna actividad de activación del complemento. De acuerdo con esto, la presente invención contempla una proteína de fusión de zB7R1 que comprende un resto zB7R1 y un fragmento F_c

55 humano, en el que el extremo C del resto zB7R1 está unido al extremo N del fragmento F_c mediante un ligador peptídico. El resto zB7R1 puede ser una molécula zB7R1 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender los aminoácidos de la SEC ID N° 3 y un fragmento F_c (p. ej., un fragmento F_c humano).

En otra variación, una proteína de fusión zB7R1 comprende una secuencia de IgG, un resto zB7R1 unido de forma covalente al extremo aminoterminal de la secuencia de IgG y un péptido señal que está unido covalentemente al

60 extremo aminoterminal del resto zB7R1, en el que la secuencia de IgG consiste en los elementos siguientes en el orden siguiente: una región bisagra, un dominio CH₂ y un dominio CH₃. De acuerdo con esto, la secuencia de IgG

carece de un dominio CH₁. El resto zB7R1 muestra una actividad de zB7R1, como se describe en el presente documento, tal como la capacidad para unirse con un contrarreceptor de zB7R1. Esta estrategia general para producir las proteínas de fusión que comprenden porciones de anticuerpo y que no son de anticuerpos se ha descrito en LaRochelle y col., documento EP 742830 (WO 95/21258).

5 Las proteínas de fusión que comprenden un resto de zB7R1 y un resto Fc se pueden usar como, por ejemplo, herramienta para ensayos *in vitro*. Por ejemplo, la presencia de un contrarreceptor de zB7R1 en una muestra biológica se puede detectar usando una proteína de fusión zB7R1-inmunoglobulina, en la que el resto zB7R1 se usa para unirse al contrarreceptor, y una macromolécula, como la proteína A o en anticuerpo anti-Fc, se usa para unir la proteína de fusión a un soporte sólido. Dichos sistemas se pueden usar para identificar agonistas y antagonistas que
10 interfieren en la unión de zB7R1 a su contrarreceptor.

Otros ejemplos de proteínas de fusión con anticuerpo incluyen polipéptidos que comprenden un dominio de unión a antígeno y un fragmento de zB7R1 que contiene un dominio extracelular de zB7R1. Dichas moléculas se pueden usar para apuntar a tejidos concretos diana para beneficio de la actividad de unión a zB7R1.

15 La presente memoria descriptiva describe otras diversas fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, se pueden cambiar parte o todos los dominios que confieren una función biológica entre zB7R1 con el(los) dominio(s) equivalente(s) funcionalmente procedente(s) de otro miembro de la familia de receptores de citocinas. Las fusiones polipeptídicas se pueden expresar en células huésped recombinantes para producir diversos análogos de fusión de zB7R1. Un polipéptido de zB7R1 se puede fusionar con dos o más restos o dominios, tal como un marcador de afinidad para la purificación y un dominio diana. Las fusiones polipeptídicas pueden también comprender uno o más sitios de
20 escisión, particularmente entre dominios. Véase, por ejemplo, Tuan y col., *Connective Tissue Research* 34:1-9, 1996.

Las proteínas de fusión se pueden preparar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolas químicamente. Como alternativa, se puede generar un polinucleótido que codifica ambos componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura adecuado usando técnicas conocidas y se puede expresar mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 16-19 a 16-25 se describen procedimientos generales para la escisión enzimática y química de las proteínas de fusión.
25

Los dominios de unión de zB7R1 pueden caracterizarse además mediante análisis físico de la estructura, determinada mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje de fotoafinidad, junto con mutación de los aminoácidos del sitio de contacto putativo de los agonistas del contrarreceptor de zB7R1. Véase, por ejemplo, de Vos y col., *Science* 255:306 (1992), Smith y col., *J. Mol. Biol.* 224:899 (1992), y Wlodaver y col., *FEBS Lett.* 309:59 (1992).
30

La presente memoria descriptiva describe composiciones de zB7R1 modificadas químicamente, en las que un polipéptido de zB7R1 está unido con un polímero. Polipéptidos de zB7R1 ilustrativos son polipéptidos solubles que carecen de un dominio transmembranal funcional, tal como un polipéptido que consisten en los residuos de aminoácidos de la SEC ID N° 3. Normalmente, el polímero es hidrosoluble de modo que el conjugado de zB7R1 no precipita en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación. De este modo se puede controlar el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es polietilenglicol propionaldehído o mono-alcoxi (C1-C10) o derivados ariloxi de los mismos (véase, por ejemplo, Harris, y col., patente de EE.UU. n° 5.252.714). El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Además, se puede usar una mezcla de polímeros para producir conjugados de zB7R1.
35
40

Los conjugados de zB7R1 usados para terapia pueden comprender restos poliméricos hidrosolubles farmacéuticamente aceptables. Polímeros hidrosolubles adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-alcoxi(C1-C10)-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vibilpirrolidona)PEG, tresil monometoxi-PEG, propionaldehído PEG, carbonato de bis-succinimidilo PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p. ej., glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en hidratos de carbono. PEG adecuados pueden tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluidos, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado de zB7R1 también puede comprender una mezcla de dichos polímeros hidrosolubles.
45
50

Un ejemplo de un conjugado de zB7R1 comprende un resto de zB7R1 y un resto de óxido de polialquilo unido al extremo N del resto de zB7R1. PEG es un óxido de polialquilo adecuado. Como ilustración, zB7R1 se puede modificar con PEG, un procedimiento conocido como "PEGilación". La PEGilación de zB7R1 se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316, Delgado y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249 (1992), Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27:290 (1994), y Francis y col., *Int J Hematol* 68:1 (1998)). Por ejemplo, la PEGilación se puede realizar mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En una estrategia alternativa, los conjugados de zB7R1 se forman mediante condensación del PEG activado en la que un grupo terminal hidroxilo o amino de PEG se ha sustituido por un ligador activado
55

(véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., patente de EE.UU. nº 5.382.657).

Normalmente, la PEGilación mediante acilación requiere un derivado de éster activo de PEG con un polipéptido de zB7R1. Un ejemplo del éster de PEG activado es PEG esterificado con *N*-hidroxisuccinimida. Como se usa en el presente documento, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de enlaces entre zB7R1 y un polímero hidrosoluble: amida, carbamato, uretano y similares. Procedimientos para preparar zB7R1 PEGilado mediante acilación normalmente comprenderán las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido de zB7R1 con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado de aldehído de PEG) en las condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen a zB7R1, y (b) obtener el(los) producto(s) de reacción. En general las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán en función de los parámetros conocidos y los resultados deseados. Por ejemplo, cuando mayor es la proporción PEG:zB7R1, mayor es el porcentaje del producto zB7R1 poliPEGilado.

El producto de la PEGilación por acilación normalmente es un producto zB7R1 poliPEGilado, en el que los grupos de lisina ϵ -amino están PEGilados a través de un grupo de unión a acilo. Un ejemplo de un enlace de conexión es una amida. Normalmente, el zB7R1 resultante estará al menos un 95 % mono, di o tripegilado, aunque se pueden formar algunas especies con grados mayores de PEGilación en función de las condiciones de la reacción. Las especies PEGiladas se pueden separar de polipéptidos de zB7R1 no conjugados usando procedimientos de purificación estándar, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

En general, la PEGilación por alquilación implica hacer reaccionar un derivado de aldehído terminal de PEG con zB7R1 en presencia de un agente reductor. Los grupos PEG se pueden unir al polipéptido mediante un grupo $-CH_2-NH$.

Además, los anticuerpos anti-zB7R1 o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden PEGilar usando procedimientos de la técnica y descritos en el presente documento.

La derivación mediante alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado aprovecha de la reactividad diferencial de tipos diferentes de grupos amino primarios disponibles para derivación. Normalmente, la reacción se lleva a cabo a un pH que permita aprovechar las diferencias de la pKa entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el grupo α -amino del residuo *N*-terminal de la proteína. Mediante dicha derivación selectiva se controla la unión de un polímero hidrosoluble que contiene un grupo reactivo, tal como un aldehído, a una proteína. La conjugación con el polímero se produce principalmente en el extremo N de la proteína sin producir modificaciones significativas de otros grupos reactivos, tal como los grupos amino de la cadena lateral de lisina. La presente invención proporciona una preparación sustancialmente homogénea de los conjugados monopoliméricos de zB7R1.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de la molécula del conjugado monopolimérico de zB7R1 puede comprender las etapas de: (a) hacer reaccionar un polipéptido de zB7R1 con un PEG reactivo en condiciones de alquilación reductora a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α -amino en el extremo amino de zB7R1, y (b) obtener el(los) producto(s) de reacción. El agente reductor usado para la alquilación reductora deberá ser estable en solución acuosa y capaz de reducir únicamente la base de Schiff formada en el procedimiento inicial de la alquilación reductora. Los agentes reductores ilustrativos incluyen borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, dimetilamino borano, trimetilamino borano y pirdina borano.

Para una población sustancialmente homogénea de los conjugados monopoliméricos de zB7R1, las condiciones de reacción de alquilación reductora son aquéllas que permitan la unión selectiva del resto de polímero hidrosoluble con el extremo *N* de zB7R1. En general, dichas condiciones de reacción proporcionan diferencias en los pKa entre los grupos amino de lisina y el grupo α -amino en el extremo *N*. El pH también afecta a la proporción entre el polímero y la proteína que se ha de usar. En general, si el pH es menor, se deseará un mayor exceso de polímero-proteína porque cuando menos reactivo sea el grupo α en el extremo *N*, más polímero se necesita para alcanzar las condiciones óptimas. Si el Ph es mayor, la proporción polímero:zB7R1 no tiene que ser tan grande porque se dispone de más grupos reactivos. Normalmente, el Ph caerá dentro del intervalo de 3 a 9 o de 3 a 6. Este procedimiento se puede emplear para fabricar conjugados del receptor soluble homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos que comprendan zB7R1.

Otro factor que se ha de considerar es el peso molecular del polímero hidrosoluble. En general, cuando mayor es el peso molecular del polímero, menor es el número de moléculas poliméricas que se pueden unir a la proteína. Para las reacciones de PEGilación, el peso molecular habitual es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, de aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 25 kDa. La proporción molar entre el polímero hidrosoluble y zB7R1 estará, en general, en el intervalo de 1:1 a 100:1. Normalmente, la proporción molar entre el polímero hidrosoluble y zB7R1 será de 1:1 a 20:1 para la poliPEGilación y de 1:1 a 5:1 para la monoPEGilación.

Procedimientos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y restos de polímeros hidrosolubles se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., patente de EE.UU. nº 5.382.657, Greenwald y col., patente de EE.UU. nº 5.738.846, Nieforth y col., Clin. Pharmacol. Ther. 59:636 (1996), Monkarsh y col., Anal. Biochem. 247:434 (1997)). Este procedimiento se puede emplear para fabricar conjugados del receptor

soluble homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos que comprenden zB7R1.

La memoria descriptiva describe composiciones que comprenden un péptido o polipéptido, tal como un receptor soluble o anticuerpo descrito en el presente documento. Dichas composiciones pueden comprender, además, un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Ejemplos de vehículos incluyen agua, solución tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

8. Aislamiento de polipéptidos de zB7R1 o CD155

Los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden purificar hasta una pureza de al menos aproximadamente 80 %, hasta una pureza de al menos aproximadamente 90 %, hasta una pureza de al menos aproximadamente 95 % o superior al 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 %, o una pureza superior al 99 % con respecto a las macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y sin agentes infecciosos y pirogénicos. Los polipéptidos también se pueden purificar hasta un estado farmacéuticamente puro, que tiene una pureza superior al 99,9 %. En ciertas preparaciones, el polipéptido purificado carece sustancialmente de otros polipéptidos, en particular otros polipéptidos de origen animal.

Se pueden usar procedimientos de purificación por fraccionamiento y/o convencionales para obtener preparaciones de zB7R1 (o CD155) purificadas de fuentes naturales (p. ej., fuentes de tejido humano), polipéptidos de zB7R1 sintéticos y polipéptidos de zB7R1 recombinantes y polipéptidos de zB7R1 de fusión purificados de células huésped recombinantes. En general, para el fraccionamiento de las muestras se pueden usar precipitación en sulfato amónico y extracción en ácido o caotrope. Ejemplos de etapas de purificación pueden incluir cromatografía con hidroxipatito, de exclusión por tamaño, FPLC y de líquidos de fase inversa de alto rendimiento. Medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivados, agarosa, celulosa, poli(acrilamida), sílices de especialidad y similares. Derivados de PEI, DEAE, QAE y Q son adecuados. Ejemplos de medios cromatográficos incluyen los medios derivados con grupos fenilo, butilo u octilo, tal como Fenil-Sefarosa FF (Pharmacia), Toyopearl butilo 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octilo-Sefarosa (Pharmacia) y similares; o resinas poli(acrilicas), tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Soportes sólidos adecuados incluyen perlas de cristal, resinas a base de sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poli(acrilamida) reticulada y similares, que son insolubles en las condiciones en las que se vana a usar. Estos soportes se pueden modificar con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidratos de carbono.

Ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida y derivados carboxilo y amino para las químicas de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y ampliamente usados en la técnica y están disponibles en proveedores comerciales. La selección de un procedimiento concreto para el aislamiento y purificación de polipéptidos depende del diseño de rutina y viene determinado, en parte, por las propiedades del soporte escogido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Pharmacia LKB Biotechnology 1988), y Doonan, *Protein Purification Protocols* (The Humana Press 1996).

Los expertos en la técnica pueden concebir variaciones adicionales en el aislamiento y purificación de zB7R1 (o CD155). Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos anti-zB7R1, obtenidos tal como se describe más adelante, para aislar grandes cantidades de proteínas mediante purificación por inmunoafinidad.

Los polipéptidos también se pueden aislar mediante explotación de propiedades concretas. Por ejemplo, la cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC) se puede usar para purificar proteínas ricas en histidina, incluidas las que comprenden marcadores de polihistidina. En resumen, primero se carga un gen con iones metálicos divalentes para formar un quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1 (1985)). Las proteínas ricas en histidina serán adsorbidas en esta matriz con afinidades diferentes, en función del ion metálico usado, y eluirán mediante elución competitiva, disminuyendo el pH o mediante el uso de agentes quelantes fuertes. Otros procedimientos de purificación incluyen purificación de proteínas glicosiladas mediante cromatografía de afinidad por lectina y cromatografía de intercambio iónico (. Deutscher, (ed.), *Meth. Enzymol.* 182:529 (1990)). En realizaciones adicionales de la invención se puede construir una fusión del polipéptido de interés y un marcador de afinidad (p. ej. proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación. Además, las propiedades de unión al contrarreceptor del dominio extracelular de zB7R1 se pueden explotar para la purificación de, por ejemplo, receptores solubles que comprenden zB7R1; usando, por ejemplo, cromatografía de afinidad en la que el contrarreceptor adecuado está unido a una columna y el receptor que comprende zB7R1 se une y se eluye después usando procedimientos cromatográficos estándar.

También se pueden preparar polipéptidos de zB7R1 (o CD155), o fragmentos de los mismos, mediante síntesis química, como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos de zB7R1 pueden ser monómeros o multímeros; glicosilados o no glicosilados; PEGilados o no PEGilados; y pueden o no incluir un residuo de aminoácido metionina inicial.

9. Producción de anticuerpos frente a proteínas zB7R1

Los anticuerpos frente a zB7R1 se pueden obtener usando, por ejemplo, el producto de un vector de expresión de zB7R1 o de zB7R1 aislado de una fuente natural como antígeno. Anticuerpos anti-zB7R1 particularmente útiles "se unen específicamente" a zB7R1. Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si los anticuerpos exhiben al menos una de las siguientes dos propiedades:

(1) los anticuerpos se unen a zB7R1 con un nivel umbral de actividad de unión y (2) los anticuerpos no sufren reacción cruzada significativa con los polipéptidos relacionados con zB7R1.

Con respecto a la primera característica, los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido, péptido o epítipo de zB7R1 con una afinidad de unión (K_a) de $10^6 M^{-1}$ o mayor, preferentemente de $10^7 M^{-1}$ o mayor, más preferentemente de $10^8 M^{-1}$ o mayor, y, más preferentemente, de $10^9 M^{-1}$ o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo la puede determinar fácilmente un experto en la técnica, por ejemplo mediante un análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660 (1949)). Con respecto a la segunda característica, los anticuerpos no sufren reacción cruzada significativa con las moléculas polipeptídicas relacionados, por ejemplo, si detectan zB7R1 pero no los polipéptidos conocidos actualmente usando un análisis de transferencia tipo western convencional. Ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos incluyen receptores de citocinas conocidos.

Los anticuerpos anti-zB7R1 se pueden producir usando péptidos y polipéptidos portadores del epítipo de zB7R1 antigénico. Los péptidos y polipéptidos portadores del epítipo antigénico de la presente invención contienen una secuencia de al menos 9, o entre 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contenidos dentro de la SEC ID N° 2 u otra secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. No obstante, los péptidos y polipéptidos que comprenden una porción más grande de una secuencia de aminoácidos de la invención, que contienen de 30 a 50 aminoácidos o cualquier longitud hasta, e incluida, la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención, también son útiles para inducir anticuerpos que se unen a zB7R1. Es deseable que la secuencia de aminoácidos del péptido portador del epítipo se seleccione de modo que se proporcione una solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye residuos relativamente hidrófilos, mientras que normalmente se evitan los residuos hidrófobos) Además, las secuencias de aminoácidos que contienen residuos de prolina también pueden ser deseables para la producción de anticuerpos.

Como ilustración, se identificaron posibles sitios antigénicos en zB7R1 usando el procedimiento de Jameson-Wolf, Jameson and Wolf, CABIOS 4:181, (1988), tal como se implementa mediante el programa PROTEAN (versión 3.14) de LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI). En este análisis se usaron los parámetros predeterminados.

El procedimiento de Jameson-Wolf predice posibles determinantes antigénicos combinando seis subrutinas principales para la predicción de la estructura de la proteína. En resumen, el procedimiento de Hopp-Woods, Hopp y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78:3824 (1981), se usó primero para identificar secuencias de aminoácidos que representan áreas de mayor hidrofiliidad local (parámetro: siete residuos de media). En la segunda etapa, se usó el procedimiento de Emini, Emini y col., J. Virology 55:836 (1985), para calcular las probabilidades de superficie (parámetro: umbral de decisión de superficie (0,6)= 1). En tercer lugar, se usó el procedimiento de Karplus-Schultz, Karplus y Schultz, Naturwissenschaften 72:212 (1985), para predecir la flexibilidad de la cadena armazón (parámetro: umbral de flexibilidad (0,2)= 1). En las etapas cuarta y quinta del análisis se aplicaron las predicciones de la estructura secundaria a los datos usando los procedimientos de Chou-Fasman, Chou, "Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition," en Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Fasman (ed.), páginas 549-586 (Plenum Press 1990), y Garnier-Robson, Garnier y col., J. Mol. Biol. 120:97 (1978) (parámetros de Chou-Fasman: tabla de conformación= 64 proteínas; un umbral de región= 103; umbral de la región β = 105; parámetros de Garnier-Robson: constantes de decisión α y β = 0). En la sexta subrutina, los parámetros de flexibilidad y los factores de accesibilidad de hidropatía/disolvente se combinaron para determinar un valor de contorno superficial, denominado "índice antigénico". Por último, se aplicó al índice antigénico una función de ensanchamiento del pico, que ensancha los picos principales de la superficie añadiendo 20, 40, 60, u 80 % del respectivo valor del pico para representar la energía libre adicional derivada de la movilidad de las regiones de la superficie respecto a las regiones interiores. No obstante, este cálculo no se aplicó a ningún pico principal que resida en una región de hélice, ya que las regiones de hélice tienden a ser menos flexibles.

Los resultados de este análisis indicaron que las siguientes secuencias de aminoácidos de la SEC ID N° 2 proporcionarían péptidos antigénicos adecuados: Se pueden usar los perfiles de hidrofiliidad de Hopp/ Woods para determinar las regiones que tienen el potencial más antigénico en la SEC ID N° 3 (Hopp y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88:1-18, 1986 y Triquier y col., Protein Engineering 11:153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana móvil de seis residuos. Los residuos G, S y T enterrados y los residuos H, Y y W expuestos se ignoraron. Además, los epítopos antigénicos de zB7R1 en la SEC ID N° 2, predicha mediante un gráfico de Jameson-Wolf, usando, por ejemplo, un programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI), sirven como epítopos antigénicos preferidos y un experto en la técnica puede determinarlos. Dichos epítopos antigénicos incluyen (1) residuos de aminoácidos 80 a 86 de la SEC ID N° 2; (2) residuos de aminoácidos 163 a 170 de la SEC ID N° 2; (3) residuos de aminoácidos 163 a 190 de la SEC ID N° 2; (4) residuos de aminoácidos 175 a 190 de la SEC ID N° 2; y (5) residuos de aminoácidos 211 a 221 de la SEC ID N° 2. La presente invención contempla el uso de uno cualquiera de los péptidos antigénicos 1 a 5 para generar anticuerpos frente a zB7R1 o como

herramienta para la detección selectiva o identificación de los anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente invención. La presente invención contempla el uso de cualquiera de los péptidos o epítopos antigénicos descritos en el presente documento para generar anticuerpos contra zB7R1, así como para identificar y seleccionar anticuerpos monoclonales anti-zB7R1 que se puedan unir, actuar como agonistas, bloquear, inhibir, reducir, incrementar, antagonizar o neutralizar la actividad de un contrarreceptor de zB7R1.

Los anticuerpos policlonales frente a la proteína zB7R1 recombinante o al zB7R1 aislado de fuentes naturales se pueden preparar usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Green y col., "Production of Polyclonal Antisera," en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press 1992), y Williams y col., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover y col. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995). La inmunogenicidad de un polipéptido de zB7R1 se puede incrementar mediante el uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de zB7R1, o una porción de los mismos, con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción polipeptídica es "similar a hapteno", dicha porción puede juntarse o unirse de forma ventajosa a un vehículo macromolecular (tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (SAB) o toxoide del tétanos) para inmunización.

Aunque los anticuerpos policlonales normalmente se producen en animales tales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayas, cabras u ovejas, también se puede derivar un anticuerpo anti-zB7R1 de la presente invención a partir de un anticuerpo de primate subhumano. En, por ejemplo, Goldenberg y col., publicación de patente internacional nº WO 91/11465, y en Losman y col., *Int. J. Cancer* 46:310 (1990) se pueden encontrar técnicas generales para producir anticuerpos diagnóstica y terapéuticamente útiles en babuinos.

Como alternativa se pueden generar anticuerpos monoclonales anti-zB7R1. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales de roedores frente a antígenos específicos usando procedimientos conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler y col., *Nature* 256:495 (1975), Coligan y col. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"], Picklesley y col., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*," en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover y col. (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995).

En resumen, se pueden obtener anticuerpos monoclonales inyectando en ratones una composición que comprende un producto génico de zB7R1, comprobando la presencia de producción de anticuerpos eliminando una muestra de suero, extrayendo el bazo para obtener los linfocitos B, condensado los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonar los hibridomas, seleccionar los clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno, cultivar los clones que producen anticuerpos contra el antígeno y aislar los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

Además, un anticuerpo anti-zB7R1 de la presente invención se puede obtener a partir de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se obtienen de ratones transgénicos que se han sometido a ingeniería para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición al antígeno. En esta técnica, los elementos del locus humano de las cadenas pesadas y ligeras se introducen en cepas de ratones derivados de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los loci endógenos de las cadenas pesadas y ligeras. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos de antígenos humanos y los ratones se pueden usar para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. En, por ejemplo, Green y col., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg y col., *Nature* 368:856 (1994) y Taylor y col., *Int. Immun.* 6:579 (1994) se describen procedimientos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar de cultivos de hibridoma mediante diversas técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína A-sefara, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines y col., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

Para usos concretos, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-zB7R1. Dichos fragmentos de anticuerpos se pueden obtener mediante, por ejemplo, hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener mediante digestión con pepsina o papaína de los anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. Como ilustración, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir mediante escisión enzimática de los anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes de 3,5S denominados Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión se puede realizar usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que son el resultado de la escisión de los puentes disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos procedimientos se describen en, por ejemplo, Goldenberg, patente de EE.UU. nº 4.331.647, Nisonoff y col., *Arch Biochem. Biophys.* 89:230 (1960), Porter, *Biochem. J.* 73:119 (1959), Edelman y col., en

Methods in Enzymology Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967) y en Coligan, páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

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

Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como describen Inbar y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659 (1972). Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse a través de un puente disulfuro intermolecular o reticularse mediante agentes químicos, tales como glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437 (1992)).

Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas V_H y V_L que están conectadas a través de un ligador peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno de cadena sencilla (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que después se introduce en una célula huésped, tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica sencilla con un péptido ligador que une mediante puentes los dos dominios V. En, por ejemplo, Whitlow y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991) (véase también, Bird y col., Science 242:423 (1988), Ladner y col., patente de EE.UU. n° 4.946.778, Pack y col., Bio/Technology 11:1271 (1993), y Sandhu, ant.) se describen procedimientos para producir scFv.

Como ilustración se puede obtener un scFv mediante exposición de los linfocitos al polipéptido zB7R1 *in vitro* y seleccionando las bibliotecas de expresión de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteínas o péptidos zB7R1 inmovilizados o marcados). Los genes que codifican polipéptidos que tienen posibles dominios de unión al polipéptido zB7R1 se pueden obtener mediante detección selectiva en bibliotecas de péptidos aleatorias expresados en fagos (expresión en fagos) o en bacterias, como *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden obtener de numerosas formas, tales como mutagénesis aleatoria y síntesis polinucleotídica aleatoria. Estas bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias se pueden usar para buscar péptidos que interaccionen con una diana conocida, que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un contrarreceptor o un receptor, una macromolécula biológica o sintética o sustancias orgánicas o inorgánicas. En la materia se conocen técnicas para crear dichas bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias y realizar detección selectiva en ellas (Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.223.409, Ladner y col., patente de EE.UU. n° 4.946.778, Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.403.484, Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.571.698, y Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)) y bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias y kit para la detección selectiva en dichas bibliotecas están disponibles comercialmente, por ejemplo en CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Se puede efectuar la detección selectiva de las bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias usando las secuencias de zB7R1 divulgadas en el presente documento para identificar proteínas que se unen a zB7R1.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") se pueden obtener construyendo genes que codifican las CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan usando, por ejemplo, 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 col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106 (1991), Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter y col. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995), y Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch y col., (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Como alternativa, un anticuerpo anti-zB7R1 se puede obtener a partir de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de la complementariedad murinas desde cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Después, se sustituyen residuos típicos de los anticuerpos humanos en las regiones del armazón de los homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los posibles problemas asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. En, por ejemplo, Orlandi y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833 (1989) se describen técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulina. En, por ejemplo, Jones y col., Nature 321:522 (1986), Carter y col., Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285 (1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437 (1992), Singer y col., J. Immun. 150:2844 (1993), Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995), Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), páginas 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) y en Queen y col., patente de EE.UU. n° 5.693.762 (1997) se describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados.

Además, los anticuerpos anti-zB7R1 o fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden PEGilar usando procedimientos de la técnica y descritos en el presente documento.

Los anticuerpos policlonales antiidiotipo se pueden preparar inmunizando animales con anticuerpos anti-zB7R1 o fragmentos de anticuerpos usando técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Green y col., "Production of Polyclonal Antisera," in *Methods In Molecular Biology: Immunochemical Protocols*, Manson (ed.), páginas 1-12 (Humana Press 1992). Asimismo, véase Coligan, páginas 2.4.1-2.4.7. Como alternativa, los anticuerpos monoclonales antiidiotipo se pueden preparar usando anticuerpos anti-zB7R1 o fragmentos de anticuerpos como inmunógenos con las técnicas descritas con anterioridad. Como otra alternativa, los anticuerpos antiidiotipo humanizados o anticuerpos antiidiotipo de primate subhumano se pueden preparar usando las técnicas descritas con anterioridad. En, por ejemplo, Irie, patente de EE.UU. n° 5.208.146, Greene, y col., patente de EE.UU. n° 5.637.677 y Varthakavi y Minocha, *J. Gen. Virol.* 77:1875 (1996) se describen procedimientos para producir anticuerpos antiidiotipo.

Un anticuerpo anti-zB7R1 se puede conjugar con un marcador detectable para formar un inmunoconjugado anti-zB7R1. Marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente u oro coloidal. Para los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos de fabricar y detectar dichos inmunoconjugados marcados de forma detectable y se describen con mayor detalle más adelante.

El marcador detectable puede ser un radioisótopo que se detecte mediante autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para los fines de la presente invención son ^3H , ^{124}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .

Los inmunoconjugados anti-zB7R1 también se pueden marcar con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado con fluorescencia se determina exponiendo el inmunoconjugado a la luz de la longitud de onda adecuada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos de marcaje fluorescente incluyen fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina o-ftaldehído y fluorescamina.

Como alternativa, los inmunoconjugados anti-zB7R1 se pueden marcar de forma detectable acoplado un componente de anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunoconjugados marcado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que se produce durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos para marcaje quimioluminiscente incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

De forma similar, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar los inmunoconjugados anti-zB7R1 de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes que son útiles para marcaje incluyen luciferina, luciferasa y acuorina.

Como alternativa, los inmunoconjugados anti-zB7R1 se pueden marcar de forma detectable uniendo un componente de anticuerpo anti-zB7R1 a una enzima. Cuando un conjugado anti-zB7R1-enzima se incuba en presencia del sustrato adecuado, el resto enzimático reacciona con el sustrato para producir un resto químico que se puede detectar por medios, por ejemplo, espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Ejemplos de enzimas que se pueden usar para marcar de forma detectable inmunoconjugados poliespecíficos incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de restos marcadores a anticuerpos anti-zB7R1 se puede conseguir usando técnicas estándar conocidas en la técnica. La metodología típica a este respecto se describe en Kennedy y col., *Clin. Chim. Acta* 70:1 (1976), Schurs y col., *Clin. Chim. Acta* 81:1 (1977), Shih y col., *Int'l J. Cancer* 46:1101 (1990), Stein y col., *Cancer Res.* 50:1330 (1990), y Coligan, ant.

Además, la conveniencia y versatilidad de la detección inmunoquímica se puede potenciar usando anticuerpos anti-zB7R1 que se han conjugado con avidina, estreptavidina y biotina (véase, por ejemplo, Wilchek y col. (eds.), "Avidin-Biotin Technology," *Methods en Enzymology*, Vol. 184 (Academic Press 1990), y Bayer y col., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," en *Methods In Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 149-162 (The Humana Press, Inc. 1992).

Los procedimientos para realizar inmunoensayos están bien establecidos. Véase, por ejemplo, Cook y Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter y Ladyman (eds.), páginas 180-208, (Cambridge University Press, 1995), Perry, "The Role of Monoclonal Anti-bodies in the Advancement of Immunoassay Technology," en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch y Lennox (eds.), páginas 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995), y Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).

La presente memoria descriptiva describe kit para realizar un ensayo diagnóstico inmunológico para la expresión del gen de zB7R1. Dichos kit comprende al menos un contenedor que comprende un anticuerpo anti-zB7R1 o fragmento de anticuerpo. Un kit puede también comprender un segundo contenedor que comprende uno o más reactivos capaces de indicar la presencia de un anticuerpo frente a zB7R1 o fragmentos de anticuerpos. Ejemplos de dichos reactivos indicadores incluyen marcadores detectables tales como un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente, oro coloidal y similares. Un kit puede también comprender un medio para transmitir al usuario que anticuerpos frente a zB7R1 o fragmentos de anticuerpos se usan para detectar la proteína zB7R1. Por ejemplo, las instrucciones escritas pueden indicar que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo incluido se puede usar para detectar zB7R1. El material escrito se puede aplicar directamente a un contenedor o el material escrito se puede proporcionar en forma de una ficha técnica.

10. Uso de anticuerpos anti-zB7R1 para actuar como agonistas o antagonistas de la unión de zB7R1 a su contrarreceptor

Técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos útiles en el presente documento incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos a polipéptidos receptores solubles zB7R1 o fragmentos de los mismos, tales como epítopos antigénicos, y selección de bibliotecas de expresión de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de polipéptidos receptores solubles zB7R1 o fragmentos de los mismos inmovilizados o marcados, tales como epítopos antigénicos). Los genes que codifican polipéptidos que tienen posibles dominios de unión, tales como polipéptidos receptores solubles zB7R1 o fragmentos de los mismos, se pueden obtener mediante detección selectiva en bibliotecas de péptidos aleatorias expresados en fagos (expresión en fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden obtener de numerosas formas, tales como mutagénesis aleatoria y síntesis polinucleotídica aleatoria. Estas bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias se pueden usar para buscar péptidos que interaccionen con una diana conocida, que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un contrarreceptor (es decir, CD155) o un receptor, una macromolécula biológica o sintética o sustancias orgánicas o inorgánicas. En la materia se conocen técnicas para crear dichas bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias y realizar detección selectiva en ellas (Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.223.409, Ladner y col., patente de EE.UU. n° 4.946.778, Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.403.484 y Ladner y col., patente de EE.UU. n° 5.571.698) y bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias y kit para la detección selectiva en dichas bibliotecas están disponibles comercialmente, por ejemplo en Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Se puede efectuar la detección selectiva de las bibliotecas de expresión de péptidos aleatorias usando polipéptidos receptores solubles zB7R1 o fragmentos de los mismos, tales como las secuencias polipeptídicas del epítipo antigénico divulgadas en el presente documento para identificar proteínas que se unen a polipéptidos receptores que comprenden zB7R1. Estos "polipéptidos de unión", que interaccionan con los polipéptidos receptores solubles que comprenden zB7R1, se pueden usar para marcar células; para aislar polipéptidos homólogos mediante purificación por afinidad; pueden conjugarse directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares. Estos polipéptidos de unión también se pueden usar en procedimientos analíticos, tal como para la detección selectiva de bibliotecas de expresión y para actuar como agonistas y/o neutralizar la actividad, por ejemplo para unir, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la interacción entre zB7R1 y su contrarreceptor. Los polipéptidos de unión también se pueden usar para ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos receptores que comprenden zB7R1 soluble; para detectar o cuantificar los receptores que comprenden zB7R1 soluble o no soluble, como marcador de la patología o enfermedad subyacente. Estos polipéptidos de unión también pueden actuar como "antagonistas" para bloquear o inhibir el receptor monomérico zB7R1 unido a la membrana o la unión del polipéptido homodimérico, heterodimérico o multimérico zB7R1 (p. ej., al contrarreceptor) la transducción de señal *in vitro* e *in vivo*. De nuevo, estos polipéptidos de unión sirven como receptor monomérico anti-zB7R1 o polipéptidos homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos anti-zB7R1 y son útiles para inhibir la actividad de zB7R1, así como la actividad del contrarreceptor de zB7R1 o la unión a proteínas. Los anticuerpos producidos contra los complejos receptores naturales de la presente invención y los anticuerpos de unión al epítipo de zB7R1 y los anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-zB7R1 pueden ser realizaciones preferidas, ya que pueden actuar más específicamente contra zB7R1 y pueden inhibir su unión a su contrarreceptor. Además, la actividad agonista, antagonista y de unión de los anticuerpos de la presente invención se puede analizar en ensayos de proliferación de zB7R1, atrapamiento de señal, de luciferasa o de unión en presencia de su contrarreceptor o cualquier otro receptor de la familia B7, y receptores solubles que comprenden zB7R1 y otros ensayos bioquímicos o biológicos descritos en el presente documento.

Los anticuerpos frente a polipéptidos receptores zB7R1 (p. ej., anticuerpos de la SEC ID N° 2 o 5) o fragmentos de los mismos, tales como epítopos antigénicos, se pueden usar para inhibir los efectos inflamatorios de zB7R1 *in vivo*, para uso terapéutico contra artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, endotoxemia, artritis, asma, EII, colitis, artritis psoriásica u otras afecciones inflamatorias inducidas por B7; células de marcate que expresan receptores zB7R1; para aislar polipéptidos receptores solubles que comprenden zB7R1 mediante purificación por afinidad; para ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos receptores solubles que comprenden zB7R1; para detectar o cuantificar receptores solubles que comprenden zB7R1 como marcador de patología o enfermedad subyacente; en procedimientos analíticos usando FACS; para detección selectiva en bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos antiidiotípicos que pueden actuar como agonistas de

zB7R1; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para unir, bloquear, inhibir, reducir o antagonizar la función del receptor zB7R1, o para unir, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1 *in vitro* e *in vivo*. Las marcas o marcadores directos adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, biotina, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; marcas o marcadores indirectos pueden requerir el uso de biotina-avidina u otros pares complemento/anti-complemento como intermedios. En el presente documento, los anticuerpos también pueden conjugarse directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados se usan para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*. Además, los anticuerpos frente a polipéptidos receptores solubles que comprenden zB7R1 o fragmentos de los mismos pueden usarse *in vitro* para detectar polipéptidos receptores que comprenden zB7R1 desnaturalizados o no desnaturalizados, o fragmentos de los mismos, en ensayos, por ejemplo en transferencias de tipo Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

los anticuerpos frente a polipéptidos receptores solubles zB7R1 o receptores solubles zB7R1 homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos son útiles para marcar células que expresan los correspondientes receptores y analizar sus niveles de expresión, para purificación por afinidad, en ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos receptores, procedimientos analíticos que emplean clasificación de células activada por fluorescencia. Además, los anticuerpos divalentes y los anticuerpos antiidiotípicos se pueden usar como agonistas para imitar el efecto de zB7R1.

Los anticuerpos del presente documento también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados se usan para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos o polipéptidos de unión que reconocen polipéptidos receptores solubles zB7R1 o receptores solubles zB7R1 homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos se pueden usar para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una correspondiente molécula anti-complementaria (es decir, un receptor soluble que comprende zB7R1 o unido a la membrana). Más específicamente, los anticuerpos frente a polipéptidos receptores solubles que comprenden zB7R1, o fragmentos bioactivos o porciones de los mismos, se pueden acoplar a moléculas detectables o citotóxicas y liberar a un mamífero que tiene células, tejidos u órganos que expresan el receptor que comprende zB7R1, tal como cánceres que expresan zB7R1.

Moléculas detectables adecuadas pueden unirse directa o indirectamente a polipéptidos que se unen a polipéptidos receptores que comprenden zB7R1, tal como "polipéptidos de unión" (incluidos los péptidos de unión divulgados anteriormente), anticuerpos o fragmentos bioactivos o porciones de los mismos. Moléculas detectables adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden unirse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, ricino, abriño y similares), así como radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (bien unidos directamente al polipéptido o anticuerpo o unidos indirectamente por medio, por ejemplo, de un resto quelante). Los polipéptidos de unión o anticuerpos también se pueden conjugar con fármacos citotóxicos, tales como adriamicina. Para la unión indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica se puede conjugar con un miembro de un par complementario/anticomplementario, en el que el otro miembro se une al polipéptido de unión o porción de anticuerpo. Para estos fines, la biotina/estreptavidina es un ejemplo de par complementario/anticomplementario.

En otra realización, las proteínas de fusión polipéptido de unión-toxina o las proteínas de fusión anticuerpo-toxina se pueden usar para la inhibición o ablación de una célula o tejido diana (por ejemplo para tratar células o tejidos cancerosos). Como alternativa, si el polipéptido de unión tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión al contrarreceptor, más un dominio diana), una proteína de fusión que incluya sólo el dominio diana puede ser adecuada para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula a un tipo de célula o de tejido de interés. En los casos en los que la proteína de fusión que incluye sólo un dominio sencillo incluye una molécula complementaria, la molécula anti-complementaria se puede conjugar con una molécula detectable o citotóxica. Por tanto, dichas proteínas de fusión dominio-molécula complementaria representan un vehículo dirigido genérico para la liberación específica de célula/tejido de conjugados de molécula anti-complementaria-detectable/citotóxica.

Como alternativa, los polipéptidos de unión al receptor zB7R1 o las proteínas de fusión de anticuerpo descritas en el presente documento se pueden usar para potenciar la muerte *in vivo* de tejidos diana estimulando directamente una vía apoptótica modulada por el receptor zB7R1, lo que tiene como resultado la muerte celular de células hiperproliferativas que expresan receptores que comprenden zB7R1.

11. Usos terapéuticos de polipéptidos que tienen actividad zB7R1 o de anticuerpos frente a zB7R1

Las secuencias de aminoácidos que tiene actividad de zB7R1 soluble se pueden usar para modular el sistema inmunológico uniéndose a contrarreceptores de zB7R1, tales como CD155, y, por tanto, evitando la unión del contrarreceptor de zB7R1 al receptor zB7R1 endógeno. Los antagonistas de zB7R1, tales como los anticuerpos anti-zB7R1, también se pueden usar para modular el sistema inmunológico inhibiendo la unión contrarreceptor de zB7R1 al receptor zB7R1 endógeno. De acuerdo con esto, la presente memoria descriptiva describe el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen actividad zB7R1 (tal como polipéptidos de zB7R1 soluble, fragmentos

- polipeptídicos de zB7R1, análogos de zB7R1 (p. ej., anticuerpos antiidiotipo anti-zB7R1) y proteínas de fusión de zB7R1) a un sujeto que carece de una cantidad adecuada de este polipéptido o que produce un exceso del contrarreceptor de zB7R1. Los antagonistas de zB7R1 (p. ej., los anticuerpos anti-zB7R1) también se pueden usar para tratar a un sujeto que produzca un exceso del contrarreceptor de zB7R1 o de zB7R1. Sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos. Por ejemplo, dichos polipéptidos zB7R1 y anticuerpos anti-zB7R1 son útiles en la unión, bloqueo, inhibición, reducción, antagonismo o neutralización de zB7R1 y CD155 (bien por separado o bien juntos), en el tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, artritis psoriásica, artritis, endotoxemia, asma, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis y otras afecciones inflamatorias divulgadas en el presente documento.
- 5 El zB7R1 puede estar implicado en la patología de la psoriasis. La presente invención es, en particular, para tratar la psoriasis mediante la administración de agentes que se unen, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan o neutralizan zB7R1. Los agonistas de zB7R1 son anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos que se unen a zB7R1, por ejemplo anticuerpos anti-zB7R1. Por tanto, los antagonistas evitarán la activación del receptor zB7R1.
- 10 La psoriasis es una de las enfermedades dermatológicas más frecuentes, que afecta hasta el 1-2 por ciento de la población mundial. Es un trastorno cutáneo inflamatorio crónico que se caracteriza por la presencia de pápulas eritematosas nítidamente delineadas y placas redondeadas, cubiertas por escalas de tipo mica plateadas. Las lesiones cutáneas de la psoriasis son pruríticas de forma variable. Las áreas traumatizadas a menudo desarrollan lesiones de psoriasis. Adicionalmente, otros factores externos pueden exacerbar la psoriasis, incluyendo infecciones, estrés y medicamentos, por ejemplo litio, beta-bloqueantes y antipalúdicos.
- 15 La variedad más habitual de psoriasis se denomina de tipo placas. Los pacientes con psoriasis de tipo placas tendrán placas estables de crecimiento lento que permanecen básicamente invariables durante largos periodos de tiempo. Las áreas más habituales para la formación de placas psoriásicas son los codos, las rodillas, la hendidura del glúteo y el cuero cabelludo. La afectación tiende a ser simétrica. La psoriasis inversa afecta a las regiones intertriginosas, incluidas la axila, la ingle, la región submamaria y el ombligo, y también tiende a afectar al cuero cabelludo, las palmas de las manos y las plantas de los pies. Las lesiones individuales son placas nítidamente marcadas, pero pueden estar húmedas debido a su localización. La psoriasis de tipo placas en general se desarrolla lentamente y sigue un curso indolente. Rara vez remite de forma espontánea.
- 20 La psoriasis eruptiva (psoriasis guttata) es más habitual en niños y adultos jóvenes. Se desarrolla de forma aguda en individuos sin psoriasis o en aquéllos con psoriasis de placas crónica. Los pacientes presentan muchas pápulas pequeñas eritematosas y escamosas, con frecuencia tras una infección de las vías respiratorias altas con estreptococos beta-hemolíticos. Los pacientes con psoriasis pueden también desarrollar lesiones pustulosas. Éstas se pueden localizar en las palmas de las manos y las plantas de los pies y pueden estar generalizadas y asociarse con fiebre, malestar, diarrea y artralgias.
- 25 Aproximadamente la mitad de todos los pacientes con psoriasis tienen afectación de las uñas de los dedos de las manos, que aparece como un punteado en las uñas, engrosamiento ungueal o hiperqueratosis subungueal. Aproximadamente del 5 al 10 por ciento de los pacientes con psoriasis tienen síntomas articulares asociados, que se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con afectación de las uñas de los dedos de las manos. Aunque en algunos aparece de forma coincidente la artritis reumatoide clásica, muchos presentan enfermedad articular que entra dentro de una de cinco tipos asociadas con psoriasis: (1) enfermedad limitada a una única o a pocas articulaciones pequeñas (70 por ciento de los casos); (2) una enfermedad similar a artritis reumatoide seronegativa; (3) afectación de las articulaciones interfalángicas distales; (4) artritis destructiva grave con el desarrollo de "artritis mutilante"; y (5) enfermedad limitada a la columna vertebral.
- 30 La psoriasis se puede tratar administrando agentes que actúan como agonistas de zB7R1. Los antagonistas preferidos son un receptor soluble de zB7R1, tal como zB7R1 (SEC ID N° 3) o anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla que se unen a zB7R1 o a su contrarreceptor. Dichos antagonistas se pueden administrar solos o en combinación con otras terapias establecidas, tales como lubricantes, queratolíticos, corticosteroides tópicos, derivados tópicos de la vitamina D, antralina, anti-metabolitos sistémicos, tales como metotrexato, terapia con psoraleno-luz ultravioleta (PUVA), etretinato, isotretinoína, ciclosporina y el derivado tópico de la vitamina D3 calcipotriol. Además, dichos antagonistas se pueden administrar a un individuo por vía subcutánea, intravenosa o transdérmica, usando una crema o Arreche transdérmico que contiene el antagonista. Si se administra por vía subcutánea, el antagonista se puede inyectar en una o más placas psoriásicas. Si se administra por vía transdérmica, los antagonistas se pueden administrar directamente sobre las placas usando una crema, pomada, bálsamo o solución que contiene el antagonista.
- 35 Los agonistas de zB7R1 se pueden administrar a una persona que tenga asma, bronquitis o fibrosis quística, u otra enfermedad pulmonar inflamatoria para tratar la enfermedad. Los antagonistas se pueden administrar por medio de cualquier procedimiento, incluidas las vías intravenosa, subcutánea, lavado bronquial y el uso de inhaladores que contienen el antagonista.
- 40
- 45
- 50
- 55

Por tanto, realizaciones concretas de la presente invención están dirigidas al uso de anticuerpos anti-zB7R1 (como se definen en las reivindicaciones) como agonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias, tales como psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), enfermedad de Crohn, diverticulosis, asma, pancreatitis, diabetes de tipo I (DMDI), cáncer de páncreas, pancreatitis, enfermedad de Graves, cáncer de colon y de intestino, enfermedad autoinmunitaria, sepsis, trasplante de órganos o de médula ósea; inflamación por endotoxemia, traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad del injerto contra el huésped; y en las que se desea inhibición de la inflamación, supresión inmunitaria, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, linfocitos T (incluidas las células Th1 y Th2), supresión de la respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno u otros casos en los que se desea inhibición de zB7R1.

Además, los anticuerpos o polipéptidos de unión que se unen a los polipéptidos de zB7R1 descritos en el presente documento, y los mismos polipéptidos de zB7R1, son útiles para:

Bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la señalización mediante zB7R1 en el tratamiento de la inflamación aguda, la inflamación como resultado de traumatismo, lesión tisular, cirugía, sepsis o infección, y enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis crónica, esplenomegalia, artritis reumatoide, episodios inflamatorios agudos recurrentes (p. ej., tuberculosis) y tratamiento de la amiloidosis y aterosclerosis, enfermedad de Castleman, asma y otras enfermedades asociadas con la inducción de respuesta de fase aguda,

Bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la señalización mediante zB7R1 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como DMDI, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia gravis, artritis reumatoide y EII para evitar o inhibir la señalización en células inmunitarias (p. ej., linfocitos, monocitos, leucocitos) mediante zB7R1 (Hughes C y col., J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Como alternativo, los anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales (AcMo) frente a zB7R1, también se pueden usar como antagonistas para eliminar las células inmunitarias indeseadas para tratar la enfermedad autoinmunitaria. El asma, la alergia y otras enfermedades atópicas se pueden tratar con AcMo contra, por ejemplo, receptores solubles zB7R1 para inhibir la respuesta inmunitaria o deplecionar las células agresoras. Bloquear, inhibir, reducir o antagonizar la señalización mediante zB7R1 usando los polipéptidos y los anticuerpos de la presente invención pueden también ser beneficiosos para enfermedades del páncreas, riñones, hipófisis y células neuronales. También se pueden beneficiar la DMDI, la DMNDI, la pancreatitis y el carcinoma pancreático. El zB7R1 puede servir de diana para terapia con AcMo del cáncer, cuando un AcMo antagonista inhibe el crecimiento del cáncer y está dirigido a la muerte mediada por el sistema inmunológico. (Holliger P y Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998). Los AcMo frente a zB7R1 soluble pueden también ser útiles para tratar nefropatías, tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón, entre otros tejidos), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con LES, DMDI, diabetes de tipo II (DMNID), tumores renales y otras enfermedades.

Actuar como agonistas, potenciar, incrementar o iniciar la señalización mediante zB7R1 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como DMDI, EM, LES, miastenia gravis, artritis reumatoide e EII. Anticuerpos monoclonales y neutralizantes anti-zB7R1 pueden señalar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación o cambiar la producción de citocinas u de proteínas de la superficie celular que mejoran la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de la respuesta de linfocitos T puede desviar una respuesta autoinmunitaria para mejorar la enfermedad (Smith JA y col., J. Immunol. 160:4841-4849, 1998). De forma similar, los anticuerpos monoclonales agonistas anti-zB7R1 se pueden usar para señalar, deplecionar y desviar las células inmunitarias implicadas en la artritis reumatoide, asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización mediante zB7R1 puede también ser beneficiosa para enfermedades del páncreas, el riñón, la hipófisis y células neuronales. También se pueden beneficiar la DMDI, la DMNDI, la pancreatitis y el carcinoma pancreático. El zB7R1 puede servir de diana para terapia con AcMo del cáncer, pancreático, cuando un AcMo de señalización inhibe el crecimiento del cáncer y está dirigido a la muerte mediada por el sistema inmunológico (Tutt, AL y col., J Immunol. 161: 3175-3185, 1998). De forma similar, el carcinoma de células renales se puede tratar con anticuerpos monoclonales frente a receptores solubles que comprenden zB7R1 de la presente invención.

Los polipéptidos de zB7R1 solubles descritos en el presente documento se pueden usar para unirse, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1, por separado o juntos, en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, enfermedad atópica, DMNID, pancreatitis y disfunción renal, como se ha descrito con anterioridad. Una forma soluble de zB7R1 se puede usar para estimular una respuesta de anticuerpo mediada por los linfocitos Th y/o para estimular la producción de IL-4 u otras citocinas por linfocitos u otras células inmunitarias.

Además, la inflamación es una respuesta protectora de un organismo para defenderse de un agente invasor. La inflamación es un acontecimiento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por un lado, la supresión de respuestas inflamatorias puede dejar a un huésped en situación de inmunocompromiso; no obstante, si no se deja sin comprobar, la inflamación puede conducir a complicaciones serias, que incluyen enfermedades

inflamatorias crónicas (p. ej., psoriasis, artritis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria y similares), shock séptico e insuficiencia de múltiples órganos. Es importante el hecho de que estos diversos estados de enfermedad comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto sobre la morbilidad y la mortalidad humanas. Por tanto, está claro que moléculas que están estrechamente implicadas en la coestimulación y/o inhibición de las respuestas inmunitarias, tales como zB7R1, su contrarreceptor y los anticuerpos anti-zB7R1, podrían tener un potencial terapéutico crucial para un gran número de enfermedades humanas y animales, desde el asma y la alergia hasta la autoinmunidad y el shock séptico.

1. Artritis

La artritis, incluida la osteoartritis, la artritis reumatoide, las articulaciones artríticas como resultado de lesiones y similares, son afecciones inflamatorias frecuentes que se beneficiarán del uso terapéutico de proteínas antiinflamatorias, tales como las moléculas zB7R1 de la presente invención. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más frecuentes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que reviste la articulación, que produce dolor, rigidez, calor, enrojecimiento y tumefacción. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación (sinovio) inflamado puede invadir y dañar el hueso y el cartílago, que conduce al deterioro de la articulación y a dolor intenso entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineación, lo que tiene como resultado dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario particularmente caracterizada por inflamación y el posterior daño tisular, que conlleva discapacidad grave y aumenta la mortalidad. En las articulaciones reumatoides se producen localmente diversas citocinas. En numerosos estudios se ha demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citocinas proinflamatorias prototipo, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la progresiva destrucción de la articulación. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa y de IL-1 en pacientes con AR ha conducido a una espectacular mejora de los signos clínicos y biológicos de la inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de la erosión ósea y la destrucción de cartílago. No obstante, a pesar de estos alentadores resultados, un porcentaje significativo de los pacientes no responde a estos agentes, lo que sugiere que otros mediadores también están implicados en la fisiopatología de la artritis (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2): 135-149, 2002). Uno de estos mediadores podría ser una proteína zB7R1 soluble o un anticuerpo anti-zB7R1 y, como tal, una molécula que se une o media a/en zB7R1, tal como B7R1-Fc soluble, B7R1m-VASP CH6 o anticuerpos o parejas de unión tal como se ha descrito en el presente documento podría servir como valiosa terapéutica para reducir la inflamación de la artritis reumatoide y otras enfermedades artríticas.

En la técnica existen varios modelos de animales para la artritis reumatoide. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se asemeja mucho a la artritis reumatoide humana. Dado que la AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, la convierte en un modelo ideal para la detección selectiva de posibles compuestos antiinflamatorios humanos. El modelo de AIC es un modelo bien conocido en ratones que depende tanto de una respuesta inmunitaria como de una respuesta inflamatoria para que se produzca. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de linfocitos B y linfocitos T CD4+ en respuesta al colágeno, que se proporciona como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas tisulares de mediadores de inflamación como consecuencia de la reacción cruzada de algunos de estos anticuerpos con el colágeno nativo de ratón y la activación de la cascada del complemento. Una ventaja del uso del modelo de AIC es que se conocen los mecanismos básicos de la patogenia. Se han identificado los epítopos relevantes de linfocitos T y linfocitos B sobre el colágeno de tipo II y se han determinado varios parámetros inmunológicos (p. ej., hipersensibilidad de tipo retardada y anticuerpos anti-colágeno) e inflamatorios (p. ej., citocinas, quimiocinas y enzimas de degradación de la matriz) relacionados con la artritis mediada por el sistema inmunológico y, por tanto, se pueden usar para evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo en el modelo de AIC (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams y col., *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers y col., *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; y Wang y col., *Immunol.* 92:8955-959, 1995).

Como se muestra en el Ejemplo 21, los niveles de ARNm de B7R1 murino son mayores en las patas afectadas y los ganglios linfáticos drenantes (poplíteos) de ratones con AIC en comparación con los ratones sin AIC, y los niveles están asociados con la gravedad de la enfermedad. Además, un grupo ha mostrado que la liberación de un anticuerpo neutralizante a otro miembro de la familia B7, la proteína homóloga de B7 (B7h), reduce los síntomas en un modelo de AIC de ratón en comparación con ratones control (Iwai y col., *J. Immunol.* 169:4332, 2002), lo que avala la idea de que B7R1-Fc y B7R1m-VASP CH6 solubles pueden ser beneficiosos en el tratamiento de enfermedades humanas, tales como artritis. La administración de un anticuerpo neutralizante anti-B7h redujo los síntomas de artritis en los animales cuando se introdujo profilácticamente o una vez que los síntomas de artritis ya estaban presentes en el modelo (Iwai y col., *J. Immunol.* 169:4332, 2002). Por tanto, B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 se pueden usar para tratar enfermedades humanas específicas, tales como cáncer, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis, endotoxemia, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis y otras afecciones inflamatorias divulgadas en el presente documento.

La administración de polipéptidos que comprenden B7R1 soluble, tal como B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 u otros zB7R1 solubles y proteínas de fusión, a estos ratones del modelo AIC se usa para evaluar el uso de B7R1-Fc soluble para mejorar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad. Además, dado que la inflamación está implicada en la patogenia y progresión de la artritis reumatoide, la administración sistémica o local de polipéptidos que comprenden B7R1, tales como B7R1-Fc, B7R1m-VASP CH6 u otros receptores solubles y anticuerpos anti-zB7R1, y proteínas de fusión, pueden, potencialmente, suprimir la respuesta inflamatoria en la AR. A modo de ejemplo y sin limitaciones, la inyección de 10-200 µg de B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 por ratón (de una a siete veces a la semana durante hasta 4 semanas, aunque sin limitarse a ellas, por vía de administración s.c., i.p o i.m.) puede reducir significativamente la puntuación de la enfermedad (puntuación a la pata, aparición de inflamación o enfermedad). Dependiendo del inicio de la administración de B7R1-Fc (p. ej., antes o en el momento de la inmunización con colágeno o en cualquier punto de tiempo tras la segunda inmunización con colágeno, incluidos los puntos de tiempo en los que la enfermedad ya ha progresado), B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 pueden ser eficaces en la prevención de la artritis reumatoide, así como la prevención de su progresión. Otras posibles terapéuticas incluyen polipéptidos de CD155 o anticuerpos anti-CD155.

2. Endotoxemia

La endotoxemia es una afección grave que normalmente es el resultado de agentes infecciosos, tales como bacterias y otros agentes de enfermedad infecciosa, sepsis, síndrome del shock tóxico o en pacientes inmunocomprometidos sometidos a infecciones oportunistas, y similares. Las proteínas antiinflamatorias terapéuticamente útiles, tales como los polipéptidos de zB7R1 y los anticuerpos de la presente invención, podrían ayudar en la prevención y tratamiento de la endotoxemia en seres humanos y animales. Los polipéptidos de zB7R1, los anticuerpos anti-IL22RA y los anticuerpos anti-IL22 o las parejas de unión podrían servir como terapéutica valiosa para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la endotoxemia.

En la endotoxemia inducida por lipopolisacáridos (LPS) participan muchos de los mediadores proinflamatorios que producen efectos patológicos en las enfermedades infecciosas y la endotoxemia inducida por lipopolisacáridos en roedores se usa ampliamente y es un modelo aceptable para estudiar los efectos farmacológicos de posibles agentes proinflamatorios o inmunomoduladores. El LPS, producido en bacterias gramnegativas, es un agente causante importante en la patogenia del shock séptico (Glausner y col., Lancet 338:732, 1991). De hecho, un estado similar al shock se puede inducir experimentalmente mediante una única inyección de LPS en los animales. Las moléculas producidas por las células que responden al LPS pueden dirigirse a patógenos directa o indirectamente. Aunque estas respuestas biológicas protegen al huésped contra patógenos invasores, pueden también causar daños. Por tanto, la estimulación masiva de la inmunidad innata, que se produce como resultado de una infección grave por bacterias gramnegativas, conduce a un exceso de producción de citocinas y otras moléculas y al desarrollo de un síndrome fatal, síndrome del shock séptico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia de múltiples órganos (Dumitru y col. Cell 103:1071-1083, 2000).

Los efectos tóxicos del LPS se relacionan, en su mayoría, con la activación de macrófagos, que conduce a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, el TNF parece desempeñar un papel crucial, como indica la prevención de la toxicidad por LPS mediante la administración de anticuerpos neutralizantes anti-TNF (Beutler y col., Science 229:869, 1985). Está bien establecido que la inyección prolongada de LPS de E.coli en un ratón C57B1/6 tendrá como resultado incrementos significativos de IL-6, TNF-alfa, IL-1 y proteínas de fase aguda circulantes (por ejemplo, SAA) aproximadamente 2 horas después de la inyección. La toxicidad del LPS parece estar mediada por estas citocinas, ya que la inmunización pasiva contra estos mediadores puede tener como resultado una disminución de la mortalidad (Beutler y col., Science 229:869, 1985). Las posibles estrategias de inmunointervención para la prevención y/o tratamiento del shock séptico incluyen AcMo anti-TNF, antagonistas del receptor de la IL-1, LEF, IL-10 y G-CSF.

La administración de anticuerpos anti-zB7R1 y otros zB7R1 solubles y proteínas de fusión a estos modelos inducidos con LPS se puede usar para evaluar el uso de zB7R1 para aliviar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad inducida por LPS.

3. Enfermedad intestinal inflamatoria EII

En Estados Unidos, aproximadamente 500.000 personas sufren enfermedad intestinal inflamatoria (EII) que puede afectar al colon y al recto (colitis ulcerosa) o a ambos, al intestino delgado y grueso (enfermedad de Crohn). La patogenia de estas enfermedades no está clara, pero implica inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos de zB7R1, anticuerpos anti-zB7R1 o parejas de unión, podrían servir como valiosa terapéutica para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la EII y enfermedades relacionadas.

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, normalmente denominado colon, que se caracteriza por inflamación y ulceración de la mucosa o revestimiento interno del colon. Esta inflamación hace que el colon evacue con frecuencia, lo que tiene como resultado diarrea. Los síntomas incluyen heces sueltas y calambres abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de la CU se desconoce, recientes investigaciones sugieren que las defensas naturales del cuerpo están funcionando contra proteínas del cuerpo que el cuerpo piensa que son extrañas (una "reacción autoinmunitaria"). Quizá porque se asemejan a las

proteínas bacterianas del intestino, estas proteínas pueden instigar o estimular el proceso inflamatorio que comienza destruyendo el revestimiento del colon. Como el revestimiento del colon se destruye, se forman úlceras que liberan moco, pus y sangre. Normalmente, la enfermedad comienza en la zona rectal y, en última instancia, se puede extender a través de todo el intestino grueso. Episodios repetidos de inflamación conducen a un engrosamiento de la pared del intestino y el recto con tejido cicatricial. Con la enfermedad grave se puede producir la muerte del tejido del colon o sepsis. Los síntomas de colitis ulcerosa varían de intensidad y su inicio puede ser gradual o repentino. Los ataques pueden estar provocados por muchos factores, incluidas las infecciones respiratorias o el estrés.

Aunque actualmente no se dispone de cura para la CU, los tratamientos se centran sobre la supresión del proceso inflamatorio anómalo en el revestimiento del colon. Los tratamientos que incluyen inmunosupresores corticosteroides (p. ej., azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos están disponibles para tratar la enfermedad. No obstante, el uso a largo plazo de inmunosupresores, tales como corticosteroides y azatioprina, puede tener como resultado efectos secundarios graves, incluidos adelgazamiento de los huesos, cataratas, infección y efectos sobre el hígado y la médula ósea. En los pacientes en los que las terapias actuales no tienen éxito, la cirugía es una opción. La cirugía implica la extracción de todo el colon y el recto.

Hay varios modelos animales que pueden imitar parcialmente a la colitis ulcerosa crónica. El modelo más usado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico/etanol (TNBS), que induce la inflamación crónica y ulceración del colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles mediante instilación intrarrectal, induce respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en la mucosa del colon, conduciendo en este caso a una inflamación mucosa masiva caracterizada por una densa infiltración de linfocitos T y macrófagos a lo largo de toda la pared del intestino grueso. Además, este cuadro histopatológico se acompaña del cuadro clínico de pérdida de peso progresiva (emaciación), diarrea sanguinolenta, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath y col. Intern. Rev. Immunol. 19:51-62, 2000).

Otro modelo de colitis usa dextrano sulfato sódico (DSS), que induce una colitis aguda manifestada por diarrea sanguinolenta, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente mediante infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daños en las criptas focales y ulceración epitelial. Se piensa que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico del DSS sobre el epitelio y mediante fagocitosis de las células de la lámina propia y producción de TNF-alfa e IFN-gamma. A pesar de su uso común, varios problemas sobre los mecanismos del DSS en cuanto a la relevancia para la enfermedad humana siguen sin resolver. El DSS se considera un modelo independiente de linfocitos T porque se observa en animales deficientes en linfocitos T tales como ratones SCID.

La administración de anticuerpos anti-zB7R1 y otros zB7R1 solubles y proteínas de fusión a estos modelos de TNBS o DSS se puede usar para evaluar el uso de zB7R1 para aliviar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad gastrointestinal. Además, los resultados que muestran inhibición de la señalización de los linfocitos T por zB7R1 proporcionan pruebas de concepto de que otros antagonistas de zB7R1, tales como zB7R1 o anticuerpos frente a los mismos, también se pueden usar para aliviar los síntomas en los modelos de colitis/EII y alterar el curso de la enfermedad.

4. Psoriasis

La psoriasis es una afección cutánea crónica que afecta a más de siete millones de americanos. La psoriasis se produce cuando nuevas células de la piel crecen de forma anómala, que da lugar a parches de piel inflamada, tumefacta y escamosa en los que la piel no se ha desprendido con la suficiente rapidez. La psoriasis en placas, la forma más frecuente, se caracteriza por parches inflamados de piel ("lesiones") cubiertos por escamas blancas plateadas. La psoriasis puede limitarse a pocas placas o afectar a áreas de moderadas a extensas de piel, apareciendo con más frecuencia sobre el cuero cabelludo, las rodillas, los codos y el tronco. Aunque es muy visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogenia de las enfermedades implica la inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos de zB7R1, anticuerpos anti-zB7R1 o anticuerpos anti-IL-22 y anti zB7R1 o parejas de unión, podrían servir como valiosa terapéutica para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la psoriasis, otras enfermedades cutáneas inflamatorias, alergias de piel y de la mucosa y enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por los linfocitos T de la piel que produce molestias considerables. Es una enfermedad para la que no hay cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta a aproximadamente el dos por ciento de las poblaciones de Europa y Norteamérica. Aunque los individuos con psoriasis leve a menudo pueden controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes de todo el mundo requieren terapia inmunosupresora ultravioleta o sistémica. Por desgracia, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes normalmente sufren recurrencia de la psoriasis y, en algunos casos, rebote, poco después de detener la terapia inmunosupresora.

Además, los anticuerpos anti-zB7R1 y los receptores solubles zB7R1 de la presente invención se pueden usar en la prevención y la terapia contra la pérdida de peso asociada con una serie de enfermedades inflamatorias descritas en el presente documento, así como para el cáncer (p. ej., quimioterapia y caquexia) y enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la pérdida de peso intensa es un marcador clave asociado con modelos de septicemia, EM, AR y modelos

tumorales. Además, la pérdida de peso es un parámetro clave para muchas enfermedades humanas, incluidas cáncer, enfermedad infecciosa y enfermedad inflamatoria. Los anticuerpos anti-zB7R1 y antagonistas de zB7R1, tal como los receptores zB7R1 solubles y anticuerpos de los mismos de la presente invención se pueden analizar para determinar su capacidad para prevenir y tratar la pérdida de peso en ratones inyectados con adenovirus de zB7R1 descritos en el presente documento. En la técnica se conocen procedimientos de determinar un régimen profiláctico o terapéutico para dichos antagonistas de zB7R1 y pueden determinarse usando los procedimientos descritos en el presente documento.

Los polipéptidos receptores solubles de zB7R1 y los anticuerpos de los mismos también se pueden usar en sistemas diagnósticos para la detección de niveles circulantes de zB7R1 o contrarreceptores de zB7R1 y en la detección de zB7R1 asociado con la respuesta inflamatoria de fase aguda. En una realización relacionada, los anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a los receptores zB7R1 solubles de la presente invención se pueden usar para detectar polipéptidos receptores circulantes; por el contrario, los propios receptores zB7R1 solubles se pueden usar para detectar polipéptidos de zB7R1 de acción local o circulantes. Niveles elevados o disminuidos del contrarreceptor de zB7R1 o polipéptidos de zB7R1 pueden ser indicativos de afecciones patológicas, incluida inflamación o cáncer. Además, la detección de proteínas o moléculas de fase aguda, tal como zB7R1, puede ser indicativa de una afección inflamatoria crónica en ciertos estados de enfermedad (p. ej., psoriasis, artritis reumatoide, colitis, EII). La detección de dichas afecciones sirve para ayudar al diagnóstico de enfermedades, así como para ayudar al médico a elegir la terapia adecuada.

Por ejemplo, anticuerpos neutralizantes frente a zB7R1 incluyen anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales neutralizantes que se pueden unir a epítomos antigénicos de zB7R1 y neutralizar la actividad de zB7R1. De acuerdo con esto, los péptidos y polipéptidos portadores de epítomos antigénicos de zB7R1 son útiles para producir anticuerpos que se unen a los polipéptidos de zB7R1 descritos en el presente documento, así como para identificar y efectuar detección selectiva de anticuerpos monoclonales anti-zB7R1 que son neutralizantes y que pueden unirse, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1. Dichos anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente invención se pueden unir a un epítomo antigénico de zB7R1.

Además de otros modelos de enfermedad descritos en el presente documento, la actividad de anticuerpos anti-zB7R1 sobre el tejido inflamatorio derivado de lesiones psoriásicas humanas se puede medir *in vivo* usando un modelo de ratón inmunodeficiente grave combinado (SCID). Se han desarrollado varios modelos de ratones en los que células humanas se implantan en ratones inmunodeficientes (en conjunto denominados modelos de xenoinjerto); véase, por ejemplo, Cattan AR, Douglas E, Leuk. Res. 18:513-22, 1994 y Flavell, DJ, Hematological Oncology 14:67-82, 1996. Como modelo de xenoinjerto *in vivo* para psoriasis, tejido cutáneo psoriásico humano se implanta en el modelo de ratón SCID y se expone a un antagonista adecuado. Además, otros modelos animales de psoriasis de la técnica se pueden usar para evaluar antagonistas de zB7R1, tal como injertos cutáneos psoriásicos implantados en un modelo de ratón AGR129 y expuestos a un antagonista adecuado (véase, por ejemplo, Boyman, O. y col., J. Exp. Med. Publicación Online nº 20031482, 2004, incorporada en el presente documento por referencia). En este modelo se pueden usar anticuerpos anti-zB7R1 que se unen, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan o neutralizan la actividad de zB7R1 son antagonistas preferidos, no obstante, los anticuerpos anti-zB7R1 (solos o en combinación con otros antagonistas de B7), zB7R1 soluble, así como otros antagonistas de zB7R1. De forma similar, en el modelo SCID se pueden usar tejidos o células derivados de colitis humana, EII, artritis u otras lesiones inflamatorias para evaluar las propiedades antiinflamatorias de los antagonistas de zB7R1 descritos en el presente documento.

Las terapias diseñadas para abolir, retrasar o reducir la inflamación usando anticuerpos anti-zB7R1 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes se pueden analizar mediante la administración de anticuerpos anti-zB7R1 o compuestos de zB7R1 solubles a ratones SCID portadores de tejido inflamatorio humano (p. ej., lesiones psoriásicas y similares) u otros modelos descritos en el presente documento. La eficacia del tratamiento se mide y evalúa estadísticamente como el efecto antiinflamatorio incrementado en la población tratada en el tiempo usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de procedimientos incluyen, entre otros, medir, por ejemplo, en un modelo de psoriasis, el engrosamiento epidérmico, el número de células inflamatorias de la dermis superior y los grados de paraqueratosis. Dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Por ejemplo, véase Zeigler, M y col. Lab Invest 81:1253, 2001; Zollner, T. M. y col. J. Clin. Invest. 109:671, 2002; Yamanaka, N. y col. Microbio.1 Immunol. 45:507, 2001; Raychaudhuri, S. P. y col. Br. J. Dermatol. 144:931, 2001; Boehncke, W. H y col. Arch. Dermatol. Res. 291:104, 1999; Boehncke, W. H y col., J. Invest. Dermatol. 116:596, 2001; Nickoloff, B. J. y col. Am. J. Pathol. 146: 580, 1995; Boehncke, W. H y col., J. Cutan. Pathol. 24:1, 1997; Sugai, J., M. y col., J. Dermatol. Sci. 17:85, 1998; y Villadsen L.S. y col., J. Clin. Invest. 112: 1571, 2003. La inflamación también se puede controlar en el tiempo usando procedimientos bien conocidos, tales como citometría de flujo (o PCR) para cuantificar el número de células inflamatorias o lesionales presentes en una muestra, puntuación (pérdida de peso, diarrea, hemorragia rectal, longitud del colon) para EII, puntuación de la enfermedad en las patas y puntuación de la inflamación para el modelo de AIC AR. Por ejemplo, estrategias terapéuticas adecuadas para analizar en dicho modelo incluyen tratamiento directo usando anticuerpos anti-zB7R1, otros antagonistas de zB7R1 (por separado o juntos con otros antagonistas de B7) o conjugados relacionados o antagonistas basados en romper la interacción de los anticuerpos anti-zB7R1 con zB7R1 o para terapias basadas en células usando anticuerpos anti-zB7R1 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes.

Además, la psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica que se asocia con queratinocitos epidérmicos hiperplásicos y células mononucleares infiltrantes, incluidos linfocitos T CD4+ de memoria, neutrófilos y macrófagos (Christophers, Int. Arch. Allergy Immunol., 110: 199, 1996). Actualmente se cree que los antígenos ambientales desempeñan un papel significativo en el inicio y la contribución a la patología de la enfermedad. No obstante, es la pérdida de la tolerancia a los autoantígenos lo que se piensa que participa en la patología de la psoriasis. Se piensa que las células dendríticas y los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel importante en la presentación antigénica y el reconocimiento que media en la respuesta inmunitaria, que conduce a la patología. Recientemente se ha desarrollado un modelo de psoriasis basado en el modelo de transferencia CD4+CD45RB (Davenport y col., Internat. Immunopharmacol., 2:653-672). Los anticuerpos anti-zB7R1 de la presente invención, o zB7R1 soluble, se administran a los ratones. La inhibición de las puntuaciones de enfermedad (lesiones cutáneas, citocinas inflamatorias) indica la eficacia de los antagonistas de zB7R1 en la psoriasis, por ejemplo anticuerpos anti-zB7R1 o receptores zB7R1 solubles u otros antagonistas tales como los anticuerpos contra el contrarreceptor de zB7R1.

5. Dermatitis atópica

La DA es una enfermedad inflamatoria crónica frecuente que se caracteriza por citocinas hiperactivadas de la subpoblación 2 de linfocitos T colaboradores (Th2). Aunque la etiología exacta de la DA se desconoce, se ha implicado a múltiples factores, incluidas las respuestas inmunitarias de Th2 hiperactivos, autoinmunidad, infección, alérgenos y predisposición genética. Las características clave de la enfermedad incluyen xerosis (sequedad de la piel), prurito (picor de la piel), conjuntivitis, lesiones cutáneas inflamatorias, infección por *Staphylococcus aureus*, eosinofilia elevada en sangre, elevación de la IgE e IgG1 en suero, y dermatitis crónica con infiltración de linfocitos T, mastocitos, macrófagos y eosinófilos. Se ha reconocido que la colonización o infección con *S. aureus* exacerba la DA y perpetúa la cronicidad de esta enfermedad de la piel.

La DA a menudo se encuentra en pacientes con asma y rinitis alérgica y, con frecuencia, es la manifestación inicial de la enfermedad alérgica. Aproximadamente el 20 % de la población de los países occidentales sufren estas enfermedades alérgicas y la incidencia de la DA en los países desarrollados está aumentando por motivos desconocidos. La DA normalmente comienza en la infancia y a menudo persiste a través de la adolescencia y hasta la edad adulta. Los tratamientos actuales de la DA incluyen corticosteroides tópicos, ciclosporina A oral, inmunosupresores no corticosteroides tales como tacrolímús (FK506 en forma de pomada) e interferón gamma. A pesar de la variedad de tratamientos para la DA, los síntomas de muchos pacientes no mejoran o presentan reacciones adversas a medicamentos, lo que demanda la búsqueda de otros agentes terapéuticos más eficaces. Los anticuerpos anti-zB7R1 de la presente invención se pueden usar para neutralizar zB7R1 en el tratamiento de enfermedades humanas específicas, tales como dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias y otras afecciones inflamatorias divulgadas en el presente documento.

Para el uso farmacéutico, los anticuerpos anti-zB7R1 de la presente invención se formulan para liberación para liberación parenteral, en particular intravenosa o subcutánea, de acuerdo con procedimientos convencionales. La administración intravenosa será mediante inyección en bolo, liberación controlada, usando, por ejemplo, mini bombas u otra tecnología adecuada, o mediante infusión en un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán una proteína hematopoyética en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5 % en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tampón, albúmina, para prevenir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales etc. Cuando se usa dicha terapia de combinación, las citocinas se pueden combinar en una formulación única o se puede administrar en formulaciones separadas. En la técnica se conocen bien procedimientos de formulación y se divulgan en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990. En general, las dosis terapéuticas estarán en el intervalo de 0,0a 100 mg/kg de peso del paciente al día, preferentemente 0,5-20 mg/kg al día, determinando la dosis exacta el médico de acuerdo con los patrones aceptados teniendo en cuenta la naturaleza y la gravedad de la afección, las características de los pacientes etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel del experto en la técnica. Normalmente, las proteínas se administrarán durante un periodo de hasta 28 días tras la quimioterapia o trasplante de médula ósea o hasta que se alcance un recuento de plaquetas de $>20.000/\text{mm}^3$, preferentemente $>50.000/\text{mm}^3$. Con más frecuencia, las proteínas se administrarán en una semana o menos, a menudo durante un periodo de uno a tres días. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de zB7R1 soluble o anticuerpos anti-zB7R1 de la presente invención es una cantidad suficiente para producir un incremento clínicamente significativo en la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras linfoides o mieloides, que se manifestará como un incremento de los niveles circulantes de las células maduras (p. ej., plaquetas o neutrófilos). Por tanto, el tratamiento de los trastornos de las plaquetas continuará hasta alcanzar un recuento de plaquetas de al menos $20.000/\text{mm}^3$, preferentemente $>50.000/\text{mm}^3$. El zB7R1 soluble o los anticuerpos anti-zB7R1 de la presente invención también se pueden administrar en combinación con otras citocinas, tales como IL-3, IL-6 e IL-11, el factor de células madre, eritropoyetina, G-CSF y GM-CSF. En los regímenes de las terapias de combinación, las dosis diarias de otras citocinas serán, en general: EPO, 150 U/kg; GM-CSF, 5-15 1g/kg; IL-3, 1-5 1g/kg; y G-CSF, 1-25 1g/kg. Por ejemplo, la terapia de combinación con EPO está indicada en pacientes anémicos con niveles bajos de EPO.

En general, la dosis de zB7R1 soluble (o análogo o proteína de fusión de zB7R1) o de anticuerpos anti-zB7R1 administrada variará en función de factores tales como la edad del paciente, el peso, la altura, el sexo, el estado

médico general y el historial médico anterior. Normalmente es deseable proporcionar al receptor una dosis de zB7R1 soluble o de anticuerpos anti-zB7R1 que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque según lo dicten las circunstancias también se puede administrar una dosis menor o mayor.

- 5 La administración de zB7R1 soluble o de anticuerpos anti-zB7R1 a un sujeto puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleurales, intratecal, mediante perfusión a través de un catéter regional o mediante inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas mediante inyección, la administración puede ser mediante infusión continua o mediante uno o múltiples bolos.

10 Vías de administración adicionales incluyen oral, mucosa-membrana, pulmonar y transcutánea. La liberación oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteínicas, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una liberación intranasal se pone de manifiesto mediante un modo tal como la administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Se pueden preparar partículas secas o líquidas que comprenden zB7R1 y se inhalan con la ayuda de dispensadores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (p. ej., Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16:343 (1998); Patton y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). Esta estrategia se ilustra con el sistema de gestión de la diabetes AERZ, que es un inhalador electrónico manual que libera insulina en aerosol en los pulmones. Los estudios han mostrado que las proteínas tan grandes como de 48.000 kDa se han liberado sobre la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, lo que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitragotri y col., *Science* 269:850 (1995)). La liberación transdérmica usando electroporación proporciona otro medio de administrar una molécula que tiene actividad de unión de zB7R1 (Potts y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

25 Se puede formular una composición farmacéutica que comprende un zB7R1 soluble o un anticuerpo anti-zB7R1 de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, de modo que las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19 Edición (Mack Publishing Company 1995).

35 Para los fines de terapia, el zB7R1 soluble o las moléculas anticuerpos anti-zB7R1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de una molécula terapéutica de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia tiene como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia la respuesta inflamatoria.

40 Una composición farmacéutica que comprende zB7R1 (o análogo o proteína de fusión de zB7R1) o anticuerpos anti-zB7R1 se puede proporcionar en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables y suspensiones orales. Ejemplos de formas sólidas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997)); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)).

50 Los liposomas proporcionan un medio para liberar polipéptidos terapéuticos a un sujeto mediante administración intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o administración oral, inhalación o intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodea compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares y, como resultado, los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables. En función del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar de tamaño, con diámetros que varían de 0,02 μm a más de 10 μm . Diversos agentes se pueden encapsular en liposomas. Reparto de los agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de los agentes hidrófilos en el(los) espacio(s) acuoso(s) interno(s), (véase, por ejemplo Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de bicapas, la composición lipídica, así como las características de carga y de superficie de los liposomas.

- Los liposomas se pueden adsorber en prácticamente cualquier tipo de célula y liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma adsorbido se puede ser endocitado por las células fagocíticas. Tras la endocitosis se produce la degradación dentro de los lisosomas de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Tras la administración intravenosa, normalmente, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 μm) son captados por las células del sistema retículo-endotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en los pulmones. Esta captación preferencial de los liposomas más pequeños por las células del sistema retículo-endotelial se ha usado para liberar agentes quimioterapéuticos a los macrófagos y a los tumores hepáticos.
- El sistema retículo-endotelial puede rodearse mediante varios procedimientos, incluidos saturación con dosis grandes de partículas de liposomas o inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha demostrado que la incorporación de fosfolípidos derivados con glicolípidos o polietilenglicol en las membranas de los liposomas tiene como resultado una captación significativamente reducida por el sistema retículo-endotelial (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).
- Los liposomas también se pueden preparar para apuntar a células u órganos concretos variando la composición en fosfolípidos o mediante la inserción de receptores o contrarceptores en los liposomas. Por ejemplo, los liposomas, preparados con un contenido elevado de un tensoactivo no iónico, se han usado para dirigirse al hígado (Hayakawa y col., patente japonesa 04-244,018; Kato y col., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino etoxilado hidrogenado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío y, después, reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha demostrado que una formulación en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) se puede dirigir al hígado (Shimizu y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).
- Como alternativa, varios contrarceptores dirigidos se pueden unir a la superficie del liposoma, tal como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hidratos de carbono, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas se pueden modificar con derivados de galactosilípido de tipo ramificado para apuntar a los receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259(1997)). De forma similar, Wu y col., *Hepatology* 27:772(1998), han mostrado que marcando los liposomas con asialofetuína se producía una semivida en plasma del liposoma más corta y potenciaba considerablemente la captación de liposomas marcados con asialofetuína por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosilípido de tipo ramificado se puede inhibir mediante preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de seroalbúmina poliacetilada proporcionan otra estrategia para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Además, Geho, y col., patente de EE.UU. n.º 4.603.044, describen un sistema de liberación de vesículas liposomales dirigidas a los hepatocitos que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.
- En una estrategia más general para los tejidos, las células diana se marcan previamente con anticuerpos biotinilados específicos de un contrarceptor expresado por la célula diana (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Tras la eliminación del plasma de los anticuerpos libres se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otra estrategia, los anticuerpos dirigidos están unidos directamente en los liposomas (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).
- Los polipéptidos y anticuerpos se pueden encapsular dentro de los liposomas usando técnicas estándar de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson y col., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990), y Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," en *Liposome Technology*, 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).
- Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener niveles sistémicos elevados de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables, tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en las que hay proteínas atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus y col., *Science* 281:1161 (1998); Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos químicamente modificados que tienen actividad de unión de zB7R1, tal como receptores zB7R1 solubles monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos, y antagonistas de zB7R1, por ejemplo anticuerpos anti-zB7R1 o polipéptidos de unión, o anticuerpos neutralizantes anti-zB7R1, en el que un polipéptido está unido con un polímero, como se ha tratado anteriormente.

5 Los expertos en la técnica pueden concebir otras formas de dosificación, como se muestra en, por ejemplo, Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro(ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19 Edición (Mack Publishing Company 1995), y en Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

10 Como ilustración, se pueden suministrar composiciones farmacéuticas en forma de un kit que comprende un contenedor que comprende un polipéptido con un dominio extracelular de zB7R1, por ejemplo receptores solubles zB7R1 monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos, o un antagonista de zB7R1 (p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un polipéptido de zB7R1 o anticuerpo neutralizante anti-zB7R1). Se pueden proporcionar polipéptidos terapéuticos en forma de una solución inyectable para una o múltiples dosis o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispensador de polvo seco, un generador de aerosoles líquidos o un nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede además comprender información escrita sobre indicaciones y usos de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir una declaración de que la composición de zB7R1 está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a zB7R1.

20 Una composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-zB7R1 o parejas de unión (o fragmentos de anticuerpos anti-zB7R1, fusiones de anticuerpos, anticuerpos humanizados y similares) o el receptor zB7R1 soluble, se puede proporcionar en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Ejemplos de formas sólidas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., *Pharm: Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997)); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas,, otras aplicaciones topológicas y similares.

30 Los liposomas proporcionan un medio para liberar polipéptidos terapéuticos a un sujeto mediante administración intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o administración oral, inhalación o intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodea compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares y, como resultado, los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables. En función del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar de tamaño, con diámetros que varían de 0,02 μm a más de 10 μm . Diversos agentes se pueden encapsular en liposomas: Reparto de los agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de los agentes hidrófilos en el(los) espacio(s) acuoso(s) interno(s), (véase, por ejemplo Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de bicapas, la composición lipídica, así como las características de carga y de superficie de los liposomas.

45 Los liposomas se pueden adsorber en prácticamente cualquier tipo de célula y liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma adsorbido se puede ser endocitado por las células fagocíticas. Tras la endocitosis se produce la degradación dentro de los lisosomas de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Tras la administración intravenosa, normalmente, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 μm) son captados por las células del sistema retículo-endotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en los pulmones. Esta captación preferencial de los liposomas más pequeños por las células del sistema retículo-endotelial se ha usado para liberar agentes quimioterapéuticos a los macrófagos y a los tumores hepáticos.

55 El sistema retículo-endotelial puede rodearse mediante varios procedimientos, incluidos saturación con dosis grandes de partículas de liposomas o inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha demostrado que la incorporación de fosfolípidos derivados con glicolípidos o polietilenglicol en las membranas de los liposomas tiene como resultado una captación significativamente reducida por el sistema retículo-endotelial (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Los liposomas también se pueden preparar para apuntar a células u órganos concretos variando la composición en fosfolípidos o mediante la inserción de receptores o contrarceptores en los liposomas. Por ejemplo, los liposomas, preparados con un contenido elevado de un tensioactivo no iónico, se han usado para dirigirse al hígado (Hayakawa y col., patente japonesa 04-244,018; Kato y col., Biol. Pharm. Bull. 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino etoxilado hidrogenado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío y, después, reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha demostrado que una formulación en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) se puede dirigir al hígado (Shimizu y col., Biol. Pharm. Bull. 20:881 (1997)).

Como alternativa, varios contrarceptores dirigidos se pueden unir a la superficie del liposoma, tal como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hidratos de carbono, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas se pueden modificar con derivados de galactosilípido de tipo ramificado para apuntar a los receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst. 14:287 (1997); Murahashi y col., Biol. Pharm. Bull. 20:259 (1997)). De forma similar, Wu y col., Hepatology 27:772(1998), han mostrado que marcando los liposomas con asialofetuína se producía una semivida en plasma del liposoma más corta y potenciaba considerablemente la captación de liposomas marcados con asialofetuína por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosilípido de tipo ramificado se puede inhibir mediante preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., Biol. Pharm. Bull. 20:259 (1997)). Los liposomas de seroalbúmina poliacetilada proporcionan otra estrategia para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:11681 (1997)). Además, Geho, y col., patente de EE.UU. n.º 4.603.044, describen un sistema de liberación de vesículas liposomales dirigidas a los hepatocitos que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

En una estrategia más general para los tejidos, las células diana se marcan previamente con anticuerpos biotinilados específicos de un contrarceptor expresado por la célula diana (Harasym y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99 (1998)). Tras la eliminación del plasma de los anticuerpos libres se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otra estrategia, los anticuerpos dirigidos están unidos directamente en los liposomas (Harasym y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99 (1998)).

Los anticuerpos neutralizantes anti-zB7R1 y parejas de unión con actividad de unión zB7R1, o el receptor zB7R1 soluble, pueden encapsularse dentro de liposomas usando técnicas estándar de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., Infect. Immun. 31:1099 (1981), Anderson y col., Cancer Res. 50: 1853 (1990), y Cohen y col., Biochim. Biophys. Acta 1063:95 (1991), Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," en Liposome Technology, 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., Meth. Enzymol. 149: 124 (1987)). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., Biochim. Biophys. Acta 1150:9 (1993)).

Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener niveles sistémicos elevados de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables, tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en las que hay proteínas atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem. 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus y col., Science 281:1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16:153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2:548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., Pharm. Biotechnol. 10:167 (1997)).

La presente invención también contempla anticuerpos anti-zB7R1 químicamente modificados unidos a un polímero, como se ha tratado anteriormente.

Los expertos en la técnica pueden concebir otras formas de dosificación, como se muestra en, por ejemplo, Ansel y Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19 Edición (Mack Publishing Company 1995), y en Ranade y Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996).

La presente invención contempla composiciones de anticuerpos anti-zB7R1 y procedimientos *in vitro* y usos terapéuticos que comprenden un anticuerpo, tal como se ha definido en las reivindicaciones. Dichas composiciones pueden comprender, además, un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Ejemplos de vehículos incluyen agua, solución tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

12. Producción de ratones transgénicos

Los ácidos nucleicos que codifican zB7R1 o formas modificadas de los mismos también se pueden usar para generar animales transgénicos o animales "defectivos" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y detección selectiva de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (p. ej., un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgen, en el que el transgen se introdujo en el animal o en un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo embrionario. Un transgen es un ADN que está integrado en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica una proteína zB7R1 se puede usar para clonar ADN que codifica una proteína zB7R1 de acuerdo con técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan el ADN deseado. Procedimientos para generar animales transgénicos, en particular animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.736.866 y 4.870.009.

Como alternativa, se pueden usar homólogos no humanos de zB7R1 para construir un animal "defectivo" que tenga un gen defectuoso o alterado que codifica una proteína zB7R1 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno y un ADN genómico alterado que codifica zB7R1, que se introduce en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica una proteína zB7R1 se puede usar para clonar ADN genómico que codifica una proteína zB7R1 de acuerdo con técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica una proteína zB7R1 se puede delecionar o sustituir con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede usar para monitorizar la integración. Normalmente, en el vector se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3'). Véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (p. ej., mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN re ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno. Véase, por ejemplo, Li y col., *Cell*, 69:915 (1992). Después, las células seleccionadas se inyectan en un blastocisto de un animal (p. ej., un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación. Véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pág. 113-152. Un embrión quimérico puede implantarse después en un animal hembra huésped pseudopreñada adecuada y el embrión se lleva a término para crear un animal "defectivo". La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y usar para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales defectivos se pueden caracterizar por, por ejemplo, su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia de la proteína zB7R1. Se entiende que los modelos descritos en el presente documento se pueden variar. Por ejemplo, se pueden formar modelos "no defectivos" o los modelos se pueden basar en células en lugar de en modelos animales.

La invención se ilustra de forma adicional mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

Gao, Zeren

40 Levin, Steven D.

Bilsborough, Janine

West, James W.'

Brandt, Cameron S.

Ramsdell, Fredrick J.

45 Howard, Edward D.

Chadwick, Eric M.

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA MODULAR LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS

50 <130> 05-12PC

<140> No asignado todavía

<141> 2006-05-12

55 <150> 60/680,374

<151> 2005-05-12

<150> 60/791,626

<151> 2006-04-13

60

<150> 60/795,005

<151> 2006-04-26

<160> 67

5 <170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

<210> 1

<211> 902

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (11)...(745)

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (289)...(289)

<223>n = c ort

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (359)...(359)

<223>n = a org

25

400> 1

```

gggcagaagc atg cgc tgg tgt ctc ctc ctg atc tgg gcc cag ggg ctg 49
          Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu
                1             5                 10
    
```

```

agg cag gct ccc ctc gcc tca gga atg atg aca ggc aca ata gaa aca 97
Arg Gln Ala Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr
    15             20                 25
    
```

30

```

acg ggg aac att tct gca gag aaa ggt ggc tct atc atc tta caa tgt 145
Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys
 30 35 40 45
cac ctc tcc tcc acc acg gca caa gtg acc cag gtc aac tgg gag cag 193
His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln
 50 55 60
cag gac cag ctt ctg gcc att tgt aat gct gac ttg ggg tgg cac atc 241
Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile
 65 70 75
tcc cca tcc ttc aag gat cga gtg gcc cca ggt ccc ggc ctg ggc ctn 289
Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu
 80 85 90
acc ctc cag tcg ctg acc gtg aac gat aca ggg gag tac ttc tgc atc 337
Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile
 95 100 105
tat cac acc tac cct gat ggg ncg tac act ggg aga atc ttc ctg gag 385
Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Xaa Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu
110 115 120 125
gtc cta gaa agc tca gtg gct gag cac ggt gcc agg ttc cag att cca 433
Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
130 135 140
ttg ctt gga gcc atg gcc gcg acg ctg gtg gtc atc tgc aca gca gtc 481
Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val
145 150 155
atc gtg gtg gtc gcg ttg act aga aag aag aaa gcc ctc aga atc cat 529
Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His
160 165 170
tct gtg gaa ggt gac ctc agg aga aaa tca gct gga cag gag gaa tgg 577
Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp
175 180 185
agc ccc agt gct ccc tca ccc cca gga agc tgt gtc cag gca gaa gct 625
Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala
190 195 200 205
gca cct gct ggg ctc tgt gga gag cag cgg gga gag gac tgt gcc gag 673
Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu
210 215 220
ctg cat gac tac ttc aat gtc ctg agt tac aga agc ctg ggt aac tgc 721
Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys
225 230 235
agc ttc ttc aca gag act ggt tag caaccagagg catcttctgg aagatacact 775
Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly *
240

tttgtctttg ctattataga tgaatatata agcagctgta ctctccatca gtgctgcgtg 835
tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtgtgtgtg tgttcagttg agtgaataaa tgtcatcctc 895
ttctcca 902

```

<210> 2

<211> 244.

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (117)...(117)
 <223> Xaa = Thr o Ala

5

<400> 2

```

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

10

<210> 3
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 3

```

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

```

<400> 3

```

Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu
115           120           125
Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
130           135           140

```

- 5 <210>4
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10 <400> 4

```

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

```

- <210> 5
- <211> 1711
- 15 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (755)...(1690)

<400> 5

ES 2 367 810 T3

```

aaactat tgg agggtagggg ctgtgattat ttacttcat atcctcagag cctgggtgttg 60
aggttggtgc tttgtaggca cccagggact ttcaaataaa tgaagggagg gagggaggaa 120
agaaggatgg gtccatagta ggacctgggtg atgggctggg agctccaggc aaatgtcaac 180
caatccctct cctgggtcag ctcccagggg ctcacccttc tttgcatttc cagctctcat 240
gaggtcattg tgcacaggaa agctctctcc tctaactctcc tctgaccta ctgcaccaga 300
gaaatcaagc cagaattcaa caaagtctca gtccagataa acaagacaaa agaaataaga 360
ttcgagtaga agatctcctt caagggaaag ttgctgtgtt tgtccaagac ctttgtcca 420
tccatgtatc atcccccaag taaacacttc ttgttcacct gttcattaga tttcaagtgc 480
agtccttggc ctgtaagtcc ctacaatgat aagtttctct tatcattgca cattcttcat 540
caggaggatg ccagaggagc tcagccaaca gttcctcacc agtagcagat tcttcagaat 600
cttgggcact acacagatgc ccttgagctc tttgaataaa ggctgatttt tagaaaaaac 660
attaagacag aacttaaaaa caatagattg actataatcc aaagacgagt gtaccttaa 720
ccacaat ttt catttatttt taaatgtttc cttc atg gcc ttt ctt gtg gct cac 775
Met Ala Phe Leu Val Ala His
1 5

```

```

cct atg cag ttt gtg tat ttg ttg aca act tta tgt gtt ttt aat atg 823
Pro Met Gln Phe Val Tyr Leu Leu Thr Thr Leu Cys Val Phe Asn Met
10 15 20

```

ggt ttt gcc aaa ctt ggt ttt tcc gag acc gtc ttt tct cag agg ctc	871
Val Phe Ala Lys Leu Gly Phe Ser Glu Thr Val Phe Ser Gln Arg Leu	
25 30 35	
agt ttt acc gtc cta tct gca gtc ggc tac ttt cag tgg cag aag agg	919
Ser Phe Thr Val Leu Ser Ala Val Gly Tyr Phe Gln Trp Gln Lys Arg	
40 45 50 55	
cca cat ctg ctt cct gta ggc cct ctg ggc aga agc atg cgc tgg tgt	967
Pro His Leu Leu Pro Val Gly Pro Leu Gly Arg Ser Met Arg Trp Cys	
60 65 70	
ctc ctc ctg atc tgg gcc cag ggg ctg agg cag gct ccc ctc gcc tca	1015
Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala Pro Leu Ala Ser	
75 80 85	
gga atg atg aca ggc aca ata gaa aca acg ggg aac att tct gca gag	1063
Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu	
90 95 100	
aaa ggt ggc tct atc atc tta caa tgt cac ctc tcc tcc acc acg gca	1111
Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala	
105 110 115	
caa gtg acc cag gtc aac tgg gag cag cag gac cag ctt ctg gcc att	1159
Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile	
120 125 130 135	
tgt aat gct gac ttg ggg tgg cac atc tcc cca tcc ttc aag gat cga	1207
Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg	
140 145 150	
gtg gcc cca ggt ccc ggc ctg ggc ctc acc ctc cag tcg ctg acc gtg	1255
Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val	
155 160 165	
aac gat aca ggg gag tac ttc tgc atc tat cac acc tac cct gat ggg	1303
Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly	
170 175 180	
acg tac act ggg aga atc ttc ctg gag gtc cta gaa agc tca gtg gct	1351
Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala	
185 190 195	
gag cac ggt gcc agg ttc cag att cca ttg ctt gga gcc atg gcc gcg	1399
Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala	
200 205 210 215	
acg ctg gtg gtc atc tgc aca gca gtc atc gtg gtg gtc gcg ttg act	1447
Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr	
220 225 230	
aga aag aag aaa gcc ctc aga atc cat tct gtg gaa ggt gac ctc agg	1495
Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg	
235 240 245	
aga aaa tca gct gga cag gag gaa tgg agc ccc agt gct ccc tca ccc	1543
Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro	
250 255 260	
cca gga agc tgt gtc cag gca gaa gct gca cct gct ggg ctc tgt gga	1591
Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly	
265 270 275	


```

gag cag cgg gga gag gac tgt gcc gag ctg cat gac tac ttc aat gtc 1639
Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp Tyr Phe Asn Val
280                285                290                295

ctg agt tac aga agc ctg ggt aac tgc agc ttc ttc aca gag act ggt 1687
Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly
300                305                310

tag caaccagagg catcttctgg a 1711
*
```

5 <210> 6
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

```

Met Ala Phe Leu Val Ala His Pro Met Gln Phe Val Tyr Leu Leu Thr
 1                    5                    10                    15
Thr Leu Cys Val Phe Asn Met Val Phe Ala Lys Leu Gly Phe Ser Glu
20                    25                    30
Thr Val Phe Ser Gln Arg Leu Ser Phe Thr Val Leu Ser Ala Val Gly
35                    40                    45
Tyr Phe Gln Trp Gln Lys Arg Pro His Leu Leu Pro Val Gly Pro Leu
50                    55                    60
Gly Arg Ser Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu
65                    70                    75                    80
Arg Gln Ala Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr
85                    90                    95
Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys
100                   105                   110
His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln
115                   120                   125
Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile
130                   135                   140
Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu
145                   150                   155                   160
Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile
165                   170                   175
Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu
180                   185                   190
Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
195                   200                   205
Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val
210                   215                   220
Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His
225                   230                   235                   240
Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp
245                   250                   255
Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala
260                   265                   270
Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu
275                   280                   285
Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys
290                   295                   300
Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly
305                   310
```

<210> 7
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

```

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

<210> 8
 <211> 726
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(726)

15

<400> 8

```

atg cat ggc tgg ctg ctc ctg gtc tgg gtc cag ggg ctg ata cag gct 48
Met His Gly Trp Leu Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Ile Gln Ala
 1          5          10          15
gcc ttc ctc gct aca gga gcc aca gca ggc acg ata gat aca aag agg 96
Ala Phe Leu Ala Thr Gly Ala Thr Ala Gly Thr Ile Asp Thr Lys Arg
 20          25          30
aac atc tct gca gag gaa ggt ggc tct gtc atc tta cag tgt cac ttc 144
Asn Ile Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys His Phe
 35          40          45
tcc tct gac aca gct gaa gtg acc caa gtc gac tgg aag cag cag gac 192
Ser Ser Asp Thr Ala Glu Val Thr Gln Val Asp Trp Lys Gln Gln Asp
 50          55          60
cag ctt ctg gcc att tat agt gtt gac ctg ggg tgg cat gtc gct tca 240
Gln Leu Leu Ala Ile Tyr Ser Val Asp Leu Gly Trp His Val Ala Ser
 65          70          75          80
    
```

20

gtc ttc agt gat cgg gtg gtc cca ggc ccc agc cta ggc ctc acc ttc 288
 Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro Ser Leu Gly Leu Thr Phe
 85 90 95

cag tct ctg aca atg aat gac acg gga gag tac ttc tgt acc tat cat 336
 Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His
 100 105 110

acg tat cct ggt ggg att tac aag ggg aga ata ttc ctg aag gtc caa 384
 Thr Tyr Pro Gly Gly Ile Tyr Lys Gly Arg Ile Phe Leu Lys Val Gln
 115 120 125

gaa agc tca gtg gct cag ttc cag act gcc ccg ctt gga gga acc atg 432
 Glu Ser Ser Val Ala Gln Phe Gln Thr Ala Pro Leu Gly Gly Thr Met
 130 135 140

gct gct gtg ctg gga ctc att tgc tta atg gtc aca gga gtg act gta 480
 Ala Ala Val Leu Gly Leu Ile Cys Leu Met Val Thr Gly Val Thr Val
 145 150 155 160

ctg gct aga aag aag tct att aga atg cat tct ata gaa agt ggc ctt 528
 Leu Ala Arg Lys Lys Ser Ile Arg Met His Ser Ile Glu Ser Gly Leu
 165 170 175

ggg aga aca gaa gcg gag cca cag gaa tgg aac ctg agg agt ctc tca 576
 Gly Arg Thr Glu Ala Glu Pro Gln Glu Trp Asn Leu Arg Ser Leu Ser
 180 185 190

tcc cct gga agc cct gtc cag aca caa act gcc cct gct ggt ccc tgt 624
 Ser Pro Gly Ser Pro Val Gln Thr Gln Thr Ala Pro Ala Gly Pro Cys
 195 200 205

gga gag cag gca gaa gat gac tat gct gac cca cag gaa tac ttt aat 672
 Gly Glu Gln Ala Glu Asp Asp Tyr Ala Asp Pro Gln Glu Tyr Phe Asn
 210 215 220

gtc ctg agc tac aga agc cta gag agc ttc att gct gta tcg aag act 720
 Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Ser Phe Ile Ala Val Ser Lys Thr
 225 230 235 240

ggc taa 726
 Gly *

<210> 9
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9

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

Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro Ser Leu Gly Leu Thr Phe
 85 90 95
 Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His
 100 105 110
 Thr Tyr Pro Gly Gly Ile Tyr Lys Gly Arg Ile Phe Leu Lys Val Gln
 115 120 125
 Glu Ser Ser Val Ala Gln Phe Gln Thr Ala Pro Leu Gly Gly Thr Met
 130 135 140
 Ala Ala Val Leu Gly Leu Ile Cys Leu Met Val Thr Gly Val Thr Val
 145 150 155 160
 Leu Ala Arg Lys Lys Ser Ile Arg Met His Ser Ile Glu Ser Gly Leu
 165 170 175
 Gly Arg Thr Glu Ala Glu Pro Gln Glu Trp Asn Leu Arg Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Pro Gly Ser Pro Val Gln Thr Gln Thr Ala Pro Ala Gly Pro Cys
 195 200 205
 Gly Glu Gln Ala Glu Asp Asp Tyr Ala Asp Pro Gln Glu Tyr Phe Asn
 210 215 220
 Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Ser Phe Ile Ala Val Ser Lys Thr
 225 230 235 240
 Gly

<210> 10

<211> 139

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

10

<210> 11

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 11

Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala
 1 5 10 15
 Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn
 20 25 30
 Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser
 35 40 45

Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln
 50 55 60
 Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser
 65 70 75 80
 Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln
 85 90 95
 Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr
 100 105 110
 Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu
 115 120 125
 Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile
 130 135 140

<210> 12
 <211> 138
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 147
 15 <212> ADN
 <213> Dominio tetramerizante VASP-His6

<400> 13

ggctccgggtg gctccgacct acagagggtg aaacaggagc ttctggaaga ggtgaagaag 60
 gaattgcaga aagtgaaga ggaaatcatt gaagccttcg tccaggagct gaggggttcc 120
 ggtggccatc accatcacca tcaactga 147

<210> 14
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Dominio tetramerizante VASP-His6

5
 <400> 14

```

    Gly Ser Gly Gly Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu Leu Leu Glu
      1          5          10          15
    Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile Glu Ala
      20          25          30
    Phe Val Gln Glu Leu Arg Gly Ser Gly Gly His His His His His His
      35          40          45
    
```

<210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Ligador
 15
 <400> 15

Gly Ser Gly Gly
 1

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Ligador
 25
 <400> 16

His His His His His His
 1 5

<210> 17
 <211> 3200
 <212> ADN
 <213> CD155 humano

35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (184)...(1425)
 40
 <400> 17

```

cttgaagaag tgggtattcc ccttcccacc ccaggcactg gaggagcggc cccccgggga 60
ttccaggacc tgagctccgg gagctggact cgcagcagacc gcggcagagc gagctggcgc 120
cggaagcga ggagacgccc gcgggaggcc cagctgctcg gagcaactgg catggcccga 180
gcc atg gcc gcc gcg tgg ccg ctg ctg ctg gtg gcg cta ctg gtg ctg 228
  Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu
    1           5           10           15

tcc tgg cca ccc cca gga acc ggg gac gtc gtc gtg cag gcg ccc acc 276
Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr
           20           25           30

cag gtg ccc gcc ttc ttg ggc gac tcc gtg acg ctg ccc tgc tac cta 324
Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu
           35           40           45

cag gtg ccc aac atg gag gtg acg cat gtg tca cag ctg act tgg gcg 372
Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala
           50           55           60

cgg cat ggt gaa tct ggc agc atg gcc gtc ttc cac caa acg cag ggc 420
Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly
           65           70           75

ccc agc tat tcg gag tcc aaa cgg ctg gaa ttc gtg gca gcc aga ctg 468
Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu
  80           85           90           95

```

ggc gcg gag ctg cgg aat gcc tgc ctg agg atg ttc ggg ttg cgc gta	516
Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val	
100 105 110	
gag gat gaa ggc aac tac acc tgc ctg ttc gtc acg ttc ccg cag ggc	564
Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly	
115 120 125	
agc agg agc gtg gat atc tgg ctc cga gtg ctt gcc aag ccc cag aac	612
Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn	
130 135 140	
aca gct gag gtt cag aag gtc cag ctc act gga gag cca gtg ccc atg	660
Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met	
145 150 155	
gcc cgc tgc gtc tcc aca ggg ggt cgc ccg cca gcc caa atc acc tgg	708
Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp	
160 165 170 175	
cac tca gac ctg ggc ggg atg ccc aat acg agc cag gtg cca ggg ttc	756
His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe	
180 185 190	
ctg tct ggc aca gtc act gtc acc agc ctc tgg ata ttg gtg ccc tca	804
Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser	
195 200 205	
agc cag gtg gac ggc aag aat gtg acc tgc aag gtg gag cac gag agc	852
Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser	
210 215 220	
ttt gag aag cct cag ctg ctg act gtg aac ctc acc gtg tac tac ccc	900
Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro	
225 230 235	
cca gag gta tcc atc tct ggc tat gat aac aac tgg tac ctt ggc cag	948
Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln	
240 245 250 255	
aat gag gcc acc ctg acc tgc gat gct cgc agc aac cca gag ccc aca	996
Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr	
260 265 270	
ggc tat aat tgg agc acg acc atg ggt ccc ctg cca ccc ttt gct gtg	1044
Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val	
275 280 285	
gcc cag ggc gcc cag ctc ctg atc cgt cct gtg gac aaa cca atc aac	1092
Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn	
290 295 300	
aca act tta atc tgc aac gtc acc aat gcc cta gga gct cgc cag gca	1140
Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala	
305 310 315	
gaa ctg acc gtc cag gtc aaa gag gga cct ccc agt gag cac tca ggc	1188
Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly	
320 325 330 335	


```

atg tcc cgt aac gcc atc atc ttc ctg gtt ctg gga atc ctg gtt ttt 1236
Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Val Phe
                               340                               345                               350

ctg atc ctg ctg ggg atc ggg att tat ttc tat tgg tcc aaa tgt tcc 1284
Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser Lys Cys Ser
                               355                               360                               365

cgt gag gtc ctt tgg cac tgt cat ctg tgt ccc tcg agt aca gag cat 1332
Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser Thr Glu His
                               370                               375                               380

gcc agc gcc tca gct aat ggg cat gtc tcc tat tca gct gtg agc aga 1380
Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg
                               385                               390                               395

gag aac agc tct tcc cag gat cca cag aca gag ggc aca agg tga 1425
Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg *
400                               405                               410

cagcgtcggg actgagaggg gagagagact ggagctggca aggacgtggg cctccagagt 1485
tggacccgac cccaatggat gaagacccc tccaaagaga ccagcctccc tccctgtgcc 1545
agacctcaa acgacggggg caggtgcaag ttcataggtc tccaagacca cctcctttc 1605
atctgctaga aggactcact agactcagga aagctgttag gctcacagtt acagtttatt 1665
acagtaaaag gacagagatt aagatcagca aagggaggag gtgcacagca cacgttccac 1725
gacagatgag gcgacggctt ccatctgccc tctcccagtg gagccatata ggcagcacct 1785
gattctcaca gcaacatgtg acaacatgca agaagtactg ccaatactgc caaccagagc 1845
agctcactcg agatctttgt gtccagagtt tttgtttgt cttgagacag ggtctggctc 1905
tgttggcaga ctagagtaca gtggtgagat cacagttcat tgcagccttg acttctcaac 1965
gccaagtcat cctcccacct cagcctcctg agtagctatg actacaggtg tgtgccacca 2025
cgtctggcta atctttttat tatttgtaaa gtcgaggttt cctgtgtgtg cccaggctgg 2085
tcttgaactc ttggctccaa gtgatacttc tgccttggcc tcccaaagtg ctgaattaag 2145
cagctcacca tccacacggc tgacctcata catcaagcca ataccgtgtg gcccaagacc 2205
cccaccataa atcacatcat tagcatgaac caccagaggt ggccaagac tcccagatca 2265
gctaccaggc aggatattcc aagggcttag agatgaatgc ccaggagctg aggataaagg 2325
gccgatctt tctttgggca aggttaagcc tttactgcat agcagaccac acagaagggt 2385
gtgggccacc agagaatttt ggtaaaaatt tggcctctgg ccttgagctt ctaaactctc 2445
gtatccgtca gatctctgtg gttacaagaa acagccactg accctgggtca ccagaggctg 2505
caattcaggc cgcaagcagc tgcctagggg gtgtccaagg agcagagaaa actactagat 2565
gtgaacttga agaaggttgt cagctgcagc cactttctgc cagcatctgc agccactttc 2625
tgccagcatc tgcagccagc aagctgggac tggcaggaaa taaccacaaa aagaagcaaa 2685
tgcaatttcc aacacaaggg ggaagggatg cagggggagg cagcgtgca gttgctcagg 2745
acacgtcctc ataggaccaa gatggatgcg acccaagacc caggaggccc agctgctcag 2805
tgcaactgac aagttaaaaa ggtctatgat cttgagggca gacagcagaa ttcctcttat 2865
aaagaaaact gtttgggaaa atacgttgag ggagagaaga ccttgggcca agatgctaaa 2925
tgggaatgca aagcttgagc tgctctgcaa gagaaaataa gcaggacaga ggatttgctc 2985
tggacagaga tggaagagcc gggaacagag aagtgtgggg aagagatagg aaccagcagg 3045
atggcagggg caaagggctc aaggggtgagc aggccagtg gaccccacag agttggggag 3105
ataaaggaac attggttgct ttggtggc acgtaagctcct tgtctgtctc cagcaccag 3165
aatctcatta aagcttattt attgtacctc caaaa 3200

```

<210> 18
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> CD155 humano

<400> 18

5

10

15

```

Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser
1      5      10      15
Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln
20      25      30
Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln
35      40      45

Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg
50      55      60
His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro
65      70      75      80
Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly
85      90      95
Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu
100     105     110
Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser
115     120     125
Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr
130     135     140
Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala
145     150     155     160
Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His
165     170     175
Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu
180     185     190
Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser
195     200     205
Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe
210     215     220
Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro
225     230     235     240
Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn
245     250     255
Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly
260     265     270
Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala
275     280     285
Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr
290     295     300
Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu
305     310     315     320
Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met
325     330     335
Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Val Phe Leu
340     345     350
Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser Lys Cys Ser Arg
355     360     365
Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser Thr Glu His Ala
370     375     380
Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg Glu
385     390     395     400
Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg
405     410

```

<210> 19
 <211> 316
 5 <212> PRT
 <213> CD155 humano
 <400> 19

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

Ala Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe
 65 70 75 80
 Gly Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr
 85 90 95
 Phe Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala
 100 105 110
 Lys Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu
 115 120 125
 Pro Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala
 130 135 140
 Gln Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln
 145 150 155 160
 Val Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile
 165 170 175
 Leu Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val
 180 185 190
 Glu His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr
 195 200 205
 Val Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn
 225 230 235 240
 Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro
 245 250 255
 Pro Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp
 260 265 270
 Lys Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly
 275 280 285
 Ala Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser
 290 295 300
 Glu His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe
 305 310 315

<210> 20
 <211> 2838
 5 <212> ADN
 <213> Murino

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (62)...(1288)

<400> 20

15

ES 2 367 810 T3

```

gagataaggc gcttggccgt tactaactgg actacaaaga gctggatcgg accggaacca 60
c atg gct caa ctc gcc cga gcc acc cgc tcc ccg ctg tca tgg ctg ctg 109
  Met Ala Gln Leu Ala Arg Ala Thr Arg Ser Pro Leu Ser Trp Leu Leu
    1           5           10           15

ctg ctg ttc tgc tat gca ctc cgg aaa gcg ggt ggg gat ata cgt gtg 157
Leu Leu Phe Cys Tyr Ala Leu Arg Lys Ala Gly Gly Asp Ile Arg Val
    20           25           30

ctg gtg ccc tac aat tcg aca ggc gtc ttg gga ggg tcg acc acc ttg 205
Leu Val Pro Tyr Asn Ser Thr Gly Val Leu Gly Gly Ser Thr Thr Leu
    35           40           45

cac tgt agt ctg act tct aat gag aat gtg act atc act caa ata acc 253
His Cys Ser Leu Thr Ser Asn Glu Asn Val Thr Ile Thr Gln Ile Thr
    50           55           60

```

tgg atg aag aag gat tca ggt gga tcc cac gct ctt gtg gct gtc ttc	301
Trp Met Lys Lys Asp Ser Gly Gly Ser His Ala Leu Val Ala Val Phe	
65 70 75 80	
cac ccc aag aag ggg ccc aac atc aaa gag cca gag agg gtg aaa ttc	349
His Pro Lys Lys Gly Pro Asn Ile Lys Glu Pro Glu Arg Val Lys Phe	
85 90 95	
ttg gct gcc caa cag gat ctg agg aac gca tct ctg gcc atc tcg aac	397
Leu Ala Ala Gln Gln Asp Leu Arg Asn Ala Ser Leu Ala Ile Ser Asn	
100 105 110	
tta agt gta gaa gac gaa ggc atc tat gaa tgt cag att gcc aca ttc	445
Leu Ser Val Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Glu Cys Gln Ile Ala Thr Phe	
115 120 125	
ccc aga ggc agt aga agc acc aat gcc tgg ctg aag gtg caa gcc cga	493
Pro Arg Gly Ser Arg Ser Thr Asn Ala Trp Leu Lys Val Gln Ala Arg	
130 135 140	
cct aag aac act gca gag gcc ctg gag ccc tct ccc acc ttg ata ctg	541
Pro Lys Asn Thr Ala Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Thr Leu Ile Leu	
145 150 155 160	
cag gat gtg gct aaa tgc atc tct gcc aat ggt cac cct cct gga cga	589
Gln Asp Val Ala Lys Cys Ile Ser Ala Asn Gly His Pro Pro Gly Arg	
165 170 175	
atc tct tgg ccc tcg aat gtg aat gga agt cac cgt gaa atg aag gaa	637
Ile Ser Trp Pro Ser Asn Val Asn Gly Ser His Arg Glu Met Lys Glu	
180 185 190	
cca ggg tcc cag ccg ggc acc acc aca gtt acc agc tac ctc tcc atg	685
Pro Gly Ser Gln Pro Gly Thr Thr Val Thr Ser Tyr Leu Ser Met	
195 200 205	
gta cct tct cgc cag gca gac ggc aag aac atc acc tgc acg gtg gag	733
Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr Cys Thr Val Glu	
210 215 220	
cat gaa agc tta cag gag ctg gac cag ctg ctg gtg acc ctt tcc caa	781
His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val Thr Leu Ser Gln	
225 230 235 240	
ccc tat cca cct gaa aac gtg tcc atc tct ggc tat gac ggc aac tgg	829
Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Gly Asn Trp	
245 250 255	
tat gtt ggc ctc act aac ttg acc ctg acc tgt gaa gct cac agc aaa	877
Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala His Ser Lys	
260 265 270	
cca gcg cct gac atg gct gga tat aac tgg agc acg aac acg ggt gac	925
Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Asn Thr Gly Asp	
275 280 285	
ttt ccc aac tct gtt aag cgc cag ggc aat atg ctt cta atc tcc acc	973
Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu Leu Ile Ser Thr	
290 295 300	
gta gag gat ggt ctc aat aac acg gtc att gtg tgc gaa gtc acc aat	1021
Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys Glu Val Thr Asn	
305 310 315 320	

gcc cta ggg tct ggg cag ggc caa gtg cac atc att gtt aaa gag aaa 1069
 Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile Val Lys Glu Lys
 325 330 335

cct gag aat atg cag caa aat aca aga tta cac cta ggc tac atc ttt 1117
 Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His Leu Gly Tyr Ile Phe
 340 345 350

ctt atc gtc ttt gtc ctc gct gta gtc atc atc atc gca gca cta tac 1165
 Leu Ile Val Phe Val Leu Ala Val Val Ile Ile Ile Ala Ala Leu Tyr
 355 360 365

act ata cga aga tgc agg cat ggt cgt gct ctg cag tcc aat ccc tca 1213
 Thr Ile Arg Arg Cys Arg His Gly Arg Ala Leu Gln Ser Asn Pro Ser
 370 375 380

gag agg gag aac gtc cag tat tca tct gtg aac ggc gac tgt aga ctg 1261
 Glu Arg Glu Asn Val Gln Tyr Ser Ser Val Asn Gly Asp Cys Arg Leu
 385 390 395 400

aac atg gag cca aac agc aca agg tga cgggtgctggg tagacagaac 1308
 Asn Met Glu Pro Asn Ser Thr Arg *

taaggaactt gaaggcatag caactggaac cctactctca taaatgaaga agcctccaga 1368
 gagactggct gctcagtgtg atgagcatag caagtttggg ggtctccca ggatgctgcc 1428
 gaattccacg ttgtcaaaag gaccatgga ggccagtgtg ttggctcact cttgacatct 1488
 cagcaagctg gggggggggg ggggagcata aagcgagggt gagtctagct tgggctatag 1548
 agcaaagccc tgtccataca caaacaagct aaggggcttt gagacgggtca gaaactgaag 1608
 tcttgctttg ggtaaggtaa atcctctacc gcatgtatgt gctagacttg aaagacttcc 1668
 acacagacct ctttataagt tgactccatt ggggctatcc cctcctctct ggacaaggctc 1728
 tctgtatgta gccaaggcta ggctcaaact cacagagata tgtctgcttc tacctcccca 1788
 gtgctagagt tgaaagtatt tgtgccactg cacttttcta ggtcttcttt taatgaagta 1848
 aagtatatat ttataaaaag ctatttagtt atatatatat atatttttga gactatttca 1908
 tagagcccaa gctaacctca aacttactat gtagccaaga gtgatggtaa actaatattat 1968
 tttaatattt ttgtcttcaa ttttaacctat cacccaacct ctgctccctt ccatacttc 2028
 tttcaatcca tttcattgtc tttttcttcc cagacactat tctgacttac gtcctccatta 2088
 caaacatttt attgaactac ataaaaatgt gtgaaccaca aaaaaaaaaat gtattttgtca 2148
 aaattgtagt tgtctttctg aggctgacct gagttctctg ataccattct ctccagttgt 2208
 atccagtttc ctgtaaacaa tgtgactttg tttttctcag tagctaaaac atcccaatta 2268
 tgtgagtgta cactttcttt actcattcct ctgtgggcca ccagctgggt tggttccata 2328
 tctgagctat tgtgcatgga attgtctctg tggtagggtt agtaaaactcc caggaatgcc 2388
 tgtacatggt tgtagaggcc agaagaaggc acaaaatctt gagccaggct tacatgcact 2448
 tgtgagtagc cccacatagg tgctaagaac ccagttcagg tctctgctg tgggatgggtg 2508
 ggctgtgcac agaaagcctg gtcccggctc agcaaagggtc tggaactccg gagccgggtgg 2568
 gctgtgattt acaccagcat gggatggaag gagttggacc tcgctctctg ggcacctggc 2628
 tctgtcaca tagctacagc ctcccacagc cccctatag ggaggtatgc agcatcaatc 2688
 acatagtagc tgcactaagc cctcccacat gcaataagg tttccccaaa ctctcagttc 2748
 aagccaatga aaagtacctg ctgtcaaac ctaaataatc cccaaaactc tgtaagtctc 2808
 atcagggaaat aaaatgtgtg tgaaaactaa 2838

<210> 21
 <211> 408
 <212> PRT
 5 <213> Murino

<400> 21
 Met Ala Gln Leu Ala Arg Ala Thr Arg Ser Pro Leu Ser Trp Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Cys Tyr Ala Leu Arg Lys Ala Gly Gly Asp Ile Arg Val
 20 25 30
 Leu Val Pro Tyr Asn Ser Thr Gly Val Leu Gly Gly Ser Thr Thr Leu

		35					40					45			
His	Cys	Ser	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Asn	Val	Thr	Ile	Thr	Gln	Ile	Thr
	50					55					60				
Trp	Met	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Phe
65					70				75						80
His	Pro	Lys	Lys	Gly	Pro	Asn	Ile	Lys	Glu	Pro	Glu	Arg	Val	Lys	Phe
				85					90					95	
Leu	Ala	Ala	Gln	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Asn
			100					105					110		
Leu	Ser	Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Ile	Tyr	Glu	Cys	Gln	Ile	Ala	Thr	Phe
		115					120						125		
Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Thr	Asn	Ala	Trp	Leu	Lys	Val	Gln	Ala	Arg
	130					135					140				
Pro	Lys	Asn	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Pro	Ser	Pro	Thr	Leu	Ile	Leu
145					150					155					160
Gln	Asp	Val	Ala	Lys	Cys	Ile	Ser	Ala	Asn	Gly	His	Pro	Pro	Gly	Arg
				165					170					175	
Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Asn	Val	Asn	Gly	Ser	His	Arg	Glu	Met	Lys	Glu
			180					185					190		
Pro	Gly	Ser	Gln	Pro	Gly	Thr	Thr	Thr	Val	Thr	Ser	Tyr	Leu	Ser	Met
	195					200						205			
Val	Pro	Ser	Arg	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Glu
	210					215					220				
His	Glu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ser	Gln
225					230						235				240
Pro	Tyr	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asp	Gly	Asn	Trp
				245					250					255	
Tyr	Val	Gly	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	His	Ser	Lys
			260					265					270		
Pro	Ala	Pro	Asp	Met	Ala	Gly	Tyr	Asn	Trp	Ser	Thr	Asn	Thr	Gly	Asp
	275						280					285			
Phe	Pro	Asn	Ser	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Asn	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Thr
	290					295					300				
Val	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Asn	Thr	Val	Ile	Val	Cys	Glu	Val	Thr	Asn
305					310					315					320
Ala	Leu	Gly	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Val	His	Ile	Ile	Val	Lys	Glu	Lys
				325					330					335	
Pro	Glu	Asn	Met	Gln	Gln	Asn	Thr	Arg	Leu	His	Leu	Gly	Tyr	Ile	Phe
			340					345					350		
Leu	Ile	Val	Phe	Val	Leu	Ala	Val	Val	Ile	Ile	Ile	Ala	Ala	Leu	Tyr
		355					360					365			
Thr	Ile	Arg	Arg	Cys	Arg	His	Gly	Arg	Ala	Leu	Gln	Ser	Asn	Pro	Ser
	370					375					380				
Glu	Arg	Glu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ser	Ser	Val	Asn	Gly	Asp	Cys	Arg	Leu
385					390					395					400
Asn	Met	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr	Arg								
				405											

<220> 22
 <211> 319
 5 <212> PRT
 <213> Murino

 <400> 22

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

Arg Val Lys Phe Leu Ala Ala Gln Gln Asp Leu Arg Asn Ala Ser Leu
 65 70 75 80
 Ala Ile Ser Asn Leu Ser Val Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Glu Cys Gln
 85 90 95
 Ile Ala Thr Phe Pro Arg Gly Ser Arg Ser Thr Asn Ala Trp Leu Lys
 100 105 110
 Val Gln Ala Arg Pro Lys Asn Thr Ala Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro
 115 120 125
 Thr Leu Ile Leu Gln Asp Val Ala Lys Cys Ile Ser Ala Asn Gly His
 130 135 140
 Pro Pro Gly Arg Ile Ser Trp Pro Ser Asn Val Asn Gly Ser His Arg
 145 150 155 160
 Glu Met Lys Glu Pro Gly Ser Gln Pro Gly Thr Thr Thr Val Thr Ser
 165 170 175
 Tyr Leu Ser Met Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr
 180 185 190
 Cys Thr Val Glu His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val
 195 200 205
 Thr Leu Ser Gln Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr
 210 215 220
 Asp Gly Asn Trp Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu
 225 230 235 240
 Ala His Ser Lys Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr
 245 250 255
 Asn Thr Gly Asp Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu
 260 265 270
 Leu Ile Ser Thr Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys
 275 280 285
 Glu Val Thr Asn Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile
 290 295 300
 Val Lys Glu Lys Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His
 305 310 315

- <210> 23
- 5 <211> 48
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <213> Dominio tetramerizante VASP-His6
- <400> 23

Gly Ser Gly Gly Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu Leu Leu Glu
 1 5 10 15
 Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile Glu Ala
 20 25 30
 Phe Val Gln Glu Leu Arg Gly Ser Gly Gly His His His His His
 35 40 45

<210> 24
<211> 2207

<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 24

```

ccccctcctg tgggggttcat tggggcatcc cctttctgct gcaggaacct ctcatcagac 60
cgcctgaggg aagcggcgcc cggagacccg ccccgggccc gtccacattc tcccaggaa 120
gccggactct atggggcggg accctggggg agcctgagcc gagcccggag ccagccccga 180
accctgaac ctccagccag gggcgccccg ggagcagcca gccctggggc gagccgcccg 240
cccgcggagc agccatgagc gagacggta tctgttccag ccggggccact gtgatgcttt 300
atgatgatgg caacaagcga tggctccctg ctggcaccgg tcccaggcc ttcagccgcg 360
    
```

```

tccagatcta ccacaacccc acggccaatt cctttcgcgt cgtgggcccg aagatgcagc 420
ccgaccagca ggtggtcatc aactgtgcca tcgtccgggg tgtcaagtat aaccaggcca 480
cccccaactt ccatcagtgg cgcgacgctc gccaggctct gggcctcaac ttcggcagca 540
aggaggatgc ggcccagttt gccgcccggc tggccagtgc cctagaggcg ttggaaggag 600
gtgggcccc tccaccccc gcacttccca cctggctcgt cccgaacggc ccctccccgg 660
aggaggtgga gcagcagaaa aggcagcagc ccggcccgtc ggagcacata gagcgccggg 720
tctccaatgc aggaggccca cctgctcccc ccgctggggg tccacccccca ccaccaggac 780
ctccccctcc tccaggtccc cccccacccc caggtttgcc cccttcgggg gtcccagctg 840
cagcgcacgg agcaggggga ggaccacccc ctgcaccccc tctcccggca gcacagggcc 900
ctggtggtgg gggagctggg gcccaggcc tggccgcagc tattgctgga gccaaactca 960
ggaaagttag caagcaggag gaggcctcag gggggcccac agccccaaa gctgagagtg 1020
gtcgaagcgg aggtggggga ctcatggaag agatgaacgc catgctggcc cggagaagga 1080
aagccacgca agttggggag aaaaccccc aggatgaatc tgccaatcag gaggagccag 1140
aggccagagt cccggcccag agtgaatctg tgcggagacc ctgggagaag aacagcacia 1200
ccttgccaag gatgaagtgc tcttctctgg tgaccacttc cgagacccaa ccctgcacgc 1260
ccagctccag tgattactcg gacctacaga gggtgaaaca ggagcttctg gaagaggtga 1320
agaaggaatt gcagaaagt aaagaggaaa tcattgaagc ctctgtccag gagctgagga 1380
agcggggttc tcctgacca cagggacce caagaccgc ttctcctttc cgcacaccgc 1440
gcctgtcacc ctgctttccc tgctctact tgacttgga ttggctgaag acacaggaat 1500
gcatcgttcc cactccccat cccacttggg aaactccaag ggggtgtggc ttcctgtctc 1560
acaccacac tggtgctgga ttggctgggg agggccccgc ccttttctcc ctttggctcc 1620
tcccctctgc catccccttg gggccgggtc ctctgctggg gatgcaccaa tgaacccac 1680
aggaaggggg aaggaaggag ggaatttcac attcccttgt tctagattca ctttaacgct 1740
taatgccttc aaagtthtgg ttttttaag aaaaaaaaa atatatata ttgggttttg 1800
ggggaaaagg gaaatthtth tttctctttg gttttgataa aatgggatgt gggagttht 1860
aaatgctata gccctgggct tgccccattt ggggcagcta ttaagggga ggggatgtct 1920
caccgggctg ggggtgagat atccccccac cccagggact cccttccct ctggctcctt 1980
cccctttct atgaggaaat aagatgctgt aactthtgg aacctcagtt ttttgatttt 2040
ttatttgggt aggtthtggg gtccaggcca tttttttac cccttgagg aaataagatg 2100
agggagaaag gagaagggga ggaaacttct cccctcccac cttcaccttt agcttcttga 2160
aaatgggccc ctgcagaata aatctgccag tttttataaa aaaaaaa 2207
    
```

10

<210> 25
<211> 380
<212> PRT
<213> homo sapiens

15

<400> 25

20

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

Val Pro Ala Ala Ala His Gly Ala Gly Gly Gly Pro Pro Pro Ala Pro
 195 200 205
 Pro Leu Pro Ala Ala Gln Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro
 210 215 220
 Gly Leu Ala Ala Ala Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Lys Val Ser Lys
 225 230 235 240
 Gln Glu Glu Ala Ser Gly Gly Pro Thr Ala Pro Lys Ala Glu Ser Gly
 245 250 255
 Arg Ser Gly Gly Gly Gly Leu Met Glu Glu Met Asn Ala Met Leu Ala
 260 265 270
 Arg Arg Arg Lys Ala Thr Gln Val Gly Glu Lys Thr Pro Lys Asp Glu
 275 280 285
 Ser Ala Asn Gln Glu Glu Pro Glu Ala Arg Val Pro Ala Gln Ser Glu
 290 295 300
 Ser Val Arg Arg Pro Trp Glu Lys Asn Ser Thr Thr Leu Pro Arg Met
 305 310 315 320
 Lys Ser Ser Ser Ser Val Thr Thr Ser Glu Thr Gln Pro Cys Thr Pro
 325 330 335
 Ser Ser Ser Asp Tyr Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu Leu Leu
 340 345 350
 Glu Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile Glu
 355 360 365
 Ala Phe Val Gln Glu Leu Arg Lys Arg Gly Ser Pro
 370 375 380

<210> 26
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Ligador

<400> 26

Gly Ser Gly Gly
1

5 <210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Tag

<400> 27

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

15 <210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Marca

<400> 28

His His His His His His
1 5

25 <210> 29
<211> 726
<212> ADN
<213> Murino

30 <400> 29

```

atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgacca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tgggggtggca tgtcgcttca 240
gtcttcagtg atcgggtggg cccaggcccc agcctaggcc tcacctcca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatcgt atcctgggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgccccgctt 420
ggaggaacca tggctgctgt gctgggactc atttgcttaa tggtcacagg agtgactgta 480
ctggctagaa agaagtctat tagaatgcat tctatagaaa gtggccttgg gagaacagaa 540
gcggagccac aggaatggaa cctgaggagt ctctcatccc ctggaagccc tgtccagaca 600
caaactgccc ctgctgggtcc ctgtggagag caggcagaag atgactatgc tgaccacag 660
gaatacttta atgtcctgag ctacagaagc ctagagagct tcattgctgt atcgaagact 720
ggctaa 726
    
```

35 <210> 30
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 30

tccacaggtg tccaggaat tcaccatgca tggctggctg etc

43

<210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 31
 10 aggcgcgcct ctgattagc cagtcttga tacagc 36

 <210> 32
 <211> 414
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido
 20
 <400> 32

 atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
 acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
 tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
 aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tgggggtggca tgtcgcttca 240
 gtcttcagtg atcgggtggg cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
 atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatagct atcctgggtgg gatttacaag 360
 gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgcc 414

 25 <210> 33
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 33
 ccacaggtg tccagggaa tccatgca tggctggctg ctc 43

 35

 <210> 34
 <211> 46
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 45 <400> 34
 gggcttgat tgtgggagat ctgggctcgg cagtctggaa ctgagc 46

 <210> 35
 <211> 61
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 55

<400> 35

```

      ---
      ccactttgccc tttctctcca caggtgtcca gggaattcgc aagatgagga tatttgctgt 60
      c
  
```

<210> 36

<211> 57

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 36

```

      gcatggagga cagggcttga ttgtgggaga tctgggctct tcattggag gatgtgc 57
  
```

<210> 37

<211> 4

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 37

```

      atgc          4
  
```

25

<210> 38

<211> 4

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 38

```

      atgc          4
  
```

<210> 39

<211> 414

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

45

<400> 39

```

      atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
      acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
      tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
      aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tgggggtggca tgtcgttca 240
      gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
      atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
      gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgcc 414
  
```

<210> 40

<211> 44

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

5 <400> 40

ccacaggtgt ccaggggaatt cgcaagatgc atggctggct gctc 44

10 <210> 41
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 41

20 ctccaccaga tcccttgcgg gcagctcga actgagc 37

25 <210> 42
<211> 420
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 42

atgcgctggt	gtctctctct	gatctgggcc	caggggctga	ggcaggctcc	cctcgcctca	60
ggaatgatga	caggcacaat	agaaacaacg	gggaacattt	ctgcagagaa	aggtggctct	120
atcatcttac	aatgtcacct	ctcctccacc	acggcacaag	tgaccagggt	caactgggag	180
cagcaggacc	agcttctggc	catttgtaat	gctgacttgg	ggtggcacat	ctccccatcc	240
ttcaaggatc	gagtggcccc	aggtcccggc	ctgggcctca	ccctccagtc	gctgaccgtg	300
aacgatacag	gggagtactt	ctgcatctat	cacacctacc	ctgatgggac	gtacactggg	360
agaatcttcc	tggaggctct	agaaagctca	gtggctgagc	acggtgccag	gttccagatt	420

35 <210> 43
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Marca

<400> 43

ggctctgaacg acatcttcga agctcagaaa atcgaatggc acgaa 45

45

50 <210> 44
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Marca

<400> 44

5 catcaccatc accatcac 18

<210> 45
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 45

cacagggtgc caggggaattc gcaagatgcg ctgggtgtctc ctc 43

<210> 46
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador

25

<400> 46
 aggcgcgcct ctagattagt gatggtgatg gtgatgtcca ccagatcctt cgtgccattc 60
 gattttctga gcttcgaaga tgtcgttcag acctccacca gatccaatct ggaacctggc 120
 acc 123

<210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Cebador

35

<400> 47

ggagtgactg tactggctag aaagaag 27

40

<210> 48
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador

50

<400> 48

gagactcctc aggttcatt cct 23

<210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 49
 10
 agctcagtgg ctgagcacgg tgc 23
 15
 <210> 50
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 50
 25
 acgcttccgt agatctgggt cggaggctc cggtggtcc gacctacaga gggtgaaaca 60
 ggagcttctg gaagaggtga agaaggaatt gcagaagtga aag 103
 30
 <210> 51
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 51
 aaggcgcgcc tctagatcag tgatgggtgat ggtgatggcc accggaaccc ctcagctcct 60
 ggacgaaggc ttcaatgatt tcctctttca ctttctgcaa ttc 103
 40
 <210> 52
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 52
 50
 ctcagccagg aaatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gatctgg 47
 55
 <210> 53
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador

<400> 53

gggggtgggggt acaaccccag agctgtttta aggcgcgcct ctagatc 47

5

<210> 54
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <213> Dominio tetramerizante VASP

15

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

20

<210> 55
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador

<400> 55

caggtgtcca ggggaattcat ataggccggc caccatgcgc tgggtgtctcc tcctgatctg 60
ggcc 64

- 5 <210> 56
- <211> 33
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador
- <400> 56

agtctgatgg tgggggcgaa cctggcaccg tgc 33

- 15 <210> 57
- <211> 33
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Cebador

- 25 <400> 57

gcacggtgcc aggttcgccc ccaccatcag act 33

- <210> 58
- <211> 63
- <212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Cebador

- 35 <400> 58

aaccccagag ctgttttaag ggcgcctct agactagaaa cccccttggt cttcaactcc 60
atg 63

- <210> 59
- <211> 64
- <212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Cebador

- 45 <400> 59

caggtgtcca ggggaattcat ataggccggc caccatgcgc tgggtgtctcc tcctgatctg 60
ggcc 64

- 50 <210> 60
- <211> 63
- <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 60

aaccccgagag ctgttttaag gcgcgctct agactagaaa ccccttggt cttcaactcc 60
atg 63

10

<210> 61

<211> 1133

<212> ADN

<213> zB7R1mFc2 humano

15

<400> 61

gaattcgcaa gatgcgctgg tgtctcctcc tgatctgggc ccaggggctg aggcaggctc 60
ccctcgctc aggaatgatg acaggcacia tagaaacaac ggggaacatt tctgcagaga 120
aaggtggctc tatcatctta caatgtcacc tctctccac cacggcacia gtgaccagg 180
tcaactggga gcagcaggac cagcttctgg ccatttgtaa tgctgacttg gggtggcaca 240
tctccccatc cttcaaggat cgagtggccc cagggtcccgg cctgggcctc accctccagt 300
cgctgaccgt gaacgataca ggggagtact tctgcatcta tcacacctac cctgatggga 360

cgtacactgg gagaatcttc ctggaggtcc tagaaagctc agtggctgag cacggtgcca 420
ggttccagat tgagcccaga tctcccacia tcaagccctg tcttccatgc aaatgcccag 480
cacctaacct cgagggtgga ccatccgtct tcatcttccc tccaaagatc aaggatgtac 540
tcatgatctc cctgagcccc atagtcacat gtgtgggtgg ggatgtgagc gaggatgacc 600
cagatgtcca gatcagctgg tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa 660
cccatagaga ggattacaac agtactctcc ggggtggtcag tgccctcccc atccagcacc 720
aggactggat gagtggcaaa gctttcgcac gcgcggtcaa caacaagac ctcccagcgc 780
ccatcgagag aaccatctca aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct 840
tgccctccacc agaagaagag atgactaaga aacagggtcac tctgacctgc atgggtcacag 900
acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt ggaccaaaaa cgggaaaaca gagctaaact 960
acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga 1020
gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtcccaggag 1080
gtctgcacia tcaccacag actaagagct tctcccggac tccgggtaaa taa 1133

20

<210> 62

<211> 605

<212> ADN

<213> hzB7R1VASPpZMP21

25

<400> 62

gaattcgcaa gatgcgctgg tgtctcctcc tgatctgggc ccaggggctg aggcaggctc 60
ccctcgctc aggaatgatg acaggcacia tagaaacaac ggggaacatt tctgcagaga 120
aaggtggctc tatcatctta caatgtcacc tctctccac cacggcacia gtgaccagg 180
tcaactggga gcagcaggac cagcttctgg ccatttgtaa tgctgacttg gggtggcaca 240
tctccccatc cttcaaggat cgagtggccc cagggtcccgg cctgggcctc accctccagt 300
cgctgaccgt gaacgataca ggggagtact tctgcatcta tcacacctac cctgatggga 360
cgtacactgg gagaatcttc ctggaggtcc tagaaagctc agtggctgag cacggtgcca 420
ggttccagat tgagcccaga tctgggtccg gaggtcccgg tggctccgac ctacagaggg 480
tgaaacagga gcttctggaa gaggtgaaga aggaattgca gaaagtgaaa gaggaaatca 540
ttgaagcctt cgtccaggag ctgagggggt cgggtggcca tcaccatcac catcactgat 600
ctaga 605

<210> 63

<211> 1116

<212> ADN
 <213> zB7R1mFc2 murino

<400> 63

5
 atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
 acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
 tctgtcatct tacagtgca cttctcctct gacacagctg aagtgacca agtcgactgg 180
 aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtggtgacc tgggggtggca tgctcgcttca 240
 gtcttcagtg atcgggtggg cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
 atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctgggtg gatttacaag 360
 gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgccgagccc 420
 agatctccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcgagggg 480
 ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc 540
 cccatagtca catgtgtggg ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc 600
 tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaacctatag agaggattac 660
 aacagtactc tccgggtggg cagtgcctc cccatccagc accaggactg gatgagtggtc 720
 aaagctttcg catgcgcggg caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc 780
 tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgctctc accagaagaa 840
 gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcattgtca cagacttcat gcctgaagac 900
 atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca 960
 gtcttgact ctgatgggtc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac 1020
 tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtggtccacg aggggtctgca caatcaccac 1080
 acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaataa 1116

<210> 64
 <211> 582
 <212> ADN
 <213> zB7R1VASpZMP21 murino

<400> 64

10
 atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
 acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
 tctgtcatct tacagtgca cttctcctct gacacagctg aagtgacca agtcgactgg 180
 aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtggtgacc tgggggtggca tgctcgcttca 240
 gtcttcagtg atcgggtggg cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
 atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctgggtg gatttacaag 360
 gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgccgagccc 420
 agatctgggt cgggaggctc cgggtggctc gacctacaga ggggtgaaaca ggagcttctg 480
 gaagaggtga agaaggaatt gcagaaagtg aaagaggaaa tcattgaagc cttcgtccag 540
 gagctgaggg gttccgggtg ccatcaccat caccatcact ga 582

<210> 65
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 65

ggagtgactg tactggctag aaagaag 27

<210> 66
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 66
gagactcctc aggttcatt cct 23

5

<210> 67
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador

<400> 67

15

ccttgggaga acagaagcgg agcc 24

<210> 68
<211> 470
<212> PRT
<213> homo sapiens

20

<400> 68

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

25

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Glu Pro Arg
 225 230 235 240
 Ser Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 245 250 255
 Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 260 265 270
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 290 295 300
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Met Ser Gly Lys Ala Phe Ala Cys Ala Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
 370 375 380
 Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
 385 390 395 400
 Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
 405 410 415
 Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Lys Ser Phe
 450 455 460
 Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 465 470

<210> 69
 <211> 371
 <212> PRT
 5 <213> Murino
 <400> 69

Met His Gly Trp Leu Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Ile Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Ala Thr Gly Ala Thr Ala Gly Thr Ile Asp Thr Lys Arg
 20 25 30
 Asn Ile Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys His Phe
 35 40 45

Ser Ser Asp Thr Ala Glu Val Thr Gln Val Asp Trp Lys Gln Gln Asp
 50 55 60
 Gln Leu Leu Ala Ile Tyr Ser Val Asp Leu Gly Trp His Val Ala Ser
 65 70 75 80
 Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro Ser Leu Gly Leu Thr Phe
 85 90 95
 Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His
 100 105 110
 Thr Tyr Pro Gly Gly Ile Tyr Lys Gly Arg Ile Phe Leu Lys Val Gln
 115 120 125
 Glu Ser Ser Val Ala Gln Phe Gln Thr Ala Glu Pro Arg Ser Pro Thr
 130 135 140
 Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly
 145 150 155 160
 Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
 165 170 175
 Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 180 185
 Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 195 200 205
 His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
 210 215 220
 Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
 225 230 235 240
 Lys Ala Phe Ala Cys Ala Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
 245 250 255
 Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
 260 265 270
 Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 275 280 285
 Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
 290 295 300
 Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
 305 310 315 320
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 325 330 335
 Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
 340 345 350
 His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
 355 360 365
 Pro Gly Lys
 370

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo agonista anti-zB7R1, o fragmento de anticuerpo, para la fabricación de un medicamento para suprimir una respuesta de linfocitos T en una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria mediada por linfocitos T, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a al menos una porción del dominio extracelular de zB7R1 como se muestra en la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 7 y estimula la señalización mediada por zB7R1.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1,, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, esclerosis múltiple (EM), enfermedad intestinal inflamatoria (EII), enfermedad celíaca, enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) y síndrome del intestino irritable.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria se selecciona del grupo constituido por enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.
- 15 4. Un anticuerpo agonista anti-zB7R1, o fragmento de anticuerpo, para uso en la supresión de una respuesta de linfocitos T en una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria mediada por linfocitos T inhibiendo la actividad de los linfocitos T, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a al menos una porción del dominio extracelular de zB7R1 como se muestra en la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 7 y estimula la señalización mediada por zB7R1.
- 20 5. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la actividad de los linfocitos T, que comprende poner en contacto un linfocito T positivo para zB7R1 con un anticuerpo agonista anti-zB7R1, o fragmento de anticuerpo en una cantidad eficaz para inhibir al menos una actividad de linfocitos T, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a al menos una porción del dominio extracelular de zB7R1 como se muestra en la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 7 y estimula la señalización mediada por zB7R1.
- 25 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, el anticuerpo agonista anti-zB7R1, o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha actividad de linfocitos T se selecciona del grupo que consiste en activación de linfocitos T, diferenciación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, supervivencia de linfocitos T, actividad citolítica de linfocitos T citotóxicos y producción de citocinas de linfocitos T colaboradores.
- 30 7. El uso, o anticuerpo agonista anti-zB7R1 o fragmento de anticuerpo para uso, o procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal humano y un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal murino.
8. El uso, o anticuerpo agonista anti-zB7R1 o fragmento de anticuerpo para uso, o procedimiento, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, scFv y la unidad mínima de reconocimiento.