

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 273**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2005 E 05763338 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1781682**

54 Título: **Polipéptido coestimulador B7-H5**

30 Prioridad:

24.06.2004 US 582491 P

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

30.05.2013

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 FIRST STREET S.W.
ROCHESTER, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

CHEN, LIEPING

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 405 273 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

Polipéptido coestimulador B7-H5

5 REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. nº de serie 60/582.491, presentada el 24 de junio de 2004.

10 ANTECEDENTES

[0002] Los linfocitos T activados desempeñan funciones críticas en la defensa de los hospedadores contra infección vírica y cáncer e intervienen en la evolución de las enfermedades autoinmunitarias. Normalmente se requieren dos señales distintas para la activación óptima de linfocitos T específicos de antígenos. La primera señal es proporcionada por las interacciones del complejo de péptido antigénico y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con el receptor de linfocitos T (TCR). La segunda señal es suministrada a los linfocitos T por moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígenos (APC). Los estudios han demostrado que las interacciones coestimuladoras estimulan el desarrollo de linfocitos T, regulan por aumento la producción de citocinas y promueven la diferenciación de linfocitos T. Además, la ligación de moléculas coestimuladoras proporciona una señal de supervivencia esencial para que los linfocitos T prevengan la apoptosis. Además, las señales coestimuladoras parecen ser vitales para la inducción y el mantenimiento de la anergia de los linfocitos T. De forma más importante, existe un claro interés por la manipulación terapéutica de las vías coestimuladoras dado que el control de las señales coestimuladoras puede proporcionar un medio para potenciar o para inhibir las respuestas inmunitarias.

[0003] El documento WO-01/04.297-A2 se refiere a proteínas humanas que tienen dominios hidrófobos, ADN que codifican estas proteínas, vectores de expresión para estos ADN, células eucariotas transformadas que expresan estos ADN y anticuerpos dirigidos a estas proteínas. La SEQ ID NO 9 del documento WO-01/04.297-A2 se refiere a una proteína de 311 aminoácidos. El ácido nucleico de codificación se muestra en las SEQ ID NO 19 y 29. El documento WO-01/04.297-A2 también desvela en general procedimientos de producción recombinante y cribado así como usos médicos para las proteínas desveladas en el documento WO-01/04.297-A2.

[0004] DATABASE EMBL [Online] 29 de septiembre de 2000, "Homo sapiens mRNA for FLJ00041 protein, partial cds", nº de acceso EBI EMBL:AK024449, nº de acceso de base de datos AK024449 desvela un ARNm de homo sapiens de 4.689 ácidos nucleicos y una secuencia de aminoácidos traducida de 330 aminoácidos.

[0005] DATABASE EMBL [Online] 8 de febrero de 2001, "Mus musculus 0 day neonate skin DNAC, RIKEN full-length enriched library, clone:4632428N05 product: hypothetical Inmunoglobulin and major histocompatibility complex domain/Inmunoglobulin subtype containing protein, full insert sequence", nº de acceso EBI EMBL: AK014600, nº de acceso de base de datos AK014600 desvela un ARNm de ratón de 4.397 ácidos nucleicos y una secuencia de aminoácidos traducida de 309 aminoácidos.

RESUMEN

[0006] La invención se basa, en parte, en la clonación de moléculas de ADNc humano y de ratón que codifican moléculas homólogas que coestimulan las respuestas de los linfocitos T de las dos especies y en la caracterización funcional de los polipéptidos que codifican las moléculas de ADNc. El polipéptido humano es designado como hB7-H5 y el polipéptido de ratón mB7-H5. El texto que hace referencia B7-H5 sin especificar si es humano o de ratón es pertinente para las dos formas de B7-H5. La invención presenta los polipéptidos hB7-H5, mB7-H5, fragmentos funcionales de los polipéptidos, ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos o fragmentos, proteínas de fusión que contienen los polipéptidos o fragmentos funcionales de los polipéptidos y células que expresan los polipéptidos o los fragmentos funcionales para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero. También se incluyen en la invención anticuerpos que se unen a los polipéptidos B7-H5. La invención presenta procedimientos *in vitro* de coestimulación de respuestas de linfocitos T y procedimientos de cribado para compuestos que modulan las respuestas inmunitarias.

[0007] La invención también comprende un polipéptido B7-H5 aislado para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, por ejemplo, un polipéptido codificado por un ADN que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular un linfocito T y (ii) se

hibrida en condiciones rigurosas al complemento de una secuencia que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. El polipéptido B7-H5 puede incluir una secuencia amino del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o el residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3. La invención también comprende polipéptidos B7-H5 que incluyen una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, o un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 1 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, en el que el polipéptido tiene la capacidad de coestimular un linfocito T. Los polipéptidos de la invención incluyen proteínas de fusión que contienen un primer dominio y al menos un dominio adicional. El primer dominio puede ser cualquiera de los polipéptidos B7-H5 descritos anteriormente. El al menos un dominio adicional puede ser, por ejemplo, una secuencia de guía o de acceso heteróloga, o una secuencia de aminoácidos que facilita la purificación, detección o solubilidad de la proteína de fusión.

15 **[0008]** Otra forma de realización de la invención es un procedimiento de coestimulación de un linfocito T que implica la puesta en contacto del linfocito T con cualquiera de los polipéptidos B7-H5 de la invención, o proteínas de fusión de la invención; estas 2 clases de molécula son designadas, por comodidad, como "agentes B7-H5". La puesta en contacto puede ser por cultivo de cualquiera de estos agentes B7-H5 con el linfocito T *in vitro*. Una puesta en contacto de un linfocito T en un mamífero (por ejemplo, un primate humano o no humano (por ejemplo, un mono), un ratón, una rata, una cobaya, una vaca, una oveja, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro o un gato) con cualquiera de los polipéptidos B7-H5 de la invención, o proteínas de fusión de la invención puede ser mediante la administración de cualquiera de los agentes B7-H5 al mamífero o la administración de un ácido nucleico que codifica el agente B7-H5 al mamífero. En un procedimiento *ex vivo* puede proporcionarse una célula recombinante que es descendiente de una célula obtenida del mamífero y que ha sido transfectada o transformada *ex vivo* con un ácido nucleico que codifica cualquiera de los agentes B7-H5 de manera que la célula expresa el agente B7-H5 y administrarse al mamífero. En este procedimiento *ex vivo*, la célula puede ser una célula presentadora de antígeno (APC) que expresa el agente B7-H5 en su superficie. Además, antes de la administración al mamífero, la APC puede ser pulsada con un antígeno o un péptido antigénico. En cualquiera de los procedimientos anteriores, puede sospecharse que el mamífero tiene, por ejemplo, una enfermedad de inmunodeficiencia, una afección inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria. Además, en cualquiera de los procedimientos, el linfocito T puede ser un linfocito T auxiliar, por ejemplo, un linfocito T que ayuda a una respuesta de efector (por ejemplo, un linfocito T citotóxico (CTL) o un anticuerpo de linfocito B). Una respuesta de anticuerpo puede ser, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE o IgA. La coestimulación de un linfocito T por cualquiera de los agentes B7-H5 puede producir un aumento en el nivel de ligando CD40 en la superficie del linfocito T.

35 **[0009]** La invención incluye un procedimiento de identificación de un compuesto que modula una respuesta inmunitaria. El procedimiento implica: suministro de un compuesto de prueba; cultivo, conjunto, del compuesto, uno o más agentes B7-H5, un linfocito T y una molécula de activación de linfocito T; y determinación de si el compuesto de prueba modula la respuesta del linfocito T a la molécula, como una indicación de que el compuesto de prueba modula una respuesta inmunitaria. La molécula puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un receptor de linfocitos T o un polipéptido CD3. Alternativamente, la molécula puede ser un aloantígeno o un péptido antigénico unido a una molécula de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC). La APC puede ser transfectada o transformada con un ácido nucleico que codifica el agente B7-H5 y el agente B7-H5 puede expresarse en la superficie de la APC.

45 **[0010]** La invención también presenta un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo policlonal o monoclonal) que se une a cualquiera de los polipéptidos B7-H5 de la invención, por ejemplo, el polipéptido con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1H11 o 5H9 desvelado en la presente memoria descriptiva. Dichos anticuerpos monoclonales pueden ser secretados por hibridomas.

50 **[0011]** "Polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a cualquier cadena de aminoácidos ligada a péptidos, con independencia de la longitud o la modificación posterior a la traducción. La invención también presenta polipéptidos B7-H5 con sustituciones conservadoras. Entre las sustituciones conservadoras se incluyen normalmente sustituciones con los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

[0012] El término polipéptido o fragmento de péptido "aislado" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un polipéptido o un fragmento de péptido que o bien tiene una alternativa de ocurrencia no natural (por ejemplo, un peptidomimético), o bien ha sido separado o purificado a partir de componentes que lo

acompañan de forma natural, por ejemplo, en tejidos como páncreas, hígado, bazo, ovario, testículo, músculo, tejido articular, tejido neural, tejido gastrointestinal, o líquidos corporales como sangre, suero u orina. Normalmente, el polipéptido o fragmento de péptido se considera "aislado" cuando está al menos en el 70%, en peso en seco libre de las proteínas y las moléculas orgánicas de ocurrencia natural con las que se asocia de forma natural.

- 5 Preferentemente, una preparación de un polipéptido (o fragmento de péptido del mismo) de la invención es de al menos el 80%, más preferentemente al menos el 90%, y con la máxima preferencia al menos el 99%, de peso en seco, del polipéptido (o el fragmento de péptido del mismo), respectivamente, de la invención. Así, por ejemplo, una preparación de polipéptido x es de al menos el 80%, más preferentemente al menos el 90% y con la máxima preferencia al menos el 99%, de peso en seco, del polipéptido x. Dado que un polipéptido que es sintetizado
- 10 químicamente está, por su naturaleza, separado de los componentes que lo acompañan de forma natural, el polipéptido o ácido nucleico sintético está "aislado".

- [0013]** Un polipéptido (o fragmento de péptido) aislado de la invención puede obtenerse, por ejemplo, por extracción desde una fuente natural (por ejemplo, de tejidos o líquidos corporales humanos); por expresión de un
- 15 ácido nucleico recombinante que codifica el péptido; o por síntesis química. Un péptido que es producido en un sistema celular diferente de la fuente de la que procede de forma natural está "aislado", dado que estará separado de los componentes que lo acompañan de forma natural. La magnitud del aislamiento o pureza puede medirse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis HPLC.

- 20 **[0014]** Un "ADN aislado" se refiere a un ADN libre de uno o los dos genes que flanquean al gen que contiene el ADN de interés en el genoma del organismo en el que el gen que contiene el ADN de interés existe de forma natural. El término incluye, por tanto un ADN recombinante incorporado en un vector, en un virus o plásmido de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionota o eucarionota. También incluye una molécula separada
- 25 como: un ADNc en el que el ADN genómico correspondiente tiene intrones y por tanto una secuencia diferente; un fragmento genómico; un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); un fragmento de restricción; un ADN que codifica una proteína de ocurrencia no natural, proteína de fusión o fragmento de una proteína dada; o un ácido nucleico que es una variante degenerada de un ácido nucleico de ocurrencia natural. Además, incluye una secuencia de nucleótido recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que
- 30 codifica una proteína de fusión. También se incluye un ADN recombinante que incluye una parte de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. A partir de lo anterior resultará evidente que ADN aislado no significa un ADN presente entre centenares a millones de otras moléculas de ADN dentro, por ejemplo, de bibliotecas de ADN genómico o ADNc o digestiones de restricción de ADN genómico en, por ejemplo, una mezcla de reacción de digestión de restricción o una sílice de gel de electroforesis.

- 35 **[0015]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un polipéptido que "coestimula" un linfocito T es un polipéptido que, tras la interacción con una molécula de la superficie celular en el linfocito T, potencia la respuesta del linfocito T. La respuesta del linfocito T que procede de la interacción será mayor que la respuesta en ausencia del polipéptido. La respuesta del linfocito T en ausencia del polipéptido coestimulador puede ser no
- 40 respuesta o puede ser una respuesta significativamente menor que en presencia del polipéptido coestimulador. Se entiende que la respuesta del linfocito T puede ser una respuesta de efector (por ejemplo, CTL o un linfocito B productor de anticuerpos), una respuesta de colaborador que ayuda a una o más respuestas de efector (por ejemplo, CTL o linfocito B productor de anticuerpos), o una respuesta de supresión.

- 45 **[0016]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un "estímulo activador" es una molécula que suministra una señal de activación a un linfocito T, preferentemente a través del receptor de linfocitos T (TCR) específico del antígeno. El estímulo activador puede ser suficiente para desencadenar una respuesta detectable en el linfocito T. Alternativamente, el linfocito T puede requerir coestimulación (por ejemplo, por un polipéptido B7-H5) con el fin de responder de manera detectable al estímulo activador. Entre los ejemplos de estímulos activadores se
- 50 incluyen, sin limitación, anticuerpos que se unen al TCR o a un polipéptido del complejo CD3 que está asociado físicamente con el TCR en la superficie del linfocito T, aloantígenos o un péptido antigénico unido a una molécula MHC.

- [0017]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un "fragmento" de un polipéptido B7-H5 es un
- 55 fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido inmaduro de longitud completa. Generalmente, los fragmentos serán de 5 o más aminoácidos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 21, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 260, 270, 280, 285, 290, 295, 300, 303, 306 ó 308 o más aminoácidos, de longitud. Un fragmento antigénico tiene la capacidad de ser reconocido y de unirse por medio de un anticuerpo. En algunas formas de realización, los fragmentos antigénicos son también fragmentos funcionales.

[0018] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un "fragmento funcional" de un polipéptido B7-H5 es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido inmaduro de longitud completa y tiene al menos el 25% (por ejemplo, al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o incluso el 100% o más) de la capacidad del polipéptido B7-H5 maduro de longitud completa para coestimular un linfocito T. Los procedimientos de establecimiento de si un fragmento de una molécula B7-H5 es funcional son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos de interés pueden prepararse por procedimientos digestivos recombinantes, sintéticos o proteolíticos. Dichos fragmentos pueden ser aislados a continuación y sometidos a ensayo en cuanto a su capacidad para coestimular linfocitos T por procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva.

[0019] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "unido de forma operativa" significa incorporado en una construcción genética de manera que las secuencias de control de expresión controlen eficazmente la expresión de una secuencia codificante de interés.

[0020] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo" se refiere no sólo a moléculas de anticuerpo enteras, sino también a fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv y fragmentos Fv monocatenarios. También se incluyen anticuerpos quiméricos.

[0021] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un anticuerpo que "se une específicamente" a un polipéptido B7-H5 aislado codificado por un ADN que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular un linfocito T y (ii) se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de una secuencia que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, es un anticuerpo que no se une a polipéptidos B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3 o B7-H4.

[0022] Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia los que se dirige la invención. En caso de conflicto, el presente documento, incluidas las definiciones, prevalecerá. A continuación se describen los procedimientos y materiales preferidos, aunque en la práctica o las pruebas de la presente invención pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva. Los materiales, procedimientos y ejemplos desvelados en la presente memoria descriptiva son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

[0023] Otras características y ventajas de la invención, por ejemplo, la potenciación de respuestas inmunitarias en sujetos mamíferos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, a partir de los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024]

La fig. 1 es una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) de un clon ADNc que incluye una secuencia que codifica un polipéptido B7-H5 humano. El codón de inicio de B7-H5 está indicado en negrita y subrayado. El codón de terminación de B7-H5 está indicado subrayado.

La fig. 2 es una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) que incluye una secuencia que codifica un polipéptido B7-H5 de ratón. El codón de inicio de B7-H5 está indicado en negrita y subrayado. El codón de terminación de B7-H5 está indicado subrayado.

La fig. 3 es una secuencia de aminoácidos anotada (SEQ ID NO: 1) de B7-H5 humano. El dominio de tipo IgV está subrayado; una cisteína intermolecular predicha está indicada en negrita y subrayada; el dominio de transmembrana predicho está indicado en negrita; una tirosina que está sometida potencialmente a fosforilación está recuadrada.

La fig. 4 es una secuencia de aminoácidos anotada (SEQ ID NO: 3) de B7-H5 de ratón. El dominio de tipo IgV está subrayado; una cisteína intermolecular predicha está indicada en negrita y subrayada; el dominio de transmembrana predicho está indicado en negrita; las tirosinas que están sometidas potencialmente a fosforilación están recuadradas.

La fig. 5 es una representación de la estructura del dominio de B7-H5 humano. Una secuencia de señales predicha incluye los residuos 1-29 de SEQ ID NO: 1. Un dominio de tipo inmunoglobulina (Ig) predicho incluye residuos 30-170 de SEQ ID NO: 1. Un dominio de conector predicho incluye los residuos 171-194 de SEQ ID NO: 1.

Un dominio de transmembrana predicho incluye los residuos 195-216 de SEQ ID NO: 1. Los residuos 217-311 forman un dominio intercelular predicho, con los residuos 280-292 formando un motivo estructurado/de baja complejidad. La estructura y la topología del dominio se conservan entre los polipéptidos B7-H5 humanos y de ratón.

- 5 La fig. 6 es una alineación basada en la estructura de B7-H5 y otros miembros de la familia B7. Están alineadas las secuencias de aminoácidos de segmentos de polipéptidos de la familia B7 (h: humano, m: ratón) (incluyendo B7-H5) que contienen secuencias del dominio V de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Los residuos de consenso del conjunto V de IgSF se muestran sobre fondo negro. Las posiciones de los residuos de consenso están marcadas con residuos de IgSF invariantes o carácter de residuo conservado (h: hidrófobo, p: polar). Las posiciones de
10 residuos mostradas sobre fondo gris son residuos de distintivo de la familia B7 fuera de las posiciones de consenso de IgSF. Las cadenas beta del dominio V son designadas según las convenciones de IgSF (A', B, C, C', C'', D, F, G). Las posiciones de los residuos marcadas con # intervienen en la dimerización de CD80/CD86 en sus estructuras cristalinas y los residuos marcados con asteriscos participan en la unión a CTLA4. Las secuencias de aminoácidos de los segmentos hCD80, hCD86, hB7-H1, mB7-H1, hB7-H2, hB7-H3, hB7-DC, mB7-DC, hB7-H4, mB7-H4, hB7-H5
15 y mB7-H5 se exponen en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente.

- La fig. 7 es un gráfico lineal que representa la coestimulación *in vitro* de la proliferación de linfocitos T por B7-H5. La
20 proliferación de linfocitos T se representa como incorporación de ³H-timidina (eje y; recuentos por minuto, rpm). En el eje X se indica la concentración de anticuerpos anti-CD3.

- La fig. 8A es un histograma de citometría de flujo de fluorescencia (FFC) que ilustra el número de células (eje y) con los niveles de fluorescencia indicados (eje x). Los transfectantes de células CHO que expresan células de B7-H5
25 humano (no relleno) o de CHO de transfección simulada (relleno) se sometieron a tinción con el anticuerpo monoclonal 5H9.

- La fig. 8B es un histograma de FFC que ilustra el número de células (eje y) con los niveles de fluorescencia indicados (eje x). Los transfectantes de células CHO que expresan B7-H5 humano (no relleno) o células CHO de
30 transfección simulada (relleno) se sometieron a tinción con el anticuerpo monoclonal 1H11.

La fig. 9 es una secuencia de nucleótidos traducida (SEQ ID NO: 2) de un ADNc que codifica B7-H5 humano.

- La fig. 10 es una secuencia de nucleótidos traducida (SEQ ID NO: 4) de un ADNc que codifica B7-H5 de ratón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- [0025] Los solicitantes han descubierto, entre otros, un miembro de la familia B7 de moléculas coestimuladoras, que ha sido designado como B7-H5 para su uso en la terapia de estimulación de respuesta
40 inmunitaria en un mamífero. Se desvelan los polipéptidos B7-H5 humanos y de ratón y los nucleótidos que los codifican. De forma similar a otros miembros de la familia B7, estos polipéptidos B7-H5 pueden coestimular linfocitos T.

Moléculas de ácidos nucleicos

- 45 [0026] Las moléculas de ácidos nucleicos B7-H5 de la invención pueden ser ADNc, ADN genómico, ADN sintético o ARN, y pueden ser bicatenarias o monocatenarias (es decir, con una hebra codificante o no codificante o ambas). Los fragmentos de estas moléculas también se consideran dentro del ámbito de la invención, y pueden ser producidos, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o generados por tratamiento con una o
50 más endonucleasas de restricción. Una molécula de ácido ribonucleico (ARN) puede ser producida por transcripción *in vitro*. Preferentemente, las moléculas de ácidos nucleicos codifican polipéptidos que, con independencia de la longitud, son solubles en condiciones fisiológicas normales.

- [0027] Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden contener secuencias de ocurrencia natural,
55 o secuencias que difieren de las que se producen naturalmente, pero, debido a la redundancia del código genético, codifican el mismo polipéptido (por ejemplo, los polipéptidos con SEQ ID NO: 1 o 3). Además, estas moléculas de ácidos nucleicos no están limitadas a las secuencias codificantes, por ejemplo, pueden incluir algunas o todas las secuencias no codificantes que están situadas en la dirección 5' o en la dirección 3' desde una secuencia codificante.

[0028] Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos pueden ser modificados en la fracción de base, fracción de azúcar o esqueleto de fosfato. Dicha modificación puede mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación o la solubilidad del ácido nucleico. Las modificaciones en la fracción de base pueden incluir desoxiuridina para desoxitimidina, y 5-metil-2'-desoxicitidina o 5-bromo-2'-desoxicitidina para desoxicitidina. Las modificaciones de la fracción de azúcar pueden incluir modificación del 2'-hidroxilo del azúcar ribosa para formar azúcares de 2'-O-metil o 2'-O-alilo. El esqueleto de fosfato de desoxirribosa puede ser modificado para producir ácidos nucleicos de morfolino, en los que cada fracción de base está unida a un anillo de morfolino de seis miembros, o ácidos nucleicos de péptido, en los que el esqueleto de desoxifosfato es sustituido por un esqueleto de pseudopéptido y las cuatro bases se conservan. Véase, por ejemplo, Summerton y Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195; e Hyrup y col. (1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4:5-23. Además, el esqueleto de desoxifosfato puede sustituirse, por ejemplo, por un esqueleto de fosforotioato o fosforoditioato, una fosforoamidita o un esqueleto de fosfotriéster de alquilo.

[0029] Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden sintetizarse (por ejemplo, por síntesis basada en fosoramidita) u obtenerse de una célula biológica, como la célula de un mamífero. Así, los ácidos nucleicos pueden ser los de un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, un mono), un ratón, una rata, una cobaya, una vaca, una oveja, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro o un gato.

[0030] Además, las moléculas de ácidos nucleicos aisladas de la invención comprenden segmentos que no se encuentran como tales en estado natural. Así, la invención comprende moléculas de ácidos nucleicos recombinantes (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican B7-H5) incorporadas en un vector (por ejemplo, un plásmido o un vector vírico) o en el genoma de una célula heteróloga o en el genoma de una célula homóloga en una posición distinta de la posición cromosómica natural. Las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes y los usos de las mismas se exponen en detalle más adelante.

[0031] Algunas moléculas de ácidos nucleicos de la invención son moléculas antisentido o son transcritas en moléculas antisentido. Estas pueden usarse, por ejemplo, para regular por disminución la traducción de ARNm de B7-H5 dentro de una célula. Las técnicas asociadas con la detección o regulación de genes son bien conocidas para los expertos en la materia y dichas técnicas pueden usarse para diagnosticar y/o tratar trastornos asociados con expresión aberrante de B7-H5. Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se exponen en más detalle más adelante en el contexto de su utilidad terapéutica.

[0032] Un gen o proteína de la familia B7-H5 puede ser identificado basándose en su semejanza con el gen o proteína de B7-H5 relevante, respectivamente. Por ejemplo, la identificación puede basarse en identidad de secuencia. La invención presenta moléculas de ácidos nucleicos aisladas que son idénticas a, o son al menos idénticas en el 85% (o el 95%, o el 98%) a: (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3; (b) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4; o (c) una molécula de ácido nucleico que incluye un segmento de al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ó 933 nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ó 929 nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

[0033] La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias se consigue usando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5877, 1993. Dicho algoritmo se incluye en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a B7-H5-que codifican ácidos nucleicos. Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a B7-H5. Para obtener alineaciones de ausencias para fines comparativos, se usa Gapped BLAST tal como se describe en Altschul y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros por omisión de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) (véase ncbi.nlm.nih.gov).

[0034] La hibridación puede usarse también como una medida de la homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos. Puede usarse una secuencia de ácido nucleico de codificación de B7-H5, o una parte de la misma, como sonda de hibridación según técnicas de hibridación estándar. La hibridación de una sonda B7-H5 a ADN desde una fuente de prueba (por ejemplo, una célula de mamífero) es una indicación de la presencia de ADN de B7-H5 en la fuente de prueba. Las condiciones de hibridación son conocidas para los expertos en la materia y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Las condiciones

de hibridación moderadas se definen como equivalentes a la hibridación en 2x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 30°C, seguido por uno o más lavados en 1x SSC, SDS al 0,1% a 50-60°C. Las condiciones altamente rigurosas se definen como equivalentes a hibridación en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2x SSC, SDS al 0,1% a 50-65°C.

5

[0035] Los vectores pueden comprender: (a) vectores que contienen cualquiera de las secuencias codificantes relacionadas con B7-H5 anteriores y/o sus complementos (es decir, secuencia "antisentido"); (b) vectores de expresión que contienen cualquiera de las secuencias codificantes relacionadas con B7-H5 anteriores operativamente ligadas a uno o más elementos de transcripción/traducción (de los cuales se ofrecen ejemplos más adelante) que dirigen la expresión de las secuencias codificantes; (c) vectores de expresión que contienen, además de secuencias que codifican un polipéptido B7-H5, secuencias de ácidos nucleicos que no están relacionadas con secuencias de ácidos nucleicos que codifican B7-H5, como moléculas que codifican un indicador, marcador o un péptido de señal, por ejemplo, fusionadas con B7-H5; y (d) células de hospedador diseñadas genéticamente que contienen cualquiera de los vectores de expresión anteriores y, por tanto, expresan las moléculas de ácidos nucleicos de la invención.

15

[0036] Las moléculas de ácidos nucleicos recombinantes pueden contener una secuencia que codifica B7-H5 que tiene una secuencia de señal heteróloga. El polipéptido B7-H5 de longitud completa, un dominio de B7-H5, o un fragmento del mismo puede fusionarse con polipéptidos adicionales, tal como se describe más adelante. Análogamente, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden codificar la forma madura de B7-H5 o una forma que incluye un polipéptido exógeno que facilita la secreción.

20

[0037] Los elementos reguladores de transcripción/traducción referidos anteriormente y que se describen más en detalle más adelante, incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles y no inducibles, potenciadores, operadores y otros elementos, que son conocidos para los expertos en la materia, y que activan o regulan de otro modo la expresión génica. Dichos elementos reguladores incluyen pero no se limitan a, el gen temprano inmediato de citomegalovirus hCMV, los promotores tempranos o tardíos de adenovirus SV40, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, las regiones de operadores y promotores principales del fago A, las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfogliceratocinasa, los promotores de fosfatasa ácida y los promotores de los factores de acoplamiento α de levadura.

30

[0038] Análogamente, el ácido nucleico puede formar parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales, por ejemplo, secuencias que funcionan como marcador o indicador. Entre los ejemplos de genes marcadores o indicadores se incluyen β -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosin-desaminasa (ADA), aminoglucósido-fosfotransferasa (neor, G418r), dihidrofolato-reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina-cinasa (TK), *lacZ* (que codifica β -galactosidasa) y xantina-guanina-fosforribosiltransferasa (XGPRT). Como en muchos de los procedimientos estándar asociados con la práctica de la invención, los expertos en la materia conocerán reactivos útiles adicionales, por ejemplo, secuencias adicionales que pueden servir en función de marcador o indicador. Generalmente, el polipéptido híbrido incluirá una primera parte y una segunda parte; siendo la primera parte un polipéptido B7-H5 (o cualquier fragmento de dicho polipéptido desvelado en la presente memoria descriptiva) y siendo la segunda parte, por ejemplo, el indicador descrito anteriormente o una región constante de Ig o parte de una región constante de Ig, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 de IgG2a.

40

[0039] Los sistemas de expresión que pueden usarse para los fines de la invención incluyen, pero no se limitan a, microorganismos como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen las moléculas de ácidos nucleicos de la invención; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen las moléculas de ácidos nucleicos de la invención, preferentemente que contienen una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 ó 4) que codifica un polipéptido B7-H5; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las moléculas de ácidos nucleicos de la invención; sistemas de célula de plantas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de nucleótidos B7-H5; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI38 y NIH 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus y el promotor 7.5K del virus vacunal). También son útiles como células hospedadoras las células primarias o secundarias obtenidas

55

directamente de un mamífero transfectado con un vector de plásmido o infectado con un vector vírico.

- [0040]** Puede usarse una célula hospedadora (por ejemplo, una célula procariota o una célula eucariota como una célula COS), por ejemplo, para producir los polipéptidos coestimuladores proporcionados en la presente memoria descriptiva. En algunas formas de realización, puede usarse una célula hospedadora (por ejemplo, una APC) para expresar los polipéptidos coestimuladores de la invención para presentación a un linfocito T.

Polipéptidos y fragmentos de polipéptidos

- [0041]** Los polipéptidos de la invención incluyen B7-H5 y fragmentos funcionales del mismo. Los polipéptidos desvelados en la presente memoria descriptiva incluyen también proteínas de fusión que contienen B7-H5 de longitud completa o un fragmento funcional del mismo fusionado con una secuencia de aminoácidos no relacionada. Las secuencias no relacionadas pueden ser dominios funcionales adicionales o péptidos de señal. Los péptidos de señal se describen con más detalle y se ilustran con ejemplos más adelante. Los polipéptidos también pueden ser cualesquiera de los descritos anteriormente pero con una o más sustituciones conservadoras.

- [0042]** Los polipéptidos pueden purificarse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, sangre, plasma sérico, tejidos o células como linfocitos T o cualquier célula que produce B7-H5 naturalmente). Los polipéptidos también pueden ser sintetizados convenientemente con medios químicos estándar. Además, los polipéptidos pueden ser producidos por técnicas de ADN recombinante *in vitro* estándar y recombinación *in vivo*/recombinación genética (por ejemplo, transgénesis), usando las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos apropiados. Pueden usarse procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes relevantes y señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.) (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989), y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989).

- [0043]** Los polipéptidos y los fragmentos de la invención incluyen también los descritos anteriormente, pero modificados para uso *in vivo* mediante la adición, en los extremos de terminal amino- y/o carboxilo, de un agente de bloqueo para facilitar la supervivencia del polipéptido *in vivo* relevante. Esto puede ser útil en aquellas situaciones en las que los extremos peptídicos suelen ser degradados por proteasas antes de la captación celular. Dichos agentes de bloqueo pueden incluir, sin limitación, secuencias peptídicas adicionales relacionadas o no relacionadas que pueden unirse a los residuos de terminal amino y/o carboxilo del péptido que se administrará. Esto puede realizarse por medios químicos durante la síntesis del péptido o por tecnología de ADN recombinante por procedimientos conocidos para los expertos en la materia.

- [0044]** Alternativamente, los agentes de bloqueo como el ácido piroglutámico u otras moléculas conocidas que según la técnica pueden unirse a los residuos del terminal amino y/o carboxilo, o al grupo amino en el extremo amino o al grupo carboxilo en el extremo carboxilo, pueden sustituirse por una fracción diferente. Análogamente, los péptidos pueden acoplarse de forma covalente o no covalente a proteínas "de soporte" farmacéuticamente aceptables antes de la administración.

- [0045]** Los polipéptidos B7-H5 pueden purificarse usando, por ejemplo, procedimientos cromatográficos como intercambio iónico DEAE, filtración de gel y cromatografía de hidroxipatito. Por ejemplo, un polipéptido B7-H5 en un sobrenadante de cultivo celular o un extracto citoplásmico pueden purificarse usando una columna de proteína G. En algunas formas de realización, los polipéptidos B7-H5 pueden "diseñarse" para contener una secuencia de aminoácidos que permite a los polipéptidos ser capturados en una matriz de afinidad. Por ejemplo, puede usarse una etiqueta como c-myc, glutatióna S-transferasa (GST), hemaglutinina, polihistidina o Flag™ (Kodak) para ayudar a la purificación de polipéptidos. Dichas etiquetas pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, incluyendo en el extremo carboxilo o amino. También puede usarse cromatografía de inmunoafinidad para purificar polipéptidos coestimuladores.

- [0046]** También son de interés los compuestos peptidomiméticos que están diseñados basándose en las secuencias de aminoácidos de los fragmentos funcionales de péptidos. Los compuestos peptidomiméticos son compuestos sintéticos que tienen una conformación tridimensional (es decir, un "motivo peptídico") que es sustancialmente el mismo que la conformación tridimensional de un péptido seleccionado. El motivo peptídico proporciona al compuesto peptidomimético la capacidad de coestimular linfocitos T de una forma cualitativamente idéntica a la del fragmento funcional de péptido B7-H5 del cual se obtuvo el peptidomimético. Los compuestos peptidomiméticos pueden tener características adicionales que potencian su utilidad terapéutica, como aumento de

la permeabilidad celular y vida media biológica prolongada.

[0047] Los peptidomiméticos tienen normalmente un esqueleto que es parcial o totalmente no peptídico, pero con grupos laterales que son idénticos a los grupos laterales del residuo de aminoácidos que se producen en el péptido en el cual se basa el peptidomimético. En la técnica se conocen varios tipos de enlaces químicos, por ejemplo, enlaces éster, tioéster, tioamida, retroamida, carbonilo reducido, dimetileno y cetometileno, que en general son sustitutos útiles para enlaces peptídicos en la construcción de peptidomiméticos resistentes a la proteasa.

Procedimientos de coestimulación de un linfocito T

[0048] Los procedimientos de la invención implican la puesta en contacto de un linfocito T con un polipéptido B7-H5 de la invención, o un fragmento funcional del mismo, con el fin de coestimular el linfocito T. Dichos polipéptidos o fragmentos funcionales pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas a secuencias naturales o pueden contener una o más sustituciones conservadoras. La puesta en contacto puede producirse antes, durante o después de la activación del linfocito T. La puesta en contacto del linfocito T con el polipéptido B7-H5 se realizará preferentemente de forma sustancial en el mismo momento de la activación. La activación puede hacerse, por ejemplo, mediante la exposición del linfocito T a un anticuerpo que se une al receptor de linfocitos T (TCR) o uno de los polipéptidos del complejo CD3 que está asociado físicamente con el TCR. Alternativamente, el linfocito T puede estar expuesto a un aloantígeno (por ejemplo, un aloantígeno principal de histocompatibilidad (MHC)), por ejemplo, en una célula presentadora de antígeno (APC) (por ejemplo, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito o un linfocito B) o un péptido antigénico producido por procesamiento de un antígeno de proteína por cualquiera de las APC anteriores y presentado al linfocito T por moléculas MHC en la superficie de la APC. El linfocito T puede ser un linfocito T CD4+ o un linfocito T CD8+. El polipéptido B7-H5 puede añadirse a la solución que contiene las células, o puede expresarse en la superficie de una APC, por ejemplo, una APC que presenta un aloantígeno o un péptido de antígeno unido a una molécula MHC. Alternativamente, si la activación es *in vitro*, el polipéptido B7-H5 puede unirse a una superficie del recipiente de cultivo pertinente, por ejemplo, un pocillo de una placa de microvaloración de plástico.

[0049] Los procedimientos se realizan *in vitro*. La aplicación *in vitro* de B7-H5 puede ser útil, por ejemplo, en estudios científicos básicos de mecanismos inmunitarios o para producción de linfocitos T activados para su uso en estudios de la función de los linfocitos T o, por ejemplo, inmunoterapia pasiva. Además, podría añadirse B7-H5 a ensayos *in vitro* (por ejemplo, en ensayos de proliferación de linfocitos T) diseñados para probar la inmunidad en un antígeno de interés en un sujeto a partir del cual se obtuvieron los linfocitos T. Además de B7-H5 en dichos ensayos sería de esperar que dieran como resultado una respuesta *in vitro* más potente, y por tanto más fácil de detectar.

[0050] Los polipéptidos B7-H5 y variantes de los mismos son útiles generalmente como terapéutica de estimulación de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por inmunosupresión: por ejemplo, cáncer, SIDA o complejo relacionado con el SIDA, otras afecciones inducidas por virus o de origen ambiental y ciertas deficiencias inmunitarias congénitas. Los polipéptidos pueden emplearse también para aumentar la función inmunitaria que se ha visto deteriorada por el uso de radioterapia o fármacos inmunosupresores como ciertos agentes quimioterapéuticos, y por tanto son especialmente útiles cuando se suministran en conjunción con dichos fármacos o radioterapia. Los polipéptidos pueden usarse, además, para potenciar respuestas inmunitarias en sujetos normales.

Estrategias *in vivo*

[0051] En una estrategia *in vivo*, se administra un polipéptido B7-H5 (o un fragmento funcional del mismo) al sujeto. Generalmente, los compuestos de la invención se suspenderán en un soporte farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, suero salino fisiológico) y se administran oralmente o por infusión intravenosa, o se inyectan por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonar. Se suministran preferentemente de forma directa a un tejido linfoide apropiado (por ejemplo, bazo, ganglio linfático o tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT)). La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la dolencia del paciente, el tamaño del sujeto, el peso, el área superficial, la edad y el sexo, administrándose otros fármacos, y el criterio de médico. Las dosis adecuadas están en el intervalo de 0,01 a 10 mg/kg. Son de esperar amplias variaciones en la dosificación necesaria a la luz de la diversidad de polipéptidos y fragmentos disponibles y de las diferentes eficacias de las distintas vías de administración. Por ejemplo, sería de esperar que la administración oral requiriera dosis más elevadas que la administración por inyección i.v. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para optimización como es bien conocido en la técnica. Las administraciones

pueden ser únicas o múltiples (por ejemplo, 2 ó 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 o más veces). La encapsulación del polipéptido en un vehículo de suministro adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia del suministro, especialmente para suministro oral.

- 5 **[0052]** Alternativamente, puede suministrarse un polinucleótido que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido B7-H5 o un fragmento funcional del mismo a una célula apropiada del animal. La expresión de la secuencia codificante se dirigirá preferentemente a tejido linfóide del sujeto, por ejemplo, mediante suministro del polinucleótido al tejido linfóide. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de suministro de micropartículas o microcápsulas poliméricas biodegradables, dimensionado para optimizar la fagocitosis por células fagocitarias como macrófagos. Por ejemplo, pueden usarse micropartículas de PLGA (polilacto-co-glicólido) de aproximadamente 1 a 10 μm de diámetro. El polinucleótido está encapsulado en estas micropartículas, que son englobadas por macrófagos y biodegradadas gradualmente dentro de la célula, liberando con ello el polinucleótido. Una vez liberadas, el ADN se expresa dentro de la célula. Se pretende que un segundo tipo de micropartícula no sea englobado directamente por las células, sino que sirva más bien principalmente como un reservorio de liberación lenta de ácido nucleico que es englobado por las células sólo tras la liberación de la micropartícula a través de la biodegradación. Estas partículas poliméricas deberían ser, por tanto, suficientemente grandes para impedir la fagocitosis, es decir, de más de 5 μm y preferentemente de más de 20 μm .

- [0053]** Otra forma de conseguir la captación del ácido nucleico es mediante el uso de liposomas, preparados por procedimientos estándar. Los vectores descritos en la presente memoria descriptiva pueden incorporarse en solitario en estos vehículos de suministro o incorporarse con anticuerpos específicos del tejido. Alternativamente, se puede preparar un conjugado molecular compuesto por un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina por fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor en células diana (Cristiano y col. (1995), J. Mol. Med. 73, 479). Alternativamente, puede conseguirse direccionamiento específico de tejido linfóide mediante el uso de elementos reguladores transcripcionales (TRE) específicos de tejido linfóide como TRE específicos de linfocitos B, linfocitos T o células dendríticas. Los TRE específicos de tejido linfóide son conocidos (Thompson y col. (1992), Mol. Cell. Biol. 12, 1043-1053; Todd y col. (1993), J. Exp. Med. 177, 1663-1674; Penix y col. (1993), J. Exp. Med. 178, 1483-1496). El suministro de "ADN desnudo" (es decir, sin un vehículo de suministro) en un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio de conseguir expresión *in vivo*.

- 30 **[0054]** En los polinucleótidos relevantes (por ejemplo, vectores de expresión) la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido B7-H5 o un fragmento funcional de interés con una metionina de iniciador y opcionalmente una secuencia de direccionamiento está unida operativamente a un promotor o una combinación de potenciador-promotor.

- 35 **[0055]** Las secuencias de aminoácidos cortas pueden actuar como señales para dirigir proteínas a compartimentos intracelulares específicos. Por ejemplo, los péptidos de señal hidrófobos (por ejemplo, MAISGVPVLGFFIIAVLMSAQESWA (SEQ ID NO: 7)) se encuentran en el extremo amino de proteínas destinadas al retículo endoplásmico (RE). Mientras se sabe que la secuencia KFERQ (SEQ ID NO: 8) y otras secuencias estrechamente relacionadas dirigen polipéptidos intracelulares a lisosomas, otras secuencias (por ejemplo, MDDQRDLISNNEQLP (SEQ ID NO: 9) dirigen polipéptidos a endosomas. Además, se ha demostrado que la secuencia peptídica KDEL (SEQ ID NO: 10) actúa como una señal de retención para el RE. Cada uno de estos péptidos de señal, o una combinación de los mismos, puede usarse para el tráfico de polipéptidos B7-H5 o fragmentos funcionales de la invención según se desee. Los ADN que codifican los polipéptidos B7-H5 o fragmentos funcionales que contienen señales de direccionamiento serán generados por PCR u otras técnicas estándar de síntesis o ingeniería genética.

- [0056]** Un promotor es un TRE compuesto por una región de una molécula de ADN, normalmente dentro de 100 pares de bases en la dirección 5' del punto en el que comienza la transcripción. Los potenciadores proporcionan especificidad de expresión en términos de tiempo, posición y nivel. A diferencia de un promotor, un potenciador puede funcionar cuando está situado a distancias variables del sitio de transcripción, siempre que esté presente un promotor. Un potenciador también puede estar situado en la dirección 3' del sitio de inicio de la transcripción. Para poner una secuencia codificante bajo el control de un promotor, es necesario colocar el sitio de inicio de traducción del marco de lectura de traducción del péptido o polipéptido entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos en la dirección 3' del promotor. La secuencia codificante del vector de expresión está unida operativamente a una región de terminación de transcripción.

- [0057]** Entre los vectores de expresión adecuados se incluyen plásmidos y vectores víricos como virus del herpes, retrovirus, virus vacunales, virus vacunales atenuados, virus de la viruela del canario, adenovirus y virus

adenoasociados, entre otros.

[0058] Los polinucleótidos pueden administrarse en un soporte farmacéuticamente aceptable. Los soportes farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para su administración a un ser humano, por ejemplo, suero salino fisiológico. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del polinucleótido que es capaz de producir un resultado médicamente deseable (por ejemplo, una respuesta mejorada de linfocitos T) en un animal sometido a tratamiento. Como es bien conocido en las ciencias médicas, la dosificación para cualquier paciente en particular depende de muchos factores, entre ellos el tamaño del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el compuesto en particular que se administrará, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando de forma concurrente. Las dosis variarán, si bien una dosificación preferida para la administración de un polinucleótido es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula del polinucleótido. Esta dosis puede administrarse repetidamente según sea necesario. Las vías de administración pueden ser cualesquiera de las enumeradas anteriormente.

[0059] En estas estrategias *in vivo* se incluyen procedimientos de coestimulación de un linfocito T que implican la administración de más de una molécula coestimuladora o fragmento funcional de la misma. Dichas combinaciones pueden ser cualquier combinación de uno o más de polipéptidos coestimuladores, por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, 4-1BB, OX40 o HVEM y fragmentos funcionales de cualquiera de ellos. Las proteínas o fragmentos funcionales pueden administrarse de por sí o bien pueden administrarse ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores de expresión) que codifican las proteínas o fragmentos funcionales. Cuando se usan vectores de expresión, puede administrarse un único vector que contenga secuencias codificantes para dos o más de los polipéptidos coestimuladores o fragmentos funcionales. Alternativamente, pueden administrarse múltiples (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6) vectores individuales, cada uno de los cuales codifica uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6) de los polipéptidos coestimuladores o fragmentos funcionales de los mismos.

Estrategias ex vivo

[0060] Pueden extraerse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente o de un donante adecuado y exponerse *ex vivo* a un estímulo activador (véase más arriba) y un polipéptido B7-H5 o fragmento de polipéptido (ya sea en forma soluble o fijo a un soporte sólido mediante metodologías estándar). A continuación las PBMC que contienen linfocitos T altamente activados se introducen en el mismo paciente u otro diferente.

[0061] Una estrategia *ex vivo* alternativa puede implicar la transfección o transducción de células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un polipéptido B7-H5 o secuencias de ácidos nucleicos que codifican fragmentos funcionales descritos anteriormente. Las células transfectadas o transducidas se devuelven a continuación al sujeto. Dichas células son preferentemente células hematológicas (por ejemplo, células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas o linfocitos B), aunque pueden ser también cualquiera de una amplia variedad de tipos que incluyen, sin limitación, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares en las que actúan como una fuente del polipéptido B7-H5 o fragmento funcional del mismo mientras sobreviven en el sujeto. El uso de células hematológicas que incluyen las APC anteriores sería especialmente ventajoso porque sería de esperar que dichas células alojaran, entre otros, tejido linfóide (por ejemplo, ganglios linfáticos o bazo) y así el polipéptido B7-H5 o fragmento funcional sería producido en alta concentración en el sitio en el que ejercen su efecto, es decir, potenciación de una respuesta inmunitaria. Además, si se usa APC, la APC que expresa la molécula B7-H5 exógena puede ser la misma APC que presenta un aloantígeno o péptido antigénico al linfocito T pertinente. Los polipéptidos B7-H5 pueden ser secretados por la APC o expresarse en su superficie. Antes de devolver la APC recombinante al paciente, pueden ser expuestas opcionalmente a fuentes de antígenos o péptidos antigénicos de interés, por ejemplo, de tumores, microorganismos infecciosos o autoantígenos. Las mismas construcciones genéticas y secuencias de tráfico descritas para la estrategia *in vivo* pueden usarse para esta estrategia *ex vivo*. Además, células tumorales, obtenidas preferentemente de un paciente, pueden ser transfectadas o transformadas por un vector que codifica un polipéptido B7-H5 o fragmento funcional del mismo. Las células tumorales, preferentemente tratadas con un agente (por ejemplo, radiación ionizante) que interrumpe su capacidad proliferativa, son devueltas a continuación al paciente en el que, debido a su expresión de los polipéptidos B7-H5 exógenos (en su superficie celular o secretados), pueden estimular respuestas inmunitarias de linfocitos T tumorocidas mejoradas. Se entiende que las células tumorales que, después de transfección o transformación, son inyectadas en el paciente, también pueden haberse obtenido originalmente de una persona distinta del paciente.

[0062] Los procedimientos *ex vivo* incluyen las etapas de recogida de células de un sujeto, el cultivo de las células, su transducción con un vector de expresión y el mantenimiento de las células en condiciones adecuadas

para la expresión del polipéptido B7-H5 o fragmento funcional. Estos procedimientos son conocidos en la técnica de la biología molecular. La etapa de transducción es realizada por cualquier medio estándar usado para terapia génica *ex vivo*, incluyendo fosfato de calcio, lipofección, electroporación, infección vírica y transferencia génica biolística. Alternativamente, pueden usarse liposomas o micropartículas poliméricas. Las células que se han transducido con éxito se seleccionan a continuación, por ejemplo, para expresión de la secuencia codificante o de un gen con resistencia a los fármacos. A continuación las células pueden someterse a irradiación letal (si se desea) e inyectarse o implantarse en el paciente.

[0063] Debe entenderse que en estos procedimientos *ex vivo*, las células que se introducirán en un sujeto pueden ser transfectadas o transformadas con uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) vectores de expresión que contienen una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) secuencias que codifican cualquier de las moléculas coestimuladoras enumeradas anteriormente (por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4 o B7-H5) o fragmentos funcionales del mismo antes de la introducción.

15 Procedimientos de cribado para compuestos que inhiben o potencian las respuestas inmunitarias

[0064] La invención proporciona procedimientos para someter a prueba compuestos (moléculas pequeñas o macromoléculas) que inhiben o potencian una respuesta inmunitaria. Dicho procedimiento puede implicar, por ejemplo, el cultivo de un polipéptido B7-H5 de la invención (o un fragmento funcional del mismo) con linfocitos T en presencia de un estímulo de linfocitos T (véase más arriba). La molécula B7-H5 puede estar en solución o unida a membrana (por ejemplo, expresada en la superficie de los linfocitos T) y puede ser natural o recombinante. Además, los polipéptidos B7-H5 (o fragmentos funcionales de los mismos) pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas a secuencias naturales o pueden tener una o más sustituciones conservadoras. Los compuestos que inhiben la respuesta del linfocito T serán probablemente compuestos que inhiben una respuesta inmunitaria mientras que los que potencian la respuesta del linfocito T serán probablemente compuestos que potencian una respuesta inmunitaria.

[0065] La invención también se refiere al uso de B7-H5 o fragmentos funcionales de los mismos para cribar compuestos inmunomoduladores que puedan interactuar con B7-H5. Un experto en la materia sabría cómo usar modelización molecular estándar u otras técnicas para identificar moléculas pequeñas que se unirían a sitios interactivos de linfocitos T de B7-H5. Se proporciona un ejemplo en Broughton (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 392-398.

[0066] Un compuesto candidato puede modular, por ejemplo, inhibir o potenciar, una respuesta inmunitaria. Un compuesto candidato que provoca un requisito de al menos 1,5 veces (por ejemplo, 2 veces, 4 veces, 6 veces, 10 veces, 150 veces, 1.000 veces, 10.000 veces o 100.000 veces) más B7-H5 con el fin de conseguir un nivel arbitrario definido de activación de linfocitos T que en ausencia del compuesto puede ser útil para inhibir una respuesta inmunitaria. Por otra parte, un compuesto candidato que provoca un requisito de al menos 1,5 veces (por ejemplo, 2 veces, 4 veces, 6 veces, 10 veces, 100 veces, 1.000 veces, 10.000 veces o 100.000 veces) menos B7-H5 para conseguir un nivel arbitrario definido de activación de linfocitos T que en ausencia del compuesto puede ser útil para potenciar una respuesta inmunitaria. Los compuestos capaces de interferir con o de modular la función B7-H5 son buenos candidatos para agentes inmunorreguladores inmunosupresores, por ejemplo, para modular una respuesta autoinmunitaria o suprimir rechazo de aloinjerto o xenoinjerto.

45 Anticuerpos B7-H5

[0067] La invención presenta anticuerpos que se unen a los polipéptidos B7-H5 o los fragmentos de dichos polipéptidos. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales presentes en el suero o plasma de animales (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas, ovejas, caballos, cabras, vacas o cerdos) que han sido inmunizados con el polipéptido B7-H5 o fragmento de péptido relevante usando procedimientos, y opcionalmente adyuvantes, conocidos en la técnica. Dichos anticuerpos policlonales pueden ser aislados de suero o plasma por procedimientos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales que se unen a los polipéptidos o fragmentos anteriores también están comprendidos por la invención, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 5H9 o 1H11 desvelado en la presente memoria descriptiva. Los procedimientos de preparación y cribado de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica.

[0068] Una vez que se ha seleccionado y clonado el hibridoma de producción de anticuerpos deseado, el anticuerpo resultante puede ser producido por cualquiera de una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el hibridoma puede ser cultivado *in vitro* en un medio adecuado durante un tiempo adecuado, seguido

por la recuperación del anticuerpo deseado del sobrenadante. El tiempo y el medio son conocidos o pueden determinarse fácilmente.

[0069] Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes específicos para B7-H5, como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprenden partes humanas y no humanas, están dentro del ámbito de la invención. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, usando procedimientos descritos en Robinson y col., Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02.269; Akira y col., Solicitud de Patente Europea 184.187; Taniguchi, Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison y col., Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger y col., Solicitud PCT WO-86/01.533; Cabilly y col., Patente de EE.UU. nº 4.816.567; Cabilly y col., Solicitud de Patente Europea 125.023; Better y col. (1988) Science 240, 1041-43; Liu y col. (1987) J. Immunol. 139,3521-26; Sun y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 214-18; Nishimura y col. (1987) Canc. Res. 47, 999-1005; Wood y col. (1985) Nature 314, 446-49; Shaw y col. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80, 1553-59; Morrison, (1985) Science 229, 1202-07; Oi y col. (1986) BioTechniques 4, 214; Winter, Patente de EE.UU. nº 5.225.539; Jones y col. (1986) Nature 321, 552-25; Veroeyan y col. (1988) Science 239, 1534; y Beidler y col. (1988) J. Immunol. 141, 4053-60.

[0070] También se incluyen en el ámbito de la invención fragmentos de anticuerpos y derivados que contienen al menos la parte funcional del dominio de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a B7-H5. Los fragmentos de anticuerpos que contienen el dominio de unión de la molécula pueden ser generados por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a: fragmentos F(ab')₂ que pueden ser producidos por digestión de pepsina de moléculas de anticuerpos; fragmentos Fab que pueden ser generados por reducción de puentes de disulfuro de fragmentos F(ab')₂; y fragmentos Fab que pueden ser generados por tratamiento de moléculas de anticuerpo con papaína y un agente reductor. Véase, por ejemplo, National Institutes of Health, 1 Current Protocols in Immunology, Coligan y col., ed. 2.8, 2.10 (Wiley Interscience, 1991). Los fragmentos de anticuerpos incluyen también fragmentos Fv (por ejemplo, cadena única Fv (scFv)), es decir, productos de anticuerpos en los que no existen residuos de aminoácidos de región constante. Dichos fragmentos pueden ser producidos, por ejemplo, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.642.334.

Estructura de moléculas de la familia B7-CD28

[0071] Todas las moléculas de tipo B7, por ejemplo, B7-H5, y sus receptores son glucoproteínas de membrana de tipo I y son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Los miembros de la familia B7 comparten el 20-35% de identidad en sus secuencias de aminoácidos. A pesar de una homología tan baja en la composición de aminoácidos primarios, estas moléculas comparten una estructura secundaria similar: un único dominio extracelular de tipo Ig V e Ig C. Cuatro residuos de cisteína, que intervienen en la formación de los puentes de disulfuro de los dominios IgV e IgC, están bien conservados. Los receptores para la familia B7 son miembros de la familia CD28, y poseen un único dominio extracelular de tipo IgV. Sus colas citoplásmicas contienen motivos posibles SH2- y SH3- que, según se cree, intervienen en la transducción de señales.

[0072] Por cristalografía y modelización molecular, se han determinado estructuras terciarias para ligandos y receptores de la superfamilia B7-CD28. Las interacciones de pares de receptor-ligando están mediadas predominantemente a través de residuos en sus dominios IgV. En general, los dominios IgV son descritos como hebras β de dos capas con láminas "frontal" y "posterior". Las láminas frontal y posterior del dominio de IgV CTLA-4 consisten en hebras A'GFCC' y ABEDC", respectivamente, mientras que las láminas frontal y posterior de los dominios IgV B7-1/B7-2 están compuestas por hebras AGFCC'C" y BED, respectivamente. Las caras de unión entre CTLA-4/CD28 y B7-1/B7-2 están dominadas por la interacción del bucle análogo CDR3 de CTLA-4/CD28, centrado en el motivo MYPPPY, con la superficie formada predominantemente por residuos conservados entre B7-1 y B7-2 en las hebras G, F, C, C' y C". El motivo MYPPPY no se conserva en moléculas coestimuladoras inducibles (ICOS), pero una secuencia FDPPPF relacionada en la posición análoga se identifica como un determinante principal para la unión de ICOS a B7-H2. Aunque la posición de los sitios de unión PD-1 en B7-H1/B7-DC corresponde a los sitios de unión CTLA-4/CD28 en B7-1/B7-2, B7-H1 y B7-DC usan residuos no conservados en su cara A'GFCC'C" para unirse a PD-1. Las estructuras cristalinas de complejos CTLA-4/B7 contienen homodímeros bivalentes de CTLA-4 con sitios de unión a B7 situados distalmente a la interfaz de dímero CTLA-4, lo que sugiere que el homodímero CTLA-4 puede unirse a homodímeros no covalentes de B7-1 o B7-2 para formar una red de interacciones CTLA-4/B7. Según se cree, la formación de dicha red desencadena la formación de complejos de señalización estables como parte de la sinapsis inmunológica. Un experto en la materia observará que la estructura tridimensional de moléculas B7-H5 es probablemente similar a la de otros miembros de la familia B7.

[0073] El ejemplo siguiente pretende ilustrar, no limitar, la invención.

EJEMPLO

[0074] Se identificó un ADNc de *B7-H5* humano (fig. 1; SEQ ID NO: 5) a partir de la base de datos NCBI basándose en homología con otras moléculas de la familia B7, entre ellas B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H1 (PD-L1), B7-H2 (B7hB7RP-1), B7-H3, B7-DC (PD-L2) y B7-H4 (B7x). Se amplificó ADNc de *B7-H5* humano de longitud completa (fig. 9; SEQ ID NO: 2) por PCR con PFU polimerasa (Stratagene, CA) a partir de ADNc de placenta humana (Clontech, CA), clonado en vector pcDNATM3.1 (Invitrogen, CA) y confirmado por secuenciación de ADN. Se identificó un ADNc de *B7-H5* de ratón (fig. 2, SEQ ID NO: 6) a partir de las bases de datos NCBI y Celera basado en la homología de las mismas moléculas de la familia B7. Para aislar el homólogo de *B7-H5* de ratón, se usaron varios conjuntos de cebadores basados en secuencias EST de ratón y humanas para amplificar ADNc de *B7-H5* de ratón (fig. 10; SEQ ID NO: 4) a partir de ADNc de bazo de un ratón C57BL/6 (B6). Análogamente se clonó ADNc de *B7-H5* de ratón ADNc de longitud completa en vector pcDNATM3.1 y se confirmó por secuenciación de ADN.

[0075] Los modelos moleculares de los dominios V del extremo N de *B7-H5* humano (fig. 5) y *B7-H5* de ratón se construyeron por modelización de homología basándose en las estructuras de rayos X de CD80 y CD86 humano (Stamper y col., 2001, Nature 410: 08-611; Schwartz y col., 2001, Nature 410:604-608) usando MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Quebec, Canadá). Se modelizaron inserciones y deleciones en *B7-H5* de ratón y humano en relación con plantilla(s) estructural(es) empleando un procedimiento de correspondencia de bases de datos de proteínas (Levitt, 1992, J. Mol. Biol. 226:07-533; Fechteler y col., 1995, J. Mol. Biol. 253:114-131) implementado en MOE. Se realizaron sustituciones de cadenas laterales usando una biblioteca de rotámeros (Ponder y Pichards, 1987, J. Mol. Biol. 193:775-791) extraída de estructuras de bancos de datos de proteínas de alta resolución (Berman y col., 2000, Nucleic Acids Res. 28:235-242). Se optimizaron los contactos intramoleculares y la estereoquímica de los modelos mediante reducción al mínimo de la energía limitada usando parámetros de campo de fuerza de proteínas (Engh y Huber, 1991, Acta Crystallogr. A47:392-400). Se realizaron estudios de correspondencia de residuos y análisis gráfico informático con InsightII (MSI, CA). Se predijo que los polipéptidos *B7-H5* humanos y de ratón contenían un dominio de tipo IgV, que interviene en la interacción de moléculas B7 con sus receptores cognados. Se predijo también que los polipéptidos *B7-H5* humanos y de ratón contienen un único dominio de transmembrana, se predijo que una cisteína intervendría en la dimerización, por ejemplo, heterodimerización, y se predijo que una tirosina en el dominio citoplásmico sería fosforilada durante la señalización. Es altamente probable que dos cisteínas estructurales, según se indica en la fig. 3, contribuyan a la formación del dominio IgV. Los aminoácidos adicionales pueden formar una región de tipo constante de inmunoglobulina no típica tal como se indica en la fig. 5.

[0076] La fig. 6 muestra una alineación de las secuencias de dominio V de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) de la familia B7 (h: humano, m: ratón), que incluye *B7-H5*. Los residuos de consenso del conjunto de IgSF según Williams y Barclay (1998, Annu. Rev. Immunol. 6: 381-405) y Bork y col. (1994, J Mol. Biol. 242:309-320), y se muestran sobre fondo negro. Las posiciones de los residuos de consenso están marcadas con residuos de IgSF invariantes o carácter de residuos conservados (h: hidrófobo, p: polar). Las posiciones de residuos mostradas sobre fondo gris son residuos de distintivo de la familia B7 fuera de las posiciones de consenso IgSF. Las hebras beta del dominio V se designan según las convenciones de IgSF (A', B, C, C', C'', D, F, G). Las posiciones de residuos marcadas con # intervienen en la dimerización de CD80/CD86 en sus estructuras cristalinas y los residuos marcados con asteriscos participan en la unión a proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4).

[0077] Basándose en esta alineación, en *B7-H5* humano y de ratón, los residuos de consenso del conjunto V IgSF 14/16 y los residuos de distintivos B7 12/13 se conservan. Esta es una fuerte evidencia de que estas proteínas tienen dominios B7 de tipo V.

[0078] Las características más singulares en estos dominios son las inhabituales inserciones en los bucles A'-B y C-D, que incluyen cisteínas libres. Estos bucles son espacialmente adyacentes en la región de extremo C del dominio V, en su interfaz con regiones posteriores. Los residuos de cisteína estarían disponibles para uniones de disulfuro entre bucles o, alternativamente, interacciones covalentes con dominios adyacentes. Dadas estas inserciones, la región de extremo C del dominio V de *B7-H5* probablemente no sería capaz de formar la interfaz con un dominio IgSF de tipo C posterior, tal como se observa en la estructura cristalina de CD80.

[0079] Las construcciones de proteínas de fusión de polipéptido *B7-H5* humano (fig. 3; SEQ ID NO: 1) y polipéptido *B7-H5* de ratón (fig. 4; SEQ ID NO: 3) se prepararon mediante clonación del dominio extracelular de *B7-H5* en marco con el dominio CH2-CH3 de bisagra de IgG1 humana o IgG2a de ratón (Chapoval y col., 2002, Mol. Biotechnol. 21: 259-264). Para potenciar la secreción de proteína de fusión, el péptido de señal nativo de *B7-H5* fue sustituido por el péptido de señal de preprotripsina y la secuencia FLAG obtenida del vector pCMV-FLAGTM (Sigma,

MO). Para producir las proteínas de fusión B7-H5Ig, se transfectaron células 293T con 10 µg de constructos de B7-H5Ig humana o de ratón mediante el procedimiento del fosfato de calcio, y se purificaron las B7-H5Ig a partir del sobrenadante del cultivo por columna de proteína G, tal como se ha descrito anteriormente (Dong y col., 1999, Nature Med. 5: 1365-1369). Se prepararon líneas de células CHO estables que expresan B7-H5 humano o líneas
5 por transfección simulada por cotransfección de vector pcDNA™ que contiene ADNc de B7-H5 humano con pLXSHD, un plásmido que codifica un gen resistente al histidinol (Miller y col., 1993, Methods Enzymol. 217: 581-599). Se seleccionaron clones estables con histidinol 20 mM (Sigma, MO). Se cribaron los clones que expresan B7-H5 para unión con anticuerpo monoclonal (AcM) con B7-H5 humano.

- 10 **[0080]** Los anticuerpos monoclonales para B7-H5 humano se generaron por inmunización de un ratón BALB/c mediante procedimientos de inmunización descritos anteriormente (Wilcox y col., 2002, J. Clin. Invest. 109:651-659). Se generaron dos hibridomas, 5H9 y 1H11, que secretan IgG1 de ratón frente a B7-H5 humano (véanse fig. 8A y 8B). Los anticuerpos monoclonales producidos por los dos hibridomas se purificaron por cromatografía en columna de afinidad a IgG. Se determinó la especificidad de los AcM por tinción negativa de
15 diversos transfectantes que expresan moléculas de la familia B7 que incluyen B7-1, B7-2, B7-H1, B7-DC, B7-H2 y B7-H3. La IgG1 de ratón de control se adquirió en Rockland (Gilbertville, PA).

- [0081]** Se investigó la actividad de B7-H5 humano para estimular la proliferación de linfocitos T. Se recubrieron placas de 96 pocillos de base plana con diversas concentraciones de AcM anti-CD3 (Dong y col., 1999,
20 Nature Med. 5:1365-1369), se lavó extensamente y se recubrió con 10 µg/ml de B7-H5Ig o mIg de control durante 2 horas a 37°C. Se cultivaron linfocitos T CD3+ humanos purificados en lana de nailon a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos en presencia de los AcM anti-CD3 prerrecubiertos a 3×10^5 células/pocillo. Setenta y dos horas más tarde, se sometieron a impulsos los pocillos con 1 µCi de ^3H -timidina (TdR) y se determinó la proliferación de linfocitos T mediante la incorporación de TdR. La proteína B7-H5Ig de fusión
25 estimuló la proliferación de linfocitos T a concentraciones de apenas 0,6 µg/ml (fig. 7). Esto demuestra que el polipéptido B7-H5 puede coestimular linfocitos T.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que es idéntico en al menos el 85% a
5 (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3,
(b) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4; o
10 (c) una molécula de ácido nucleico que incluye un segmento de al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ó 933 nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ó 929 nucleótidos de SEQ ID NO: 4,
15 para su uso en una terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, en el que el polipéptido tiene la capacidad de coestimular un linfocito T.
2. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos comprende:
20 del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1; o
del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3.
3. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende:
25 del residuo de aminoácido 30 al residuo de aminoácido 190, en particular del residuo de aminoácido 47 al residuo de aminoácido 150 de SEQ ID NO: 1; o
del residuo de aminoácido 47 al residuo de aminoácido 149 de SEQ ID NO: 3.
30 4. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende del residuo de aminoácido 30 al residuo de aminoácido 170 de SEQ ID NO: 1.
5. Una proteína de fusión que comprende:
35 un primer dominio que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
al menos un dominio adicional,
40 para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero.
6. La proteína de fusión según la reivindicación 5, en el que el al menos un dominio adicional comprende un marcador, un indicador, una región constante de inmunoglobulina (Ig), parte de una región constante de Ig, una secuencia de guía o de acceso heteróloga, o una etiqueta que facilita la purificación, detección o solubilidad de la
45 proteína de fusión.
7. La proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que la etiqueta es polihistidina.
8. Un procedimiento de coestimulación de un linfocito T, comprendiendo el procedimiento:
50 la puesta en contacto de un linfocito T *in vitro* con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, en el que el polipéptido tiene la capacidad de coestimular un
55 linfocito T.
9. Un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 1 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, o un ácido nucleico que codifica un

polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, en el que el polipéptido tiene la capacidad de coestimular un linfocito T.

10. Una célula recombinante para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, en el que dicha célula recombinante expresa un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, en el que dicha célula recombinante se origina en una célula de dicho mamífero o de la descendencia de esta célula, en la que la célula recombinante comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido,

15 en la que el polipéptido tiene la capacidad de coestimular un linfocito T, en la que ni dicha célula recombinante ni dicha célula de dicho mamífero ni dicha descendencia de esta célula es una célula madre embrionaria humana.

11. La célula recombinante según la reivindicación 10, en la que la célula es una célula presentadora de antígeno (APC).

12. La célula recombinante según la reivindicación 11, en la que la APC es una APC pulsada con un antígeno, especialmente con un péptido antigénico.

13. Una proteína de fusión para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, en el que la proteína de fusión comprende:

(a) un primer dominio que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; y

(b) al menos un dominio adicional.

14. El polipéptido, la célula recombinante o la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9 a 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de inmunodeficiencia, una afección inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, inmunosupresión, una afección inducida por virus, una inmunodeficiencia congénita o una función inmunitaria alterada en un mamífero.

15. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el linfocito T es un linfocito T auxiliar, especialmente un linfocito T auxiliar que ayuda a una respuesta de linfocitos T citotóxicos o anticuerpos de linfocitos B.

16. Un procedimiento de identificación de un compuesto que modula una respuesta inmunitaria, comprendiendo el procedimiento:

el suministro de un compuesto de prueba;

el cultivo conjuntamente de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, un linfocito T y una molécula que suministra una señal de activación a un linfocito T; y

la determinación de si el compuesto de prueba modula la respuesta del linfocito T a la molécula, en el que un compuesto de prueba que modula la respuesta del linfocito T a la molécula es un compuesto que modula una respuesta inmunitaria, y en el que el polipéptido tiene la capacidad de coestimular un linfocito T.

17. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que un compuesto de prueba que inhibe la respuesta del linfocito T a la molécula es un compuesto que inhibe una respuesta inmunitaria.

18. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que un compuesto de prueba que potencia la

respuesta del linfocito T a la molécula es un compuesto que potencia una respuesta inmunitaria.

19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que la molécula es un anticuerpo que se une a un receptor de linfocitos T o a un polipéptido CD3.

5

20. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que la molécula es un aloantígeno o un péptido antigénico fijado a una molécula de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de la célula presentadora de antígeno (APC).

10 21. El procedimiento según la reivindicación 20, en el que la APC expresa el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 31 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la superficie del APC.

15

22. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, o el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 311 de SEQ ID NO: 1 o del residuo de aminoácido 40 al residuo de aminoácido 309 de SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos se expresa a partir de un ácido nucleico recombinante.

20

23. El polipéptido, la célula recombinante, o la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 9-13 para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero, o el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16-22, en el que el polipéptido, o el primer dominio de la proteína de fusión es codificado por un ácido nucleico cuya secuencia de ácidos nucleicos es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o un segmento de al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ó 933 nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ó 929 nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

30

24. Una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende un polipéptido según SEQ ID NO: 1 o según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una cantidad eficaz para coestimular un linfocito T y un soporte farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia de estimulación de respuesta inmunitaria en un mamífero.

35 25. La formulación según la reivindicación 24, en el que el polipéptido es codificado por un ácido nucleico según SEQ ID NO: 2 ó 4 o un segmento de al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ó 933 nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o al menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ó 929 nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

40

26. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 24-25 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de inmunodeficiencia, una afección inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, inmunosupresión, una afección inducida por virus, una inmunodeficiencia congénita o una función inmunitaria alterada en un mamífero.

45

27. Un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 con de 0 a 20 inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos para su uso en una terapia de modulación inmunitaria en un mamífero,

50 en el que el polipéptido tiene la capacidad de coestimular un linfocito T.

28. Un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo para su uso en una terapia de modulación inmunitaria en un mamífero, en el que el anticuerpo o fragmento del anticuerpo se une específicamente al polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

55

Fig. 1

CCGCGCGCGTCCCGCCCGCTCCCCGGCACCAGAAAGTTCTCTCGCGCGTCCGACGGCGACATGGGCGTCCCCACGGCCCTGGA
GGCCGGCAGCTGGCGCTGGGGATCCCTGCTCTTCGCTCTCTTCCTGGCTGCGTCCCTAGGTCCGGTGGCAGCCTTCAAGGTC
GCCACGCGGTATCCCTGTATGTCTCTCCGAGGGGCGAGAACGTCAAGCCTCACTTCAGGCTCTTGGGCCCTGTGGACAAAG
GGACGATGTGACCTTCTACAAGACGTGTACCGCAGCTCGAGGGCGAGGTGCAGACCTGTCTCAGAGCGCGGCCCATCCG
CAACCTCAGTTCCAGGACCTTCACTGTGCACCATGGAGGCCACAGGCTGCCAACACAGCCACGACCTGCTCAGCGCCAC
GGGCTGGAGTGGCCCTCGACCAACCATGGCAACTTCTCCATCACCATGCGCAACCTGACCTGTGGATAGCGGCCTCTACT
GCTGCTGGTGGTGGAGATCAGGCACCACTCTGGAGCACAGGCTCCATGGTGCCATGGAGCTGCAGGTGCAGACAGGCAA
AGATGCACCATCAACTGTGTGGTGTACCACTCTCTCCAGGAGAGTGAACATCAAGGCTGCAGCCTGGCTACGGGT
CCCTGATCTGATGAATCTCTGCTCCCCCTCATCTGCTCTGGTCTCAAGCAAGGAGGAGGCTCCAAACCGCGCTG
CCAGGAGCTGGTGGGATGACAGACAATTCAGGGATTGAAAACCCGGCTTTGAAGCCTCACCACCTGCCACGGGAT
ACCCGAGGCCAAAGTCAGGCACCCCTGTCTATGTGGCCAGCGGCAGCCTTCTGAGTCTGGGCGGCATCTGCTTTCGGA
CCCAGCACCCCCCTGTCTCTCCAGGCCCCGGAGACGCTTCTTCCCATCCTCGACCTGTCCCTGACTCTCAAACCTTTG
AGGTCTATCTAGCCAGCTGGGGGACAGTGGCTGTGTGGCTGGGTCTGGGGCAGGTGCATTTGAGCCAGGCTGGCTCTGT
GAGTGGCTCTTGGCTCGGCCCTGGTCTCCCTCTCTGCTCTGGCTCAGATATGTGTACATCCGAGAACCGACGCCCTG
TCAACCCCTCTGGATGCTACATGGGGATGCTGGACGGCTCAGCCCTGTTTCAAGGATTTTGGGGTGTGAGATTCTCCCT
AGAGACCTGAAATTACCAGTACAGATGCCAATGACTTACATCTTAAGAAGTCTCAGAACGTCAGCCCTTCAGCAGCTC
TCGTTCTGAGACATGAGCCTTGGGATGTGGCAGCATAGTGGGACAAGATGGACATGGGGCACCTCCAGGCACGAGACA
CAGGGACCGGTGGAGAGACTTCTCCCCCGTGGCCGCTCTGGCTCCCCGTTTTCGCCAGGCTGCTCTTCTGTACAGTCTC
TCTTTGTACCACAGTGGCTCTGGGGCAGGCTGCTGTCGCCACTGGCCATGCCACCTTACCAGCTGCTCTCTACAGCAG
TTTCTCTGAAGATCTGTCAACAGGTTAAGTCAATCTGGGGCTTCACTGCTGCAATTCAGTCCCCAGAGCTTGGTGGTCCC
GAAACGGGAAGTACATATTGGGGCATGGTGGCTCCGTGAGCAAAATGGTGTCTTGGGCAATCTGAGGCCAGGACAGATGTTG
CCCCACCCATCGGAGATGGTGTGAGGGAGGTGGGTGGGGCTTCTGGGAAGGTGAGTGGAGAGGGGCACCTGCCCCCCGCG
CTCCCCATCCCTACTCCCATGCTCAGCGCGGCCATTGCAAGGTTGCCACAACAATCTTGTCCACCTGGGACACTTCT
GAGTATGAAGCGGATGCTATTAAAACTACATGGGGAACAGGTGCAAACTGGAGATGGATTGTAAGAGCCAGTTTAA
TCTGCACTCTGCTGCTCTCCCCACCCCCACCTTCCACTCCATACAATCTGGGCTGGTGGAGTCTTGGCTTCAGAGCCAT
TCGGCCAGGTGCGGGTGATGTTCCATCTCTGCTTGTGGGCATGCCCTGCTTGTTTTATACATAGGCAAGGTGAGT
CCTCTGTGGAATTGTGATTGAAGGATTTAAAGCAGGGAGGAGAGTAGGGGGCATCTCTGTACATCTGGGGGTAAAAAG
GGAAGGCATGCTGAGCATGGGACAGTTGAGGTGGGCTGGGCAGTCCCTGTAGCGTTTAGCAGGATGGGGCCCCAG
GTACTGTGGAGAGCATAGTCCAGCTGGGCTTGTCTCTAGCAGCTACACTGGCTCTGCTGAGCTGGGCTGGGTGCTG
AAAGCCAGGATTTGGGGCTAGGCGGGAAGATGTTGCCCAATTGCTTGGGGGTGGGGGGATGAAAAGGGGAGCACCTCT
AGGCTGCTTGGCAGCAGTAGCCCTGGGCTGTGGCTACAGCCAGGGAACCCACCTGGACACATGGCCCTGCTTCTAAGCC
CCCCAGTTAGGCCCAAAGGAATGGTCACTGAGGGCTCTGCTGCTGGCTGGGCTGGGCGAGGGCTTTGAGGAGAGGTTAA
ACATAGGCCCGGAGATGGGGCTGACACTCGAGTGGCCAGAAATAGCCCAAACCCGGCTTCTCCCTGTCTCTAGGCAGAG
GGGGGTCCCTTCTTTGTCTCTGCTCAGCCAAATGCTTGATGCCAGCTGCCATAGGAAGAGGGTGTGCTGGCTGGCCATGG
TGGCACACACTGTCTCCAGCAGCTTTCAGGGCTGAGGTGGAAGGACCGCTTAAGCCAGGTGTTCAAGGCTGCTGTGAG
CTGTGTTGAGGCCACTACACTCCAGCTGGGGACGGAGCAAACTTTGCCCTAAAAACAAATTTAAAAAGAAAGAAAGAAAG
AAAGAGGTTATGTTTTCAAAATCATGGGGCTGTCATGAGGAGTGGGACAGGACACACTGTCTTCTGGAGTCGAG
GACAAGCCACAGCCAGGATTCGGTTTCTCCAACTAGGAAGAGCATGCCCTGCCCTCTGGGGAGGCTGGCTGGCCCCAG
CCCTCAGCTGCTGACCTTGAGGCAGAGACAATTCTAAGAATTGGCTGCCAGACCCAGGCCCTGGCTGCTGCTGTGTGGAG
AGGGAGGCGGCCCGCGGCAGAACAGCCACCGCACTTCTCTCTCAGCTTCTCTGGTGGGCCCTGCCCCTCTCTCTGGAC
CTTTTCAAACTGAACGATCTGGGCTTGTGGTTCTGTTTTCAGCGAAATTTACTCTGAGCTCCAGGTTCATCTTCAAT
CCATGGCCACAGGCCCTGCTCAACAGCAGTAGGACGTCTCCCTGCTGCTGCTGGGAGGGGACAGTCTGGAGCCGC
CCTCTGAGTTGCCCGGATGGTAGTGCTCTGATGCCAGCCCTGGTGGCTGTGGGCTGGGGTGATGGGAGGCTGGGTGCG
AGAACATGGCGCTCCAGGGGGCGGGAGGAGCACTAGGGCTGGGGCAGGAGGCTCTGGAGCGCTGGATTCTGTGGCAGAT
CTGAGGCCCTGAGAGGGAAATCCATGCTTTTAAAGAACTAATTCAATTGTTAGGAGATCAATCAGGAATTAGGGGCCATCTTAC
CTATCTCTGACATTCACAGCTTAAATAGAGACTTCTGCTTTATTCTCTCCCTCCAGGAGAGGCTGAAGGAATGGAATTGAA
GCACCAATTGAGGGTTTGTGTGACACAGCGGGACCGCTCAGCACTCCCTAAAAACACAGCTGAGGCCACTGGTAGCT
CTGGTGGGACAGCTGGCCCTGCTGGGGAGTCCGTGGCGATGGGCGTGGGGTGAGGTTGACAGGAGCCACAGGACCTGCTT
TTCAAAGACTTCTGCTGACCAGAGCTCCCACTACATGCAGTGGCCAGGGCAGAGGGGCTGATACATGGCCTTTTTCAGG
GGGTGCTCTCTCGCGGGGTGAGCTTGGGAGTGTGCAGTGGGACAGGGGGCTGCAGGGGTCTGCCACCACCGAGCACAACCTT
GGCCCCCTGGGGCTCTGCCCATGAATGAGGCTTCCCCAGGGCTGGCCTGACTGTGCTGGGGGTGGGTTAAGCTTTTCTCA
GGGAACCAATGCAGGAAGAGGATGTGGGTTGCTAACAGGATGCTGGGAACAAGGCTCTTGAAGCCGACCCACAGC
CAGCTGAGCATGAGGCCAGCCATAGACGCGACAGCCACCTGGCCCATTCCTGGGCATTCCCTGCTTGTGATTTGCTG
TTCTCTTCACCCATGGAGGCTATGTCACTTAACATCTCTGGAATGTGTTGAGAGGGATTCTGAATGATCAATATAGCTTG
GTGAGACAGTGGCAGATAGATAGCCATGTCTGCTTGGGCACGGGAGAGGGGAAGTGGCAGCATGCATGCTGTTCTTGGCC
TTTTCTGTTAGAATACTTGTGTCTTTCAACACACTTTCATATGTGTTGTAACCTGTTTGTATCCACCCCTTCCCTGAAAT
CCTGGGAGGTTTTATTGTGCTCCATTTAAACACAGAGGGCAATAGAGGTTCTGAAAGGTCTGTGCTTGTCAAAACAAGTAAAC
GGTGAACCTACGACT (SEQ ID NO:5)

Fig. 2

GAGCATTCACTCTAGCGAGCGAGCGGCGTGTACAGCCGGCTCCCTGGGCTCCTGGAGTCCCGCTTGCTCCAAGCGCACTCCAG
 CAGTCTCTTTCTGCTCTTGCCCGGCTCGACGGCGACATGGGTGTCCCGCGGTCCAGAGGCCAGCAGCCCGCTGGGGAAC
 CCTGCTCCTTGCTATTTTCTGGCTGCATCCAGAGGTCTGGTAGCAGCCTTCAAGGTCACCACTCCATATTCTCTATGTGT
 GTCCCGAGGGACAGAATGCCACCCTCACCTGCAGGATTTCTGGGCCCGGTGTCCAAAGGGCACGATGTGACCATCTACAAGACG
 TGGTACCTCAGCTCACGAGGCGAGGTCCAGATGTGCAAAGAACACCGGCCATACGCAACTTCACATTGCAGCACCTTCAGCA
 CCACGGAAGCCACTGAAAGCCAACGCCAGCCATGACCAGCCCCAGAAGCATGGGCTAGAGCTAGCTTCTGACCACCACGGTA
 ACTTCTCTATCACCTGCGCAATGTGACCCCAAGGGACAGCGGCTCTACTGCTGTCTAGTGATAGAATTAACCAACACCAC
 CCAGAACACCGTTCTACGGGTCCATGGAGCTACAGGTACAGGCAAGGCTCGGGGTCCACATGCATGGCGTCTAATGA
 GCAGGACAGTGACAGCATCACGGCTGCGGCCCTGGCCACCGGCGCTGCATCGTGGGAATCCTCTGCTCCCCCTTATCCTGCT
 TGCTGGTCTATAAGCAGAGACAGGTGGCCTCTCACCGCGTGGCCAGGAGTTGGTGAGGATGGACAGCAGCAACACCCAGGA
 ATCGAAAACCCAGGCTTCGAGACCACTCCACCCTTCCAGGGGATGCTGAGGCCAAGACCAGGCCCGCACTGTCTATGTGGC
 CCAGCGGCAACCTTCGGAGTCAGGACGGTACCTGCTCTCTGACCCAGCACACCTCTGTGCGCTCCAGGCCCTGGGGACGCTCT
 TTTTCCCATCCCTAGATCCAGTCCCTGACTCCCTTAACCTCTGAAGCCATCTAAACCAGCTGGGGAACCATGAACCATGGTACC
 TGGGTGAGGATATGTGCACTTGATCTATGGCTGGCCCTTGGACAGTCTTTTAGGCACTGACTCCAGCTTCTCTGCTCCTGCT
 CTGAGCCTAGACTCTGCTTTTACAGATGCACAGACCTCCCTATCTCTTTCAGACGCTACTTGGGGGGCAGGGAGAAGATG
 TTGGATTGCTCATTGCTGTTCTCAAGATCTTGGGATGCTGAGTTCTCCCTAGAGACTTGACTTCGACAGCCACAGATGTCAGA
 TGACCTGCATCCTATGAACGTCGGCTTGGCAAGAGCCTTCTTCATGGAACCAAGTAGCCCGAGGGGATGAGGTAGGCACC
 TTGCCACCCTCCCGGAGAGAGACACAAGATGTGAGAGACTCCTGCTCACTGTGGGGGTGGCTGGCCTGCTTGTTCCTGCTG
 AGGATGCTCCTCTGTGGACTGACTCTATCCCCCTGGATTCTGGAGCTTGGCTGGCCTATGTCCACCAGAGGAGCATCTCAG
 CAGCCTTCCACCAGCAACCTGAGGGCCTGCCAGCTTCGTGGCTCTGGGCTCTCATTACCTGTATGGCGTCCACAGAGCTCAG
 TGGCCAGAGGCTTTGAAACAGGAAGTACATGTCAGGTTGAGGAACCACTGTGAGCTCATAGTGCTTGTAGCAATGTGAGGCC
 TGGACCACTGGACACGGAGGGAGGGTGGCGAGAGGATGATGGGATGATGAGGGGAACACGCTCCCTTCTGTCTCTGTGTCATC
 CACCACTACCACTATTCACTGTGGAGCAGTGGCAAGGTGACCGACCTCCACAATGTCTAGTGATGCTGGACCACTTCTAAG
 TGTGAAAGAGATGCTATTAAACAGTATGTGGCAATGGCTGCCAACAGCTGAGTGGACTGGAGGCACTGGCTTTAAGGCCCT
 GGAGGTGACGGGCCCGGTATGGGATAGGGATGGGAGTTTCACTGAGGGCCTAGGGATCACTCCGCTTCTGACCACTCTTCTT
 CTGAGCCTCACTCAGGGTGACCTTCAGGCACACAGAGAGCTTGGCCCTGGTCCGATACTACTCTTGGCTCTCATCTCCAGG
 GTTTGGCATGACCTGGGCACACAGGGGGAGTCTTCAGAAAGGATTTAAAGCATGAAAGAAAGGGTAGTCTTGTGAGGTAG
 GGATGGGCACTGATGTTTGTAGAGTGAGGAGGATACGGCTGGGCAGATCACTCTCCAGTCTCTAGAGGGAAAGTAGCTCTAA
 GTCTGGGAGAGCAGCAGCCAGTGGTACCATATGTCTTCTTGACGCTTCCACTGGCTGGGCTGAAGTGGGCATGGGTAGGAAA
 GCTCCTGTTCTGGGCTGCAGCCAGGGAGAACCCATTCTCTCCCTGAGGACAGATGGGTGGGAGAGAGAGAGTTCAG
 GCCGGGAAGCAGCAATAAGCTATCTGCTGGGACCCAGACAAGTTGTCTGATGAGGTCCAAGATGTGGGATGCCAGTTATACC
 TGGGGCTTGGGGATCCTTAGAGGCTTTGTATCATCATAGGAGTGTGGGGTGGCCAGGGCATCAAAGCCATGACCCCTGT
 TTTATCCTCAGGGTCCACTCTTCTGCACCACTCATTGCTCTAGATCTATGACGTTACTATAGACAGAAATGTGTTGTTCTGTTT
 GGCTTTGGGATAATGGCCTGGCGAACTGCCAGTGTTCAGTGGCAGGGCTGTGAGGCCAGTCAAAGACTAGAACCCACAGAC
 CAGCTGAACGATGAGTATAGCCTGTCCCCTGGGGAGCCTGACCTGTCTCCAGCCCTAAGCTTCAGACCTCACCCTCAGATG
 ACTTCTAAGAAATTTGCTGTGGGACCCCTGCATGGCTGCAGCTCCGTGGAAGGAGAGGAGGCCCCCAGCAGAAAGAACCACT
 CGCTTCTGCCCAGCTTCTCTCTGTAGGGCTCTAAGTCTCTTCTTCTGGGACCTGCAAGCAAAGGCATGTGAGCTTGTG
 TTTCTGTTTGGGTGAAGTTTGTGTGGTCCGGTCTCTGTACATCCATGAACCTGGGGTCTACCACCTTGTGCTGCTG
 TAGAGACAGCTGCAGGATCTTAGGGTGAAATATGAGGTGCCCTGAGGTGCTAGCCCTTGGGGCAAAAGATGGGTGGCAATG
 AGACACAGTGGGAACTGAGTTCCCAAGAGGAGGGAGGAGCCTGTAGCCTCAAGGGCCATATTGGGTTCTGGTACCAGCA
 AAAGCCTAGAGAGCGAAGTCTGTATTTTGTAGGAGGTAATTGATCCTTACGGAATCCATCAGAAATTTGGAGCGGGTCTTTAT
 CTATCTCTGAGGGTCTCTACCTATCTCCGATGAAGCTCTCCCTGGGCTGGGATGGGAGAAACAGGAGGAAAGGTGTCTGA
 TAAAGCAGGGCTTCTTGACAAGCCAAAGGGCCACTGGTAGCTGTGTGGACCGAGCTGACCCTGCTGAAGTATTGTAGTGTG
 CCTTGGACCAACTTCTCAAAGAGCAACCCCGGGCTACCCCTACTCTGCCAGGAAGAGGCGGAGAAGGGCTGAGAGGCCTG
 GAAGGGGCTAGCTCCTTCTTGTGAACTGCTCCCGGAGGACTTGGAGGAGGCGGCTAGGCTACGGGCTGTGAGGGCCCTTT
 GTCTTTCTAACCTGGGCACTGTAGGATGCTCCCTCTGGAAGGCTTTCTGGGTGTGAGCTAGAGCAGTGTCCATGCCA
 GCCTGAACCTGCCATGGTGGGAGCTGAACCTAAATTTCTCAGGGAACCTAAATAGGCAAAAGAGGAACTGGGGAGGAGGG
 TGCCAGGCAGGATGGGGGAAGGGAGGGCAGTGCAAAAGTCTCTTGAACACAGACAGCCAGCTGAGTGCCAGTCCCAGATC
 ACAGAGAATACGGCTCATCTGGCTCATGTTCTGCATGCTTGTGCTTTACCTTGGCACTTCTCTCCACCATGAGTGCGAG
 TCTGTGTGTATATATGATGATGTTTGGTGTATATATGTTTTTGTGTGTGATATGGAAGTCAGAAATCAGTGGGTCTTCTCT
 CCATTCTTTGCAATGATGTTTTTTTTTTTTTACGATTTATTTACTATATGAATGTTTTGCTGAAATACATGATAGGTGT
 CACGTACATGCTGTGGAACGCTTGGAACTGGAGTTACAGGTGGCTATGAGCTACAGTGTGAGCACTGGGAATCAAACCTGG
 GTCTTCTGCAAGAGCAACAAATTAAGTCAGCTCTAACTACTTGAAGTATTTTCCAACCTCC (SEQ ID NO: 6)

Fig. 3

MGVPTALEAGSWRWGSLLFALFLAASLGPVAAFKVATPYSLYVC
PEGQNVTLTCRLLGPVDKGHDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRP
IRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLEASDHHGNFSIT
MRNLTL LDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPS
NCVVYPSSSQESENITAAALATGACIVGILCLPLILLLVYKQRQ
AASNRR AQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHPLS
YVAQRQPSESGRHLLSEPSTPLSPPGPGDVFFPSLDPVPDSPNF
EVI (SEQ ID NO:1)

Fig. 4

MGVPAPPEASSPRWGTLALLAIFLAASRGLVAAFKVTTTPYSL
 YVCPEGQNATLTCRILGPVSKGHDVTIYKTWYLSSRGEVQM
 CKEHRPIRNF^TLQHLQHGGSHLKANASHDQPKHGLELASD
 HHGNFSITLRNVTPRD^SGLYCCLVIELKNHHPEQRFYGSME
 LQVQAGKGS^GSTCMASNEQDSDSITAAALATGACIVGILCL
 PLILLLVYKQRQVASHRRAQELVRMDSSNTQGIENPGFETT
 PPFQGMPEAKTRPPLS^VVAQRQPSESGR^VLLSDPSTPLSPP
 GPGDVFFPSLDPVPDSPNSEAI (SEQ ID NO:3)

Fig. 5

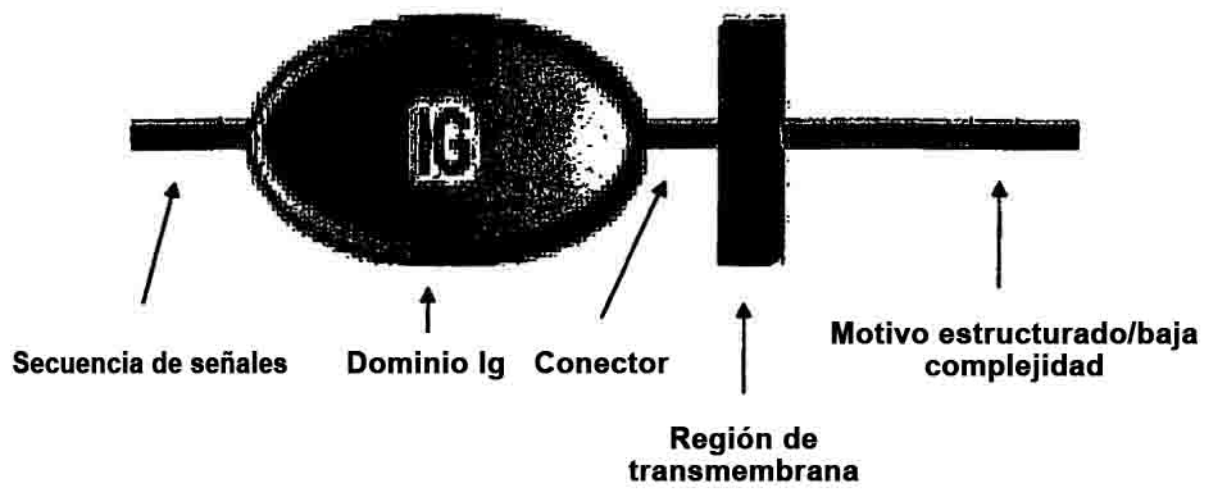


Fig. 6

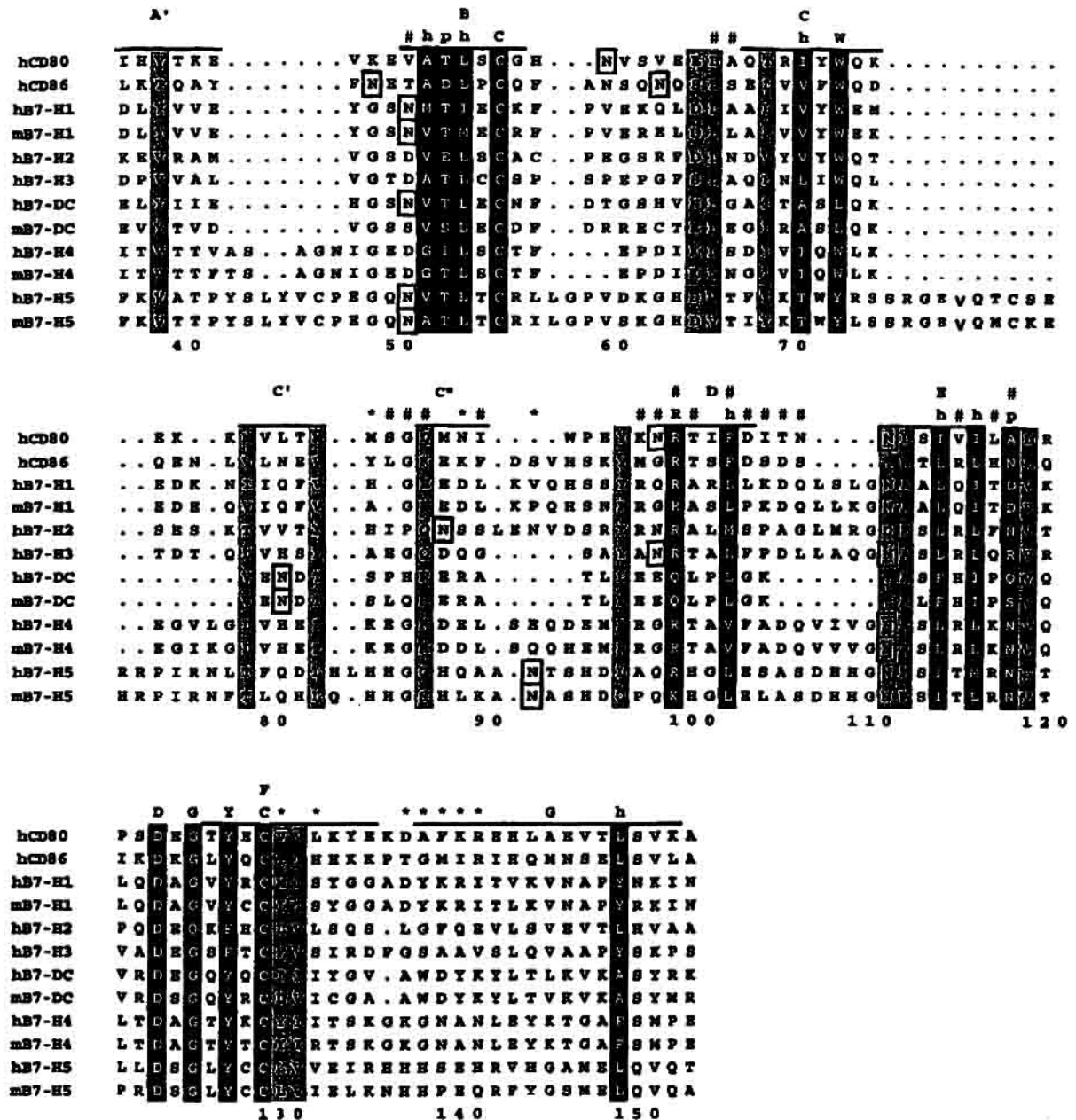
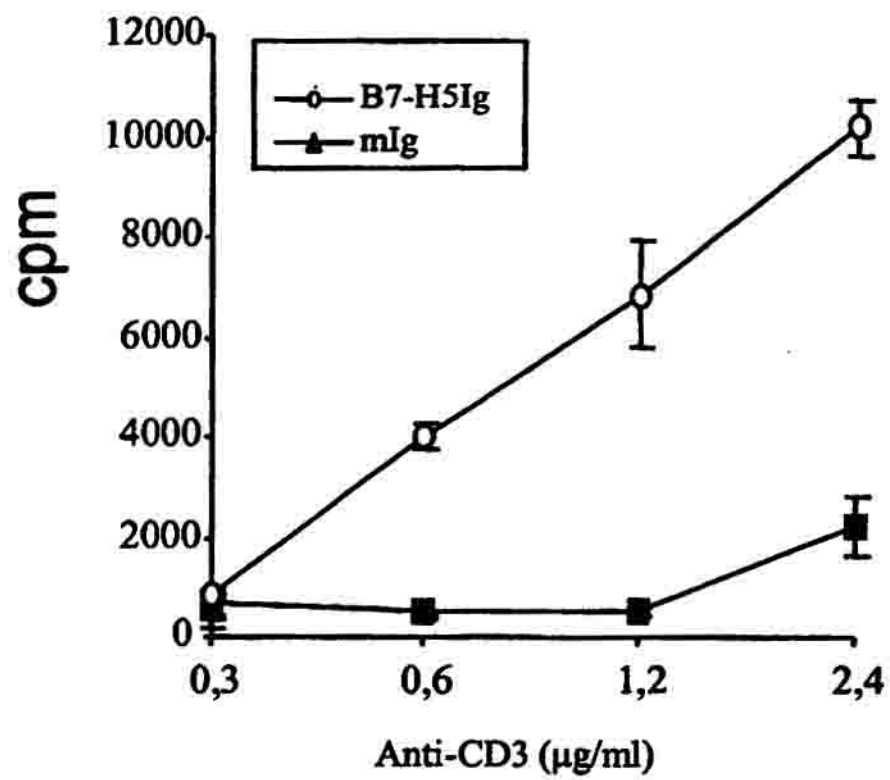


Fig. 7



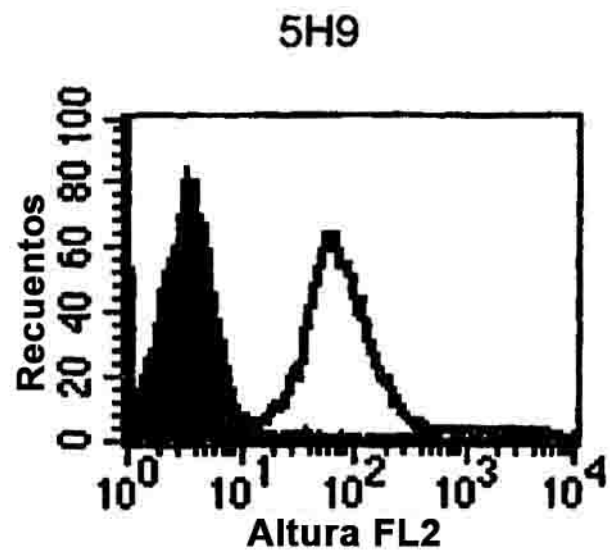


Fig. 8A

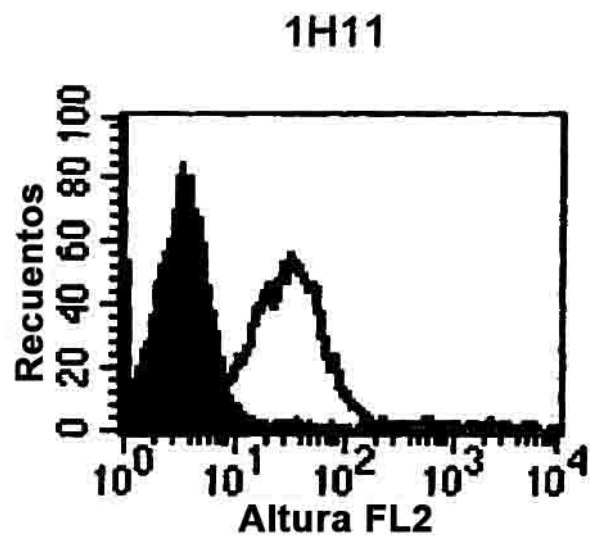


Fig. 8B

Fig. 9

(SEQ ID NO:2)

```

                15                30                45
ATGGGCGTCCCCACGGCCCTGGAGGCCGGCAGCTGGCGCTGGGGA
M G V P T A L E A G S W R W G>

                60                75                90
TCCCTGCTCTTCGCTCTCTTCCTGGCTGCGTCCCTAGGTCCGGTG
S L L F A L F L A A S L G P V>

                105               120               135
GCAGCCTTCAAGGTCGCCACGCCGTATTCCCTGTATGTCTGTCCC
A A F K V A T P Y S L Y V C P>

                150               165               180
GAGGGGCAGAACGTCACCCTCACCTGCAGGCTCTTGGGCCCTGTG
E G Q N V T L T C R L L G P V>

                195               210               225
GACAAAGGGCACGATGTGACCTTCTACAAGACGTGGTACCGCAGC
D K G H D V T F Y K T W Y R S>

                240               255               270
TCGAGGGGCGAGGTGCAGACCTGCTCAGAGCGCCGGCCCATCCGC
S R G E V Q T C S E R R P I R>

                285               300               315
AACCTCACGTTCCAGGACCTTCACCTGCACCATGGAGGCCACCAG
N L T F Q D L H L H H G G H Q>

                330               345               360
GCTGCCAACACCAGCCACGACCTGGCTCAGCGCCACGGGCTGGAG
A A N T S H D L A Q R H G L E>

                375               390               405
TCGGCCTCCGACCACCATGGCAACTTCTCCATCACCATGCGCAAC
S A S D H H G N F S I T M R N>

                420               435               450
CTGACCCTGCTGGATAGCGGCCTCTACTGCTGCCTGGTGGTGGAG
L T L L D S G L Y C C L V V E>

                465               480               495
ATCAGGCACCACCACTCGGAGCACAGGGTCCATGGTGCCATGGAG
I R H H H S E H R V H G A M E>

```

510 525 540
 CTGCAGGTGCAGACAGGCAAAGATGCACCATCCAACCTGTGTGGTG
 L Q V Q T G K D A P S N C V V>

555 570 585
 TACCCATCCTCCTCCCAGGAGAGTGAAAACATCACGGCTGCAGCC
 Y P S S S Q E S E N I T A A A>

600 615 630
 CTGGCTACGGGTGCCTGCATCGTAGGAATCCTCTGCCTCCCCCTC
 L A T G A C I V G I L C L P L>

645 660 675
 ATCCTGCTCCTGGTCTACAAGCAAAGGCAGGCAGCCTCCAACCGC
 I L L L V Y K Q R Q A A S N R>

690 705 720
 CGTGCCCAAGGAGCTGGTGC GGATGGACAGCAACATTCAAGGGATT
 R A Q E L V R M D S N I Q G I>

735 750 765
 GAAAACCCCGGCTTTGAAGCCTCACCACCTGCCCAGGGGATACCC
 E N P G F E A S P P A Q G I P>

780 795 810
 GAGGCCAAAGTCAGGCACCCCCTGTCCTATGTGGCCCAGCGGCAG
 E A K V R H P L S Y V A Q R Q>

825 840 855
 CCTTCTGAGTCTGGGCGGCATCTGCTTTCGGAGCCCAGCACCCCC
 P S E S G R H L L S E P S T P>

870 885 900
 CTGTCTCCTCCAGGCCCGGAGACGTCTTCTTCCCATCCCTGGAC
 L S P P G P G D V F F P S L D>

915 930
 CCTGTCCCTGACTCTCCAAACTTTGAGGTCATCTAG
 P V P D S P N F E V I *>

Fig. 10

(SEQ ID NO:4)

```

      15              30              45
ATGGGTGTCCCCGCGGTCCCAGAGGCCAGCAGCCCGCGCTGGGGA
M G V P A V P E A S S P R W G>

      60              75              90
ACCCTGCTCCTTGCTATTTTCCTGGCTGCATCCAGAGGTCTGGTA
T L L L A I F L A A S R G L V>

     105            120            135
GCAGCCTTCAAGGTCACCACTCCATATTCTCTATGTGTGTCCC
A A F K V T T P Y S L Y V C P>

     150            165            180
GAGGGACAGAATGCCACCCTCACCTGCAGGATTCTGGGCCCCGTG
E G Q N A T L T C R I L G P V>

     195            210            225
TCCAAAGGGCACGATGTGACCATCTACAAGACGTGGTACCTCAGC
S K G H D V T I Y K T W Y L S>

     240            255            270
TCACGAGGCGAGGTCCAGATGTGCAAAGAACACCGGCCCATACGC
S R G E V Q M C K E H R P I R>

     285            300            315
AACTTCACATTGCAGCACCTTCAGCACCAAGCCACCTGAAA
N F T L Q H L Q H H G S H L K>

     330            345            360
GCCAACGCCAGCCATGACCAGCCCCAGAAGCATGGGCTAGAGCTA
A N A S H D Q P Q K H G L E L>

     375            390            405
GCTTCTGACCACCACGGTAACTTCTCTATCACCTGCGCAATGTG
A S D H H G N F S I T L R N V>

     420            435            450
ACCCCAAGGGACAGCGCCTCTACTGCTGTCTAGTGATAGAATTA
T P R D S G L Y C C L V I E L>

     465            480            495
AAAAACCACCACCCAGAACAACGGTTCTACGGGTCCATGGAGCTA
K N H H P E Q R F Y G S M E L>

```

510 525 540
 CAGGTACAGGCAGGCAAAGGCTCGGGGTCCACATGCATGGCGTCT
 Q V Q A G K G S G S T C M A S>

555 570 585
 AATGAGCAGGACAGTGACAGCATCACGGCTGCGGCCCTGGCCACC
 N E Q D S D S I T A A A L A T>

600 615 630
 GGCGCCTGCATCGTGGGAATCCTCTGCCTCCCCCTTATCCTGCTG
 G A C I V G I L C L P L I L L>

645 660 675
 CTGGTCTATAAGCAGAGACAGGTGGCCTCTCACCGCCGTGCCCAG
 L V Y K Q R Q V A S H R R A Q>

690 705 720
 GAGTTGGTGAGGATGGACAGCAGCAACACCCAAGGAATCGAAAAC
 E L V R M D S S N T Q G I E N>

735 750 765
 CCAGGCTTCGAGACCACTCCACCCCTTCAGGGGATGCCTGAGGCC
 P G F E T T P P F Q G M P E A>

780 795 810
 AAGACCAGGCCGCCACTGTCCTATGTGGCCCAGCGGCAACCTTCG
 K T R P P L S Y V A Q R Q P S>

825 840 855
 GAGTCAGGACGGTACCTGCTCTCTGACCCCAGCACACCTCTGTCTG
 E S G R Y L L S D P S T P L S>

870 885 900
 CCTCCAGGCCCTGGGGACGTCTTTTCCCATCCCTAGATCCAGTC
 P P G P G D V F F P S L D P V>

915 930
 CCTGACTCCCCTAACTCTGAAGCCATCTAA
 P D S P N S E A I *>