

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 156**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2000** **E 00907027 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 1149114**

54 Título: **Polipéptidos implicados en respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

03.02.1999 US 244448

08.03.1999 US 264527

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

30.05.2014

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

YOSHINAGA, STEVEN KIYOSHI

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 464 156 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

Polipéptidos implicados en respuesta inmunitaria

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a polipéptidos que están implicados en la activación de linfocitos T. Específicamente, la invención se refiere a polipéptidos coestimuladores de linfocitos T, a los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos, a vectores de expresión y células huéspedes para la producción de los polipéptidos y a composiciones y usos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con inmunosupresión y activación inmunitaria.

Antecedentes de la invención

- 10 Para la generación de una respuesta inmunitaria de linfocitos T (células T) apropiada, deben proporcionarse dos señales a la célula T por células presentadoras de antígeno (CPA). En primer lugar, debe presentarse un antígeno al receptor de células T (TCR) por medio de un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en un acontecimiento que determina la especificidad. En segundo lugar, debe suministrarse una señal coestimuladora, independiente de antígeno mediante el acoplamiento de miembros de la familia B7 en la CPA con la proteína CD28 en células T. Una
15 respuesta inmunitaria productiva conduce a proliferación, diferenciación, expansión clonal y efecto o función. En ausencia de la segunda señal coestimuladora, las células T experimentan un estado de falta de receptividad específica de antígeno de larga duración, denominado anergia.

- 20 Las células T inician la respuesta inmunitaria, median en funciones efectoras específicas de antígeno y regulan la actividad de otros leucocitos secretando citocinas. El receptor de células T (TCR) distingue la célula T de otros linfocitos y puede unirse al antígeno sólo cuando se presenta por la CPA dentro del contexto de un CMH. La actividad funcional de una célula T particular puede correlacionarse con la expresión de antígenos de membrana, tales como CD4 y CD8. Por ejemplo, células T CD4+ funcionan generalmente como células T auxiliares ("helper") (T_H) y están restringidas por CMH de clase II, mientras que las células CD8+ funcionan generalmente como células T citotóxicas (T_C) y están restringidas por CMH de clase I.

- 25 Los polipéptidos coestimuladores de células T potentes que se han identificado previamente incluyen los polipéptidos denominados B7.1 (Freeman *et al.* J. Immunology 143, 2714-2722 (1989), Freeman *et al.* Jour. Expt. Med. 174, 625-31 (1991)) y B7.2 (Freeman *et al.* Science 262, 909-911 (1993) y Freeman *et al.* Jour. Expt. Med. 178, 2185-2192 (1993)), (o CD80 y CD86, respectivamente). Estos polipéptidos se expresan de manera o bien inducible o bien constitutiva en diversas CPA y son ligandos unidos a la membrana para CD28 y CTLA-4, respectivamente, en células T. CD28 (Aruffo y Seed Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 8573-8577 (1987) y Gross *et al.* J. Immun. 144, 3201-3210 (1990)) se expresa en células T en reposo y media en una señal coestimuladora positiva. Se induce la expresión de CTLA-4 (Brunet *et al.* Nature 328, 267-270 (1987) y Dariavach *et al.* Eur. Jour. Immun. 18, 1901-1905 (1988)) tras la activación de células T y regula de manera negativa la señal de CD28, debido a su
30 afinidad de unión superior por B7.1 y B7.2. Ratones sin el gen de CTLA-4 presentan niveles drásticamente altos de células T, puesto que el mecanismo de desactivación de la señal de proliferación se ve alterado en ausencia de CTLA-4. Este fenotipo demuestra claramente el efecto inhibitor principal que tiene la proteína coestimuladora CTLA-4 sobre la proliferación de células T. Ratones que carecen de CD28 o B7.1 o B7.2 tienen un fenotipo menos grave, lo que indica que pueden existir rutas alternativas para la coestimulación de células T.

- 40 Ha habido un considerable interés en la ruta de CD28/CTLA-4 como medio para regular la proliferación y activación de células T. Una proteína quimérica que contiene la parte extracelular de CTLA-4 fusionada a Fc humano tiene fuertes efectos inmunosupresores y se ha estudiado en una variedad de entornos clínicos. También se han evaluado anticuerpos frente a proteínas B7.1 y B7.2 para indicaciones similares en el área de la inmunosupresión. Anticuerpos anti-CTLA-4 han mostrado utilidad en la promoción de la activación de células T. Además, la terapia génica de B7.1 y B7.2 ha mostrado ser muy prometedora en el área de la inmunoterapia contra el cáncer.

- 45 Hasta ahora, CD28, CTLA-4, B7.1 y B7.2 están implicadas en una ruta coestimuladora de células T individual. Dada la capacidad de modulación de una respuesta inmunitaria regulando la coestimulación de células T, sería deseable identificar otros miembros de la misma ruta coestimuladora de células T o separada que puedan tener propiedades ventajosas en la regulación de la respuesta inmunitaria y función de células T del huésped.

- 50 Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar polipéptidos novedosos para la estimulación de la actividad y/o proliferación de células T. Es un objeto adicional de la invención usar los polipéptidos novedosos para la prevención y el tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por células T.

Sumario de la invención

- 55 Sorprendentemente, se han identificado dos polipéptidos novedosos de una ruta coestimuladora de células T. Los polipéptidos representan una pareja de ligando-receptor en una ruta coestimuladora única que parece ser distinta de la ruta que consiste en las proteínas previamente descritas CD28, CTLA-4, B7.1 y B7.2. Los polipéptidos se denominan proteína 1 relacionada con CD28, o CRP1, y proteína 1 relacionada con B7, o B7RP1.

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican para polipéptidos B7RP1 y polipéptidos relacionados.

El contenido de la invención también se refiere a polipéptidos B7RP1 y polipéptidos relacionados.

La invención se define mediante las reivindicaciones.

- 5 Se abarcan por la invención vectores de expresión y células huésped para la producción de los polipéptidos, anticuerpos que se unen a polipéptidos B7RP1 y a polipéptidos relacionados y ensayos para detectar la unión de B7RP1 y polipéptidos relacionados con B7RP1 a CRP1 y polipéptidos relacionados con CRP1. También se abarcan por la invención composiciones farmacéuticas que comprenden B7RP1 o polipéptidos relacionados con B7RP1. También se proporcionan métodos para identificar compuestos que interaccionan con B7RP1 así como ensayos para determinar si tales compuestos son agonistas o antagonistas de la actividad de B7RP1.

Los polipéptidos CRP1 y B7RP1 están implicados en la coestimulación y proliferación de células T. Los polipéptidos CRP1 y B7RP1, agentes de unión selectiva de los mismos y agonistas y antagonistas de los mismos, pueden ser útiles para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el control de respuestas de células T.

- 15 Los polipéptidos CRP1 y B7RP1, agentes de unión selectiva de los mismos y agonistas y antagonistas de los mismos, pueden ser útiles para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de trastornos inmunitarios, para o bien estimular una respuesta inmunitaria insuficiente o bien reducir o inhibir una respuesta inmunitaria exagerada o inapropiada. El trastorno inmunitario puede estar mediado directa o indirectamente por células T.

- 20 La invención proporciona el tratamiento, la prevención o la mejora de un trastorno mediado por células T que comprende administrar a un animal un polipéptido B7RP1. La invención también proporciona un método de diagnóstico de un trastorno mediado por células T o una susceptibilidad a un trastorno mediado por células T en un animal que comprende determinar la presencia o cantidad de expresión de un polipéptido B7RP1; y diagnosticar un trastorno mediado por células T o una susceptibilidad a un trastorno mediado por células T basándose en la presencia o cantidad de expresión del polipéptido. Normalmente, un trastorno mediado por células T es un trastorno inmunitario que puede estar mediado directa o indirectamente por células T. El animal es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano. La invención también proporciona un método de identificación de una molécula de prueba que se une a un polipéptido B7RP1 que comprende poner en contacto el polipéptido con un compuesto de prueba y determinar el grado de unión del polipéptido al compuesto de prueba. El método puede usarse para identificar agonistas y antagonistas del polipéptido CRP1 y/o B7RP1.

- 30 Pueden usarse antagonistas de polipéptidos CRP1 y/o B7RP1 como agentes inmunosupresores para muchas indicaciones, incluyendo trastornos autoinmunitarios (tales como artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, diabetes y lupus eritematoso sistémico), síndrome de choque tóxico, trasplante de médula ósea y órganos, enfermedad inflamatoria del intestino, alosensibilización debida a transfusiones de sangre y el tratamiento de enfermedad de injerto contra huésped. Además, pueden usarse antagonistas como agentes inhibidores para indicaciones mediadas por células B dependientes de células T incluyendo asma y alergia, y autoinmunidad mediada por anticuerpos. Agonistas de los polipéptidos CRP1 y/o B7RP1 pueden ser útiles en, pero sin restringirse a, la activación de células T para la vigilancia y eliminación de tumores.

- 40 Un antagonista de la presente descripción incluye un anticuerpo, o fragmento del mismo, que es reactivo con o se une a B7RP1 o a un dominio extracelular de B7RP1 en el que el anticuerpo reduce o elimina la unión de B7RP1 a CRP1. En un aspecto, el anticuerpo se une selectivamente a B7RP1 humano o a un dominio extracelular del mismo. El anticuerpo o fragmento del mismo que es un antagonista inhibe parcial o completamente la actividad coestimuladora inmunitaria de B7RP1. En un aspecto preferido, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y puede ser murino, humano, quimérico o humanizado.

- 45 Se da a conocer además en el presente documento un método de regulación de la interacción de B7RP1 con CRP1 que comprende administrar a un animal un agente de unión selectiva de CRP1 o un agente de unión selectiva de B7RP1 o ambos. En un aspecto, el agente de unión selectiva es un anticuerpo que se une a B7RP1 y reduce o elimina la unión de B7RP1 a CRP1.

- 50 También se da a conocer en el presente documento un método de regulación de la coestimulación inmunitaria mediada por B7RP1 que comprende administrar a un animal un agente de unión selectiva de B7RP1. El agente de unión selectiva es preferiblemente un anticuerpo que se une a B7RP1 e inhibe parcial o completamente la coestimulación inmunitaria mediada por B7RP1.

- La invención también proporciona un método de regulación de la activación o proliferación de células T en un animal que comprende administrar al animal una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido B7RP1. Por ejemplo, puede usarse una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido B7RP1 en terapia génica para potenciar la activación de células T en respuesta a diversos tumores.

También se abarca por la invención un mamífero no humano transgénico que comprende una molécula de ácido

nucleico que codifica para un polipéptido B7RP1. Se introducen los ácidos nucleicos de B7RP1 en el mamífero de una manera que permite la expresión y niveles en circulación aumentados de polipéptidos B7RP1. El mamífero no humano transgénico es preferiblemente un roedor, y más preferiblemente un ratón o una rata.

Descripción de las figuras

- 5 Figura 1. A) Secuencia de aminoácidos y ADN de CRP1 murino (mCRP1). La secuencia señal predicha de CRP1 está subrayada en el extremo amino-terminal y el sitio de escisión de pro-péptido determinado experimentalmente está indicado mediante un asterisco. La secuencia transmembrana predicha está subrayada hacia el extremo carboxilo terminal. B) Alineación de aminoácidos de la secuencia de proteína CRP1 murina (mCRP1) con CD28 murina (mCD28).
- 10 Figura 2. A) Secuencia de aminoácidos y ADN de B7RP1 murino (mB7RP1). La secuencia señal predicha de B7RP1 está subrayada en el extremo amino-terminal y el sitio de escisión de pro-péptido determinado experimentalmente está indicado mediante un asterisco. La secuencia transmembrana predicha está subrayada hacia el extremo carboxilo terminal. B) Alineación de aminoácidos de la secuencia de proteína B7RP1 (mB7RP1) con CD80 murina (mCD80).
- 15 Figura 3. A) Estructura y secuencia de la región que codifica para proteína de la B7RP1 humana supuesta (hB7RP1). La secuencia señal predicha de hB7RP1 está subrayada en el extremo amino-terminal. Los sitios de escisión de péptido señal predichos están marcados mediante asteriscos. La secuencia transmembrana predicha está subrayada hacia el extremo carboxilo terminal. B) Alineación de aminoácidos de la proteína hB7RP1 madura supuesta con la proteína B7RP1 murina (mB7RP1) madura.
- 20 Figura 4. A) Expresión de la proteína de fusión CRP1-Fc soluble a partir de células 293T transfectadas con el pcDNA3/CRP1-Fc. Se cargaron volúmenes normalizados de lisado celular o medio condicionado y se separaron en un gel PAGE al 10% tal como se indica. Análisis de tipo Western de lisado celular y sobrenadante de medios celulares para determinar la expresión de proteínas de fusión de Fc asociadas a células (lisado celular) y secretadas (medios). El anticuerpo primario era anticuerpo de cabra anti-Fc humano (Pierce Chemical Company, Rockford, IL).
- 25 B) Expresión de la proteína de fusión B7RP1-Fc soluble a partir de células 293T transfectadas con el pcDNA3/B7RP1-Fc. Se cargaron 20 µl de lisado celular normalizado o sobrenadante de medios y se separaron en un gel PAGE al 10%. Se realizó el análisis de tipo Western como en (A).
- 30 Figura 5. Interacción de las proteínas de fusión CRP1-Fc y B7RP1-Fc con proteínas unidas a la membrana expresadas en células COS-7. Células COS-7 transfectadas de manera transitoria con vector pcDNA3/CRP1, pcDNA3/B7RP1 o pcDNA3 solo. Se transfectaron células CHO D con psDRα/hCD28 y CD28 humana (hCD28) expresada de manera estable. Se representan células que expresan CRP1, B7RP1 o hCD28 unidas a la membrana en filas tal como se indica en el lado izquierdo del panel. Se incubaron proteínas de fusión de Fc con las células unidas a placas en columnas tal como se indica en la parte superior del panel. Tras la incubación, se lavaron las células y se detectaron las proteínas de fusión de Fc unidas usando un anticuerpo anti-Fc humano y análisis ACAS (análisis y clasificación de células adherentes, "Adherent Cell Analysis and Sorting"; ACAS Ultima, Meridian Instruments, Inc., Okemos, MI).
- 35 Figura 6. Análisis de FACS (clasificación celular activada por fluorescencia, "Fluorescence-Activated Cell Sorter") de la expresión del receptor para B7RP1 (supuestamente, CRP1) en células T CD4+ y CD8+ activadas. Se activaron esplenocitos de ratón con PMA y ionomicina durante 12 horas. Se incubaron la proteína de fusión B7RP1-Fc, proteína Fc control (simulado-Fc) o PBS (sin tinción) con las células, se lavaron y posteriormente se incubaron con anticuerpo de cabra anti-Fc humano conjugado con FITC (GaHuFc-FITC) tal como se indica en la parte inferior de cada panel. Se añadieron anticuerpos frente a marcadores celulares (para los marcadores de células T CD4 y CD8) conjugados con PE, o anticuerpo control de isotipo (isotipo de rata) conjugado con PE, o PBS (sin tinción) tal como se indica en el lado izquierdo de cada panel individual.
- 40 Figura 7. Análisis de FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) de la expresión de B7RP1 en células B. Análisis fluorocitométrico de la expresión del ligando para CRP1 (presumiblemente, B7RP1) en esplenocitos de ratón. Se incubaron la proteína de fusión CRP1-Fc, proteína Fc control (simulado-Fc) o PBS (sin tinción) con las células, se lavaron y posteriormente se incubaron con anticuerpo de cabra anti-Fc humano conjugado con FITC (GaHuFc-FITC) tal como se indica en la parte inferior de cada panel. Se añadieron anticuerpo frente a marcador celular conjugado con PE para CD45R (CD45R es un marcador de células B) o anticuerpo control de isotipo (isotipo de rata), o PBS (sin tinción), tal como se indica en el lado izquierdo de cada panel individual.
- 45 Figura 8. Análisis de FACS de la expresión de ligando de mCRP1 en macrófagos peritoneales. Se distinguieron en primer lugar las células peritoneales en subconjuntos en el nivel inferior de sus propiedades de dispersión de luz (panel A). Se identificaron macrófagos en la región 5 (R5) debido a su capacidad para dispersar fuertemente la luz hacia delante (FSC) y hacia los lados (SSC) y debido a su tinción positiva para el antígeno F4/80, un marcador para macrófagos (panel B). Se individualizaron macrófagos en la región 6 (R6) basándose en su tinción menos intensa para el antígeno F4/80 y se encontró que se teñían mediante la proteína de fusión CRP1-Fc (presumiblemente debido a su expresión de B7RP1).
- 50 55

Figura 9. Inhibición de la proliferación de células T usando una proteína de fusión B7RP1-Fc. Se activaron células T a partir de esplenocitos de ratón aumentando las concentraciones de conconavalina A (Con A) tal como se indica en la parte inferior del gráfico. Se añadieron las proteínas de fusión CRP1-Fc, mB7RP1 y B7.2-Fc a células T enriquecidas a partir de esplenocitos en ausencia (sin adiciones) o presencia de Con A. Se usaron 200.000 células en los ensayos de proliferación de células T en una placa de 96 pocillos. Se incubaron las células con medios (sin adiciones) o proteínas de fusión de Fc tal como se indica en la leyenda del gráfico. Tras 42 h, se pulsaron las células con H-timidina durante 6 h, entonces se recogieron y se determinó la radioactividad incorporada. Se representan las CPM promedio y la desviación estándar de muestras por triplicado.

Figura 10. A) Ganglio linfático mesentérico normal del ratón control n.º 10 que muestra la corteza, paracorteza y médula del ganglio. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E), 40x aumentos. B) Ganglio linfático mesentérico notablemente agrandado del ratón WX11 n.º 40 con hiperplasia folicular prominente (FH), expansión de la paracorteza e hiperplasia de los cordones medulares (MH). H&E, 40x. C) Primer plano de los cordones (MC) y senos (MS) medulares del ganglio linfático mesentérico del ratón control n.º 10. Obsérvense los cordones medulares pequeños compuestos por linfocitos principalmente pequeños adyacentes a senos medulares con macrófagos dilatados. H&E, 400x. D) Primer plano de los cordones (MC) y senos (MS) medulares del ganglio linfático mesentérico del ratón WX11 n.º 40. Obsérvense los cordones medulares notablemente engrosados compuestos por grandes números de células plasmáticas con células de cuerpos de Russell ocasionales (flecha). H&E, 400x. E) Bazo normal del ratón control n.º 10 que muestra las áreas de pulpa roja y pulpa blanca con vainas linfoides periarteriolas (PALS), 100x. Recuadro: primer plano de la zona marginal que rodea a la pulpa blanca con linfocitos pequeños, macrófagos y células plasmáticas ocasionales, 400x. F) Bazo del ratón WX11 n.º 6 con áreas de pulpa blanca agrandadas, incluyendo PALS y folículos (flecha), 100x. Recuadro: primer plano de la zona marginal con numerosas células plasmáticas y cuerpos de Russell ocasionales, 400x. G) Íleo con parche de Peyer del ratón control n.º 25 con la zona interfolicular (flecha) flanqueada por dos folículos secundarios, 40x. H) Íleo con parche de Peyer del ratón WX11 n.º 32 con folículos notablemente agrandados con centros germinales prominentes y tejido interfolicular (flecha), 40x.

Figura 11. A) Ganglio linfático mesentérico normal del ratón control n.º 5 que muestra la corteza, paracorteza y médula del ganglio. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E), 40x aumentos. B) Ganglio linfático mesentérico notablemente agrandado del ratón WX11 n.º 33 con hiperplasia folicular prominente (parte superior: filas de folículos secundarios en la corteza externa), expansión de la paracorteza (centro) e hiperplasia de los cordones medulares (parte inferior). H&E, 40x. C) Tinción inmunohistoquímica del ganglio linfático mesentérico del ratón control n.º 10 con anticuerpo anti-B220 (marcador de células B). Obsérvense el área cortical de tinción intensa (marrón) y los cordones medulares delgados. Inmunotinción realizada usando el método de complejo de avidina-biotina (ABC)-inmunoperoxidasa (cromógeno DAB, contratinción con hematoxilina), 40x. D) Tinción inmunohistoquímica del ganglio linfático mesentérico del ratón WX11 n.º 33 con anticuerpo anti-B220. Obsérvense los cordones medulares y folículos corticales de tinción intensa (aunque las células plasmáticas maduras en los cordones son negativas para B220), 40x. E) Tinción inmunohistoquímica del ganglio linfático del ratón control n.º 10 con anticuerpo anti-CD3 (marcador de células T). Obsérvense la inmunotinción de la zona paracortical del ganglio, 40x. F) Tinción inmunohistoquímica del ganglio linfático del ratón WX11 n.º 33 con anticuerpo anti-CD3. Obsérvense las áreas paracorticales de tinción intensa, agrandadas del ganglio, 40x.

Figura 12. A) Estructura y secuencia de la región que codifica para proteína de B7RP1 humana (hB7RP1). La secuencia señal predicha de hB7RP1 está subrayada en el extremo amino-terminal. Los sitios de escisión de péptido señal predichos están marcados mediante asteriscos. La secuencia transmembrana predicha está subrayada hacia el extremo carboxilo terminal. B) Alineación de aminoácidos de la proteína hB7RP1 madura supuesta con la proteína B7RP1 murina (mB7RP1) madura.

Figura 13. A) Estructura y secuencia de la región que codifica para proteína de CRP1 humana (hCRP1). La secuencia señal predicha de hCRP1 está subrayada en el extremo amino-terminal. Los sitios de escisión de péptido señal predichos están marcados mediante asteriscos. La secuencia transmembrana predicha está subrayada hacia el extremo carboxilo terminal. B) Alineación de aminoácidos de la proteína hCRP1 con la proteína CRP1 murina (mB7RP1).

Figura 14. CRP-1 está en células T de memoria en reposo. Se tiñeron doblemente esplenocitos en reposo de ratones de 6-7 meses de edad usando B7RP-1-Fc marcada mediante un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con FITC y un anticuerpo conjugado con PE frente a cualquiera de CD44 (figura 14A), CD45RB (figura 14B) o CD69 (figura 14C).

Figura 15. Coestimulación de células T mediante la proteína de fusión B7RP-1-Fc. A) Proliferación de células T inducida por diferentes cantidades de B7RP-1-Fc (cuadrados negros), B7.2-Fc (círculos negros) o control de proteína de fusión OPG-Fc (cuadrados blancos) conjuntamente con anticuerpo anti-CD3. Se usaron proteínas de fusión a diversas concentraciones para recubrir placas de 96 pocillos recubiertas previamente con FAB₂ anti-Fc humano (12,5 µg/ml) y anticuerpo anti-CD3 (0,9 µg/ml). B7RP-1-Fc y B7.2-Fc coestimulan células T de un modo dependiente de la dosis hasta 0,3 µg/ml, a la que se logra el efecto máximo. B) Proliferación de células T inducida por B7RP-1-Fc (cuadrados negros), B7.2-Fc (círculos negros), Fc no fusionado (cuadrados blancos) o sin Fc (círculos blancos) conjuntamente con un anticuerpo anti-CD3 (0,85 µg/ml) y en presencia de diversas

concentraciones de un anticuerpo policlonal de conejo anti-B7RP-1-Fc. Se usaron proteínas de fusión de Fc a una concentración de 0,3 µg/ml y se unieron a las placas como anteriormente. Se generó el anticuerpo anti-B7RP-1-Fc para purificar B7RP-1-Fc mediante inyecciones subcutáneas de antígeno emulsionado en adyuvante, y luego se purificó por afinidad. Se incubaron los anticuerpos durante 30 min. con las proteínas de fusión de Fc antes de la adición de las células. El anticuerpo anti-B7RP-1-Fc inhibe específicamente la proliferación de células T inducida por B7RP-1-Fc de un modo dependiente de la dosis.

Figura 16. Efecto de las proteínas CRP-1-Fc y B7RP-1-Fc sobre la incidencia (A) y la gravedad (B) de la artritis inducida por colágeno en ratones. Se inmunizaron ratones B10.RIII susceptibles a artritis inducida por colágeno en la base de la cola con 10 µg de colágeno porcino tipo II en CFA. Los ratones recibieron 100 µg de proteína de fusión dos veces a la semana. El tratamiento con PBS control y proteínas de fusión de Fc se indica en la leyenda de la figura.

Figura 17. Colon proximal en ratones transgénicos para B7RP-1-Fc. (A) Colon proximal normal del ratón control n.º 53F (hembra) que muestra la pared del intestino con la mucosa, submucosa, capa muscular de la mucosa y serosa. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E), 40x aumentos. (B) Colon proximal engrosado de manera difusa del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 111F con hipertrofia glandular prominente, ulceración por agrietamiento e inflamación transparietal. H&E, 40x. (C) Vista a menos aumentos del colon proximal (como en el panel B) del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 111F con ulceración por agrietamiento multifocal e inflamación transparietal. H&E, 20x. (D) Primer plano de la úlcera por agrietamiento y las glándulas colónicas hipertróficas del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 111F (mostrado en los paneles B y C anteriores). Obsérvese la luz con exudado mucopurulento. H&E, 100x. (E) Primer plano de la inflamación granulomatosa en la submucosa del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 112F con una célula gigante multinucleada rodeada por macrófagos, linfocitos y menos neutrófilos. H&E, 400x. (F) Primer plano de la inflamación granulomatosa en la mucosa del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 112F con macrófagos epitelioides mezclados con linfocitos, células plasmáticas y menos neutrófilos subyacentes a las glándulas mucosas. H&E, 400x.

Figura 18. Colon distal en ratones transgénicos para B7RP-1-Fc. (A) Colon distal normal del ratón control n.º 53F (hembra) que muestra las capas de la pared del intestino con la mucosa, submucosa, capa muscular de la mucosa y serosa. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E), 40x aumentos. (B) Colon distal engrosado de manera difusa del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 111F (hembra) con hiperplasia e hipertrofia glandular prominente y abscesos crípticos dispersados. H&E, 40x. (C) Colon distal engrosado de manera difusa del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 55M (macho) con hiperplasia e hipertrofia glandular prominente. H&E, 40x. (D) Colon distal engrosado de manera difusa del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 112F (hembra) con glándulas colónicas hipertróficas, agregados linfoides focales y muchos abscesos crípticos. H&E, 40x. (E) Tinción inmunohistoquímica del colon distal del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 112F con anticuerpo anti-CD3 (marcador de células T). Obsérvese la inmunotinción de la mucosa superficial y el parche linfóide colónico. H&E, 40x. (F) Primer plano de la mucosa colónica del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 112F con un absceso críptico (flecha) y agregado linfóide compuesto por células B B220+ (recuadro). H&E, 100x.

Figura 19. Intestino delgado en ratones transgénicos para B7RP-1-Fc. (A) Duodeno normal del ratón control n.º 53F (hembra) que muestra la luz, las vellosidades y las criptas de la mucosa y submucosa subyacente, la capa muscular de la mucosa y la serosa. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E), 40x aumentos. (B) Duodeno engrosado de manera difusa del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 51F (hembra) con hiperplasia e hipertrofia de las criptas prominente e infiltrado linfoplasmacítico leve en la lámina propia. H&E, 40x. (C) Yeyuno normal del ratón control n.º 53F (hembra) que muestra la longitud normal de las vellosidades y las criptas en la mucosa del yeyuno. H&E, 40x aumentos. (D) Mucosa del yeyuno notablemente engrosada del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 51F (hembra) con hiperplasia e hipertrofia de las criptas localmente extensa. H&E, 40x. (E) Íleo normal del ratón control n.º 53F (hembra) que muestra la longitud normal de las vellosidades y las criptas en la mucosa del íleo. H&E, 40x aumentos. (F) Atrofia leve de la mucosa del íleo del ratón transgénico para B7RP-1-Fc n.º 231M (macho) con pérdida focal y aplanamiento de las vellosidades. H&E, 40x.

Figura 20. La proteína de fusión B7RP-1-Fc inhibe el crecimiento tumoral en ratones. Se implantaron por vía intradérmica células de sarcoma Meth A en el abdomen de ratones Balb/C. En los días 7, 10, 14 y 17, tras la implantación, se trataron los ratones con vehículo (rombos oscuros) o B7RP-1-Fc murina (triángulos grises, ejemplo 7). Se midió el volumen tumoral, tal como se describe en el ejemplo 20, en los días indicados tras la implantación. Se monitorizó el crecimiento tumoral hasta el día 28. Cada grupo tenía ocho ratones.

Figura 21. Coestimulación de células T mediante B7RP-1-Fc humana. Se usaron anticuerpo anti-CD3 y B7RP-1-Fc humana para recubrir placas de 96 pocillos, y se cultivaron 1×10^5 células T/pocillo (>98% CD3+) y se recogieron tal como se describe en el ejemplo 21. A) Coestimulación inducida por anticuerpo anti-CD3 sólo (círculos negros), B7RP-1-Fc 0,5 µg/ml (triángulos negros), OPG-Fc 0,5 µg/ml (círculos blancos) y anticuerpo anti-CD28 5 µg/ml (triángulos blancos) a diferentes concentraciones de estimulación primaria con anticuerpo anti-CD3. Los datos muestran que B7RP-1-Fc coestimulaba células T sensibilizadas con anticuerpo anti-CD3 a niveles similares que la coestimulación usando anticuerpos anti-CD28. Los datos mostrados son [3 H]TdR media incorporada $\pm$ DE en pocillos por triplicado a partir de un experimento representativo de varios experimentos generados con células T aisladas de tres donantes normales. B) Inhibición dependiente de la dosis de la coestimulación de B7RP-1-Fc por

CRP-1-Fc. Se cultivaron células T en pocillos recubiertos con tanto anticuerpo anti-CD3 a 0,3 µg/ml como B7RP-1-Fc 0,5 µg/ml. Se preincubaron concentraciones diluidas en serie de CRP-1-Fc (círculos negros) u OPG-Fc (círculos blancos) con la B7RP-1-Fc durante 30 min. antes de la adición de células T. Los datos muestran que CRP-1-Fc inhibe la coestimulación inducida por B7RP-1 de una manera dependiente de la dosis. Se representa gráficamente el porcentaje de inhibición frente a la concentración de proteína CRP-1-Fc u OPG-Fc. Los datos mostrados son [3H]TdR media incorporada +/- DE de tres experimentos realizados por triplicado y son representativos de experimentos generados con dos donantes normales. C) Coestimulación por B7RP-1 de células CHO humanas. Se purificaron células T de sangre periférica y se cultivaron con diversas concentraciones de anticuerpo anti-CD3 en presencia de anticuerpo anti-CD3 solo (círculos negros), 1 x 10⁴ células control de vector CHO (círculos blancos) o 1 x 10⁴ células CHO B7RP-1 (triángulos negros), tal como se describe en el ejemplo 22. Los datos muestran que B7RP-1 unida a la membrana coestimulaba el crecimiento de células T en un nivel similar al observado usando proteínas de fusión B7RP-1-Fc. Los datos mostrados son la media +/- DE de cultivos por triplicado y son representativos de resultados generados con dos donantes normales. D) Producción de citocinas. Se cultivaron células T tal como se describe en (figura 21A) y se recogieron sobrenadantes a las 48 (barras negras) y 72 (barras grises) h. Los datos muestran que la cantidad de IL-2 producida por células coestimuladas por B7RP-1-Fc (gráfico superior) era similar a la producida por células estimuladas por anticuerpo anti-CD3 y Fc control, pero significativamente inferior a la producida por células coestimuladas por anticuerpo anti-CD28. Los datos también muestran que la coestimulación por B7RP-1-Fc potenciaba la producción de IL-10 (gráfico del medio) e IFN-gamma (gráfico inferior).

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a polipéptidos novedosos denominados en el presente documento CRP1 y B7RP1, que comprenden una pareja de receptor-ligando que está implicada en la activación de células T. Se identificaron ADNc que codifican para los polipéptidos a partir de una biblioteca preparada a partir de células intraepiteliales de intestino de ratón y se examinaron basándose en la homología frente a los polipéptidos CD28 y CTLA-4 (para CRP1) o los polipéptidos B7.1 y B7.2 (para B7RP1).

Se predice que la proteína 1 relacionada con CD28, o CRP1, es una proteína transmembrana de tipo I con una secuencia señal y un dominio extracelular en el extremo amino-terminal, un dominio transmembrana y un dominio intracelular carboxilo-terminal (figura 1). La proteína CRP1 de longitud completa tiene 180 aminoácidos en su forma madura. La secuencia líder predicha se extiende aproximadamente por los residuos de aminoácido 1-20 (en relación con la metionina de iniciación) y el dominio extracelular de la proteína madura abarca aproximadamente los residuos 21-145 (ejemplo 1). El dominio transmembrana predicho se extiende aproximadamente por los residuos 146-163 y el dominio intracelular abarca aproximadamente los residuos 164-200. El dominio extracelular amino-terminal es similar a un bucle de Ig con cisteínas de unión intra e intermolecular supuestas conservadas. Además, un motivo "MYPPPY", que se sabía previamente que era importante para la unión de B7.1 y B7.2 a CD28 y CTLA-4, también está parcialmente conservado.

CD28 y CTLA-4 son débilmente homólogas tal como se muestra a modo de ejemplo por la identidad de aminoácidos del 26% entre CD28 y CTLA-4 murinas. Hay una identidad de aminoácidos del 19% de CRP1 con CD28 murina y una identidad del 14% de CRP1 con CTLA-4 murina. Sin embargo, se conservan residuos de cisteína críticos entre CD28, CTLA-4 y CRP1 murinas en los residuos 42, 63, 83, 109 y 137 (en relación con la metionina de iniciación en la proteína CRP1, véase la figura 1A). Las longitudes de la proteína madura aproximadas y las ubicaciones de la región transmembrana en relación con el extremo carboxilo-terminal son también similares en CRP1, CD28 y CTLA-4.

CRP1 humana es una proteína transmembrana que tiene la secuencia de aminoácidos y nucleótidos mostrada en la figura 13A. La secuencia líder predicha se extiende por aproximadamente los residuos 1-19 o aproximadamente los residuos 1-20. El extremo amino-terminal maduro predicho está en los residuos 20 ó 21. Preferiblemente, el extremo amino-terminal maduro está en la posición 21. El dominio extracelular se extiende desde cualquiera de los extremos amino-terminales maduros predichos hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 140, el dominio transmembrana se extiende por aproximadamente los residuos 141-161 y el dominio intracelular se extiende por aproximadamente los residuos 162-199. La proteína CRP1 humana tiene una identidad del 69% con la proteína murina y las secuencias de nucleótidos correspondientes son idénticas al 77%. Se notificó la secuencia de CRP1 humana en Hutloff *et al.* Nature 397, 263-266 (1999).

Se predice que la proteína 1 relacionada con B7, o B7RP1, es una proteína transmembrana de tipo I con una secuencia señal y un dominio extracelular en el extremo amino-terminal, un dominio transmembrana y un dominio intracelular carboxilo-terminal (figura 2A). La proteína B7RP1 de longitud completa tiene 276 aminoácidos en su forma madura. La secuencia líder predicha se extiende por aproximadamente los residuos de aminoácido 1-46 (en relación con la metionina de iniciación) y el dominio extracelular de la proteína madura abarca los residuos 47-279 (ejemplo 3). El dominio transmembrana predicho se extiende por los residuos 280-298 y el dominio intracelular abarca los residuos 299-322. Similar a B7.1 y B7.2, el dominio extracelular de B7RP1 comprende dos bucles de Ig.

B7.1 y B7.2 son débilmente homólogas tal como se muestra a modo de ejemplo por la identidad de aminoácidos del 24% entre B7.1 y B7.2 murinas. Hay una identidad de aminoácidos del 20% de B7RP1 con B7.1 murina y una

identidad del 19% de B7RP1 con B7.2 murina. Sin embargo, se conservan residuos de cisteína críticos entre B7.1, B7.2 y B7RP1 murinas en los residuos 62, 138, 185 y 242 (en relación con la metionina de iniciación en la proteína B7RP1, figura 2A). La longitud de la proteína madura aproximada y la ubicación de la región transmembrana en relación con el extremo carboxilo-terminal son también similares en mB7RP1, B7.1 y B7.2.

B7RP1 humana es también una proteína transmembrana con residuos de cisteína conservados en el dominio extracelular que son necesarios para estructuras de bucle de Ig. La secuencia líder predicha abarca aproximadamente los residuos 1-18, 1-19, 1-20, 1-21, 1-23 ó 1-27 tal como se muestra en la figura 3A. El extremo amino-terminal maduro predicho puede estar en cualquiera de los residuos 19, 20, 21, 22, 24 ó 28. Preferiblemente, el extremo amino-terminal está en la posición 19. El dominio extracelular se extiende desde cualquiera de los extremos amino-terminales maduros hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 259. El dominio transmembrana predicho se extiende por aproximadamente los residuos 259-274. El dominio intracelular abarca los residuos 275-302. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos de B7RP1 humana de longitud completa se muestra en la figura 12A. B7RP1 humana es idéntica aproximadamente al 43% a la proteína murina.

CRP1 y B7RP1 se unen entre sí, pero CRP1 no se une de manera detectable a la proteína relacionada con B7RP1 B7.2; y B7RP1 no presenta unión detectable a CTLA-4 o CD28 relacionada con CRP1 (ejemplo 8). Se mostró que B7RP1 regula la proliferación de células T, presumiblemente a través de la interacción de B7RP1 con receptores de CRP1 (ejemplo 11). Por tanto, CRP1 y B7RP1 representan una ruta novedosa para regular la proliferación y activación de células T.

La interacción de B7RP1 con CRP1 puede regularse de tal manera que la coestimulación inmunitaria y la proliferación y activación de células T pueda aumentarse o disminuirse. A modo de ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales anti-B7RP1 generados contra B7RP1 murina bloqueaban la interacción B7RP1/CRP1 y también bloqueaban la proliferación de células T inducida por una proteína de fusión B7RP1-Fc (véase el ejemplo 17). Una proteína de fusión CRP-1-Fc humana bloqueaba la proliferación de células T inducida por B7RP-1-Fc humana (ejemplo 21). Además, la adición de una proteína de fusión CRP1-Fc retrasaba la aparición de síntomas artríticos en un modelo de ratón de artritis reumatoide (véase el ejemplo 18). La coestimulación por B7RP-1/CRP-1 también puede aumentarse mediante la adición de la proteína de fusión B7RP-1-Fc u otros activadores de esta ruta (ejemplo 20).

Moléculas de ácido nucleico

El término "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está libre de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada de manera natural, y de manera preferible sustancialmente libre de cualquier otra molécula de ácido nucleico de mamífero contaminante.

El término "variante alélica" se refiere a una de varias posibles formas alternativas que se producen de manera natural de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo.

El término "variante de corte y empalme" se refiere a una molécula de ácido nucleico, habitualmente ARN, que se genera mediante el procesamiento alternativo de secuencias de intrones en un transcrito de ARN.

El término "condiciones de alta rigurosidad" se refiere a las condiciones que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo, 0,1 X SSC (NaCl 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M), NaDodSO₄ al 0,1% (SDS) a 50°C o (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (vol/vol) con albúmina sérica bovina al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con 5 X SSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM) a 42°C. Otro ejemplo de condiciones de alta rigurosidad es formamida al 50%, 5 x SSC, fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1%.

El término "condiciones de rigurosidad moderadas" se refiere a las condiciones que incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura y fuerza iónica) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas son condiciones tales como incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 µl/ml, seguido por lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica y otros parámetros según sea necesario para adaptarse a factores tales como longitud de sonda y similares.

Se exponen métodos de tecnología de ADN recombinante en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)) y/o Ausubel *et al.*, eds., (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. y Wiley and Sons, NY (1994)).

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para polipéptidos B7RP1. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que son fragmentos, variantes alélicas, variantes de corte y empalme o son complementarias en secuencia a moléculas que codifican para polipéptidos B7RP1. También se dan a conocer

moléculas de ácido nucleico que son idénticas al menos aproximadamente al 70% a moléculas que codifican para CRP1 o B7RP1 o que se hibridan con moléculas que codifican para CRP1 o B7RP1 en condiciones de rigurosidad moderada o alta. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser ADNc, ADN genómico, ARN o una molécula de ácido nucleico parcial o totalmente sintética. En aspectos preferidos, las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción son idénticas al menos aproximadamente al 75%, al 80%, al 85%, al 90% o al 95% a moléculas de ácido nucleico que codifican para CRP1 o B7RP1.

Puede obtenerse un gen o ADNc que codifica para un polipéptido CRP1 o B7RP1 o fragmento del mismo, por ejemplo, mediante examen por hibridación o amplificación por PCR de una biblioteca de ADNc o genómica. Pueden generarse sondas o cebadores útiles para examinar la biblioteca basándose en la información de secuencia para otros genes o fragmentos de genes conocidos de la misma familia de genes o una familia relacionada, por ejemplo, motivos conservados encontrados en polipéptidos relacionados con CRP1 o B7RP1 tales como una serie conservada de residuos de cisteína. Además, cuando se ha identificado un gen que codifica para un polipéptido CRP1 o B7RP1 de una especie, puede usarse todo o una parte de ese gen como sonda para identificar genes homólogos de otra especie. Las sondas o los cebadores pueden usarse para examinar bibliotecas de ADNc de diversas fuentes de tejido que se cree que expresan el gen de CRP1 o B7RP1.

Cuando se usan sondas oligonucleotídicas para examinar bibliotecas de ADNc o genómicas, puede usarse una de las siguientes dos disoluciones de alta rigurosidad. La primera de éstas es 6 X SSC con pirofosfato de sodio al 0,05% a 35°C-62°C, dependiendo la temperatura de la longitud de la sonda oligonucleotídica. Por ejemplo, se lavan sondas de 14 pares de bases a 35-40°C, se lavan sondas de 17 pares de bases a 45-50°C, se lavan sondas de 20 pares de bases a 52-57°C y se lavan sondas de 23 pares de bases a 57-63°C. La temperatura puede aumentarse 2-3°C cuando la unión no específica de fondo parezca alta. Una segunda disolución de alta rigurosidad utiliza cloruro de tetrametilamonio (TMAC) para lavar sondas oligonucleotídicas. Una disolución de lavado rigurosa es TMAC 3 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y SDS al 0,2%. La temperatura de lavado usando esta disolución es una función de la longitud de la sonda. Por ejemplo, una sonda de 17 pares de bases se lava a aproximadamente 45-50°C.

Otro medio para preparar un gen que codifica para un polipéptido CRP1 o B7RP1 o fragmento del mismo es emplear síntesis química usando métodos bien conocidos por el experto en la técnica tal como los descritos por Engels *et al.* (Agnew. Chem. Intl. Ed., 28:716-734 (1989)). Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos de fosfotriéster, fosforamidita y H-fosfonato para la síntesis de ácido nucleico. Un método preferido para tal síntesis química es síntesis soportada sobre polímero usando química de fosforamidita convencional. Normalmente, el ADN que codifica para un polipéptido CRP1 o B7RP1 tendrá varios cientos de nucleótidos de longitud. Pueden sintetizarse ácidos nucleicos mayores de aproximadamente 100 nucleótidos como varios fragmentos usando estos métodos. Los fragmentos pueden ligarse entonces entre sí para formar un polipéptido CRP1 o B7RP1 de longitud completa. Habitualmente, el fragmento de ADN que codifica para el extremo amino-terminal del polipéptido tendrá un ATG, que codifica para un residuo de metionina. Esta metionina puede estar presente o no en la forma madura de un polipéptido CRP1 o B7RP1, dependiendo de si el polipéptido producido en la célula huésped está diseñado para secretarse a partir de esa célula.

Moléculas de ácido nucleico de CRP1 o B7RP1, fragmentos y/o derivados que no codifican por sí mismos para polipéptidos que sean biológicamente activos pueden no obstante ser útiles como sondas de hibridación en ensayos de diagnóstico para someter a prueba, o bien cualitativamente o bien cuantitativamente, la presencia de ADN de CRP1 o B7RP1 o ARN correspondiente en muestras de fluidos corporales o tejidos de mamíferos.

En algunos casos, puede ser deseable preparar variantes de ácido nucleico y/o aminoácidos de polipéptidos CRP1 o B7RP1 que se producen de manera natural. Pueden producirse variantes de ácido nucleico usando mutagénesis dirigida al sitio, amplificación por PCR u otros métodos apropiados, cuando el/los cebador(es) tienen las mutaciones puntuales deseadas (véase Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente, para descripciones de técnicas de mutagénesis). También puede usarse síntesis química usando métodos descritos por Engels *et al.*, citado anteriormente, para preparar tales variantes. Pueden usarse también otros métodos conocidos por el experto en la técnica.

Las variantes de ácido nucleico preferidas incluyen las que contienen codones que se han alterado para lograr una expresión óptima de polipéptidos CRP1 y B7RP1 en una célula huésped dada. Las alteraciones de codones particulares dependerán de la selección de proteína y célula huésped. Tal "optimización de codones" puede llevarse a cabo, en un caso, seleccionando codones que se usan preferentemente en genes altamente expresados en una célula huésped dada. Pueden usarse algoritmos informáticos que incorporan tablas de frecuencias de codones tales como "Ecohigh.Cod" para la preferencia de codones de genes bacterianos altamente expresados y se proporcionan por el University of Wisconsin Package versión 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI. Otras tablas de frecuencia de codones útiles incluyen "Celegans_high.cod", "Celegans_low.cod", "Drosophila_high.cod", "Human_high.cod", "Maize_high.cod" y "Yeast_high.cod". Otras variantes preferidas son las que codifican para cambios de aminoácidos conservativos tal como se describe a continuación (por ejemplo, en los que la carga o polaridad de la cadena lateral del aminoácido que se produce de manera natural no se altera sustancialmente por la sustitución con un aminoácido diferente) en comparación con el silvestre, y/o las diseñadas para o bien generar un sitio/sitios de glicosilación y/o fosforilación novedoso(s), o bien las diseñadas para delecionar un sitio/sitios de glicosilación y/o fosforilación existente(s).

El gen, ADNc o fragmento del mismo que codifica para un polipéptido CRP1 o B7RP1 puede insertarse en un vector de expresión o amplificación apropiado usando técnicas de ligamiento convencionales. El vector se selecciona normalmente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de manera que puede producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). El gen, ADNc o fragmento del mismo que codifica para el polipéptido CRP1 o B7RP1 puede amplificarse/expresarse en células huésped procariotas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si el polipéptido CRP1 o B7RP1 o fragmento del mismo va a glicosilarse y/o fosforilarse. Si es así, son preferibles células huésped de levadura, de insecto o de mamífero.

Normalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos insertadas. Tales secuencias, denominadas colectivamente "secuencias flanqueantes", incluirán un promotor y otros elementos reguladores tales como un potenciador/potenciadores, un elemento de origen de replicación, un elemento de terminación de la transcripción, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia de péptido señal, un elemento de sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica para el polipéptido que va a expresarse y un elemento de marcador seleccionable. Cada uno de estos elementos se comenta a continuación. Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia de "etiqueta", es decir, una molécula de oligonucleótido ubicada en el extremo 5' o 3' de una secuencia que codifica para polipéptido CRP1 o B7RP1; la molécula de oligonucleótido codifica para poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina de virus influenza) o myc para la que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente al polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la purificación por afinidad de un polipéptido CRP1 o B7RP1 de la célula huésped. La purificación por afinidad puede lograrse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente de un polipéptido CRP1 o B7RP1 purificado por diversos medios tales como usando determinadas peptidasas.

La región Fc y bisagra de inmunoglobulina humana pueden fusionarse en el extremo o bien N-terminal o bien C-terminal de un polipéptido CRP1 o B7RP1 por un experto en la técnica. La proteína de fusión de Fc posterior puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A. Se sabe que una región Fc de inmunoglobulina presenta una semivida farmacocinética larga *in vivo* y se ha encontrado que proteínas fusionadas a una región Fc presentan una semivida sustancialmente mayor *in vivo* en comparación con el homólogo no fusionado. Además, la fusión a la región Fc permite la dimerización y/o multimerización de la molécula que puede ser útil para la bioactividad de algunas moléculas.

La secuencia flanqueante puede ser homóloga (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heteróloga (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintética o puede ser las secuencias flanqueantes de ácido nucleico de CRP1 o B7RP1 nativas. Como tal, la fuente de la secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariota o eucariota unicelular, cualquier organismo vertebrado o invertebrado o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula huésped.

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención pueden obtenerse mediante cualquier de varios métodos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento distintas de secuencias flanqueantes de ácido nucleico de CRP1 o B7RP1 se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y por tanto pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de la secuencia flanqueante. En este caso, puede sintetizarse la secuencia flanqueante usando los métodos descritos anteriormente para la síntesis o clonación de ácido nucleico.

Cuando se conoce toda o sólo una parte de la secuencia flanqueante, puede obtenerse usando PCR y/o examinando una biblioteca genómica con fragmentos de secuencias flanqueantes y/u oligonucleótidos adecuados de la misma u otra especie.

Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de un trozo mayor de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede lograrse mediante digestión con endonucleasas de restricción usando una o más enzimas seleccionadas cuidadosamente para aislar el fragmento de ADN apropiado. Tras la digestión, puede aislarse el fragmento deseado mediante purificación en gel de agarosa, columna Qiagen® u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para lograr este fin será fácilmente evidente para un experto habitual en la técnica.

El elemento de origen de replicación es normalmente una parte de vectores de expresión procariotas adquiridos comercialmente, y ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. La amplificación del vector hasta un determinado número de copias puede ser, en algunos casos, importante para la expresión óptima del polipéptido CRP1 o B7RP1. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse uno

químicamente basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector.

El elemento de terminación de la transcripción está ubicado normalmente en 3' del extremo de una secuencia que codifica para polipéptido CRP1 o B7RP1 y sirve para terminar la transcripción de un polipéptido CRP1 o B7RP1. Habitualmente, el elemento de terminación de la transcripción en células procariotas es un elemento rico en G-C seguido por una secuencia de poli T. Aunque el elemento se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para síntesis de ácido nucleico tales como los descritos anteriormente.

Un elemento de gen marcador seleccionable codifica para una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped hecha crecer en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células huésped procariotas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos. Marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina.

El elemento de unión al ribosoma, denominado comúnmente la secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o la secuencia Kozak (eucariotas), es habitualmente necesario para la iniciación de la traducción de ARNm. El elemento está ubicado normalmente en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido CRP1 o B7RP1 que va a sintetizarse. La secuencia Shine-Dalgarno varía pero es normalmente una polipurina (es decir, que tiene un alto contenido en A-G). Se han identificado muchas secuencias Shine-Dalgarno, cada una de las cuales puede sintetizarse fácilmente usando métodos expuestos anteriormente y usarse en un vector procariota.

En aquellos casos en los que sea deseable que un polipéptido CRP1 o B7RP1 se secrete de la célula huésped, puede usarse una secuencia señal para dirigir la exportación del polipéptido de la célula huésped. También se inactiva un dominio transmembrana de CRP1 o B7RP1 mediante mutación o delección para impedir la unión a la membrana del huésped. Normalmente, la secuencia señal se coloca en la región codificante de un ADNc o gen de CRP1 o B7RP1, o directamente en el extremo 5' de la región codificante de un gen de CRP1 o B7RP1. Se han identificado muchas secuencias señal, y puede usarse cualquiera de ellas que sea funcional en la célula huésped seleccionada conjuntamente con un ADNc o gen de CRP1 o B7RP1. Por tanto, la secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga para un ADNc o gen de CRP1 o B7RP1, y puede ser homóloga o heteróloga para un ADNc o gen de polipéptidos CRP1 o B7RP1. Adicionalmente, la secuencia señal puede sintetizarse químicamente usando métodos expuestos anteriormente.

En la mayoría de los casos, la secreción del polipéptido de la célula huésped por medio de la presencia de un péptido señal dará como resultado la eliminación de la metionina amino-terminal del polipéptido.

En muchos casos, la transcripción de un ADNc o gen de CRP1 o B7RP1 se aumenta mediante la presencia de uno o más intrones en el vector; esto es particularmente cierto cuando se produce un polipéptido CRP1 o B7RP1 en células huésped eucariotas, especialmente células huésped de mamífero. Los intrones usados pueden producirse de manera natural dentro de un gen de CRP1 o B7RP1, especialmente cuando el gen usado es una secuencia genómica de longitud completa o un fragmento de la misma. Cuando el intrón no se produce de manera natural dentro del gen (como para la mayoría de los ADNc), el/los intrón/intrones puede(n) obtenerse de otra fuente. La posición del intrón con respecto a la secuencia flanqueante en 5' y un gen de CRP1 o B7RP1 es generalmente importante, ya que el intrón debe transcribirse para que sea eficaz. Como tal, cuando un gen de CRP1 o B7RP1 insertado en el vector de expresión es una molécula de ADNc, la posición preferida para el intrón es en 3' con respecto al sitio de inicio de la transcripción, y en 5' con respecto a la secuencia de terminación de la transcripción de poliA. Preferiblemente, el intrón o intrones estarán ubicados en un lado o el otro (es decir, en 5' o 3') del ADNc de manera que no interrumpan esta secuencia codificante. Puede usarse cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo cualquier organismo viral, procariota y eucariota (planta o animal), para poner en práctica esta invención, siempre que sea compatible con la(s) célula(s) huésped(es) en la(s) que se inserta. También se incluyen en el presente documento intrones sintéticos. Opcionalmente, puede usarse más de un intrón en el vector.

Cuando uno o más de los elementos expuestos anteriormente no están ya presentes en el vector que va a usarse, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. El experto en la técnica conoce bien métodos usados para obtener cada uno de los elementos.

Vectores preferidos para poner en práctica esta invención son los que son compatibles con células huésped bacterianas, de insecto y de mamífero. Tales vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15b (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

Tras haberse construido el vector y haberse insertado una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido CRP1 o B7RP1 truncado o de longitud completa en el sitio apropiado del vector, el vector completado

puede insertarse en una célula huésped adecuada para su amplificación y/o expresión de polipéptidos.

Las células huésped pueden ser células huésped procariotas (tales como *E. coli*) o células huésped eucariotas (tales como una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, puede sintetizar un polipéptido CRP1 o B7RP1 que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta al medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si no se secreta). Tras la recogida, puede purificarse un polipéptido CRP1 o B7RP1 usando métodos tales como cromatografía de tamices moleculares, cromatografía de afinidad, y similares.

La selección de la célula huésped apropiada para la producción del polipéptido CRP1 o B7RP1 dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones del polipéptido que se requieren para la actividad, tal como glicosilación o fosforilación, o facilidad de plegamiento para dar una molécula biológicamente activa.

Células o líneas celulares adecuadas pueden ser células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 o 293T de riñón embrionario humano (HEK) o células 3T3. La selección de células huésped de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, el cultivo, la amplificación, la selección y la producción y purificación de productos se conocen en la técnica. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares COS-1 y COS-7 de mono, y la línea celular CV-1. Las células huésped de mamífero a modo de ejemplo adicionales incluyen líneas celulares de primate y líneas celulares de roedor, incluyendo líneas celulares transformadas. También son adecuadas células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, así como explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección de actuación dominante. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen pero no se limitan a, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster BHK o HaK.

Útiles de manera similar como células huésped son células bacterianas. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, DH5 α , DH10 y MC1061) se conocen bien como células huésped en el campo de la biotecnología. Pueden emplearse también diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otros *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, y similares en este método.

Muchas cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la técnica también están disponibles como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención.

Adicionalmente, cuando se desee, pueden utilizarse sistemas de células de insecto en los métodos de la presente invención. Tales sistemas se describen por ejemplo en Kitts *et al.* (Biotechniques, 14:810-817 (1993)), Lucklow (Curr. Opin. Biotechnol., 4:564-572 (1993)) y Lucklow *et al.* (J. Virol., 67:4566-4579 (1993)). Células de insecto preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Puede lograrse la "transformación" o "transfección" de un vector de expresión en la célula huésped seleccionada usando métodos tales como cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o el método de DEAE-dextrano. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped que va a usarse. Estos métodos y otros métodos adecuados los conoce bien el experto en la técnica y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Las células huésped transformadas o transfectadas con un vector de expresión pueden cultivarse usando medios convencionales bien conocidos por el experto en la técnica. Los medios contendrán habitualmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Medios adecuados para cultivar células *E. coli* son, por ejemplo, caldo Luria (LB) y/o caldo Terrific (TB). Medios adecuados para cultivar células eucariotas son RPMI 1640, MEM, DMEM, todos los cuales pueden complementarse con suero y/o factores de crecimiento según se requiera por la línea celular particular que esté cultivándose. Un medio adecuado para cultivos de insecto es medio de Grace complementado con extracto de levadura, hidrolizado de lactoalbúmina y/o suero de ternero fetal según sea necesario.

Normalmente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de las células transformadas sólo como complemento para los medios. El compuesto que va a usarse estará dictado por el elemento de marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento de marcador seleccionable es resistencia a kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina.

La cantidad de polipéptido CRP1 o B7RP1 producida en la célula huésped puede evaluarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, sin limitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturizante, separación por HPLC, inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad tales como ensayos de desplazamiento en gel de unión a ADN.

Si un polipéptido CRP1 o B7RP1 se ha diseñado para secretarse de las células huésped, la mayoría del polipéptido puede encontrarse en el medio de cultivo celular. Los polipéptidos preparados de este modo normalmente no presentarán una metionina amino-terminal, ya que se elimina durante la secreción de la célula. Sin embargo, si un

polipéptido CRP1 o B7RP1 no se secreta de las células huésped, estará presente en el citoplasma y/o el núcleo (para células huésped eucariotas) o en el citosol (para células huésped de bacterias Gram-negativas) y pueden tener una metionina amino-terminal.

La purificación de un polipéptido CRP1 o B7RP1 de la disolución puede lograrse usando una variedad de técnicas. Si el polipéptido se ha sintetizado de manera que contiene una etiqueta tal como hexahistidina (CRP1 o B7RP1 hexaHis) u otro péptido pequeño tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) en su extremo o bien carboxilo o bien amino-terminal, puede purificarse esencialmente en un procedimiento de una etapa haciendo pasar el polipéptido etiquetado a través de una columna de afinidad en la que la matriz de la columna tiene una alta afinidad por la etiqueta o por el polipéptido directamente (es decir, un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un polipéptido CRP1 o B7RP1). Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad a níquel, por tanto puede usarse una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel de Qiagen®) para la purificación de CRP1 o B7RP1/poliHis. (Véase por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)).

Cuando se prepara un polipéptido CRP1 o B7RP1 sin una etiqueta unida, y no está disponible ningún anticuerpo, pueden usarse otros procedimientos bien conocidos para la purificación. Tales procedimientos incluyen, sin limitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamices moleculares, HPLC, electroforesis en gel nativo en combinación con elución del gel e isoelectroenfoque preparativo (máquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific). En algunos casos, pueden combinarse dos o más de estas técnicas para lograr un aumento de pureza.

Si se anticipa que un polipéptido CRP1 o B7RP1 se encontrará principalmente de manera intracelular, el material intracelular (incluyendo cuerpos de inclusión de bacterias Gram-negativas) puede extraerse de la célula huésped usando cualquier técnica convencional conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, las células huésped pueden lisarse para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante prensa francesa, homogeneización y/o sonicación seguido por centrifugación.

Si un polipéptido CRP1 o B7RP1 ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión pueden unirse a menudo a las membranas celulares interna y/o externa y por tanto se encontrarán principalmente en el material sedimentado tras la centrifugación. El material sedimentado puede tratarse entonces a pH extremos o con un agente caotrópico tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotreitól a pH alcalino o tris-carboxietilfosfina a pH ácido para liberar, romper y solubilizar los cuerpos de inclusión. El polipéptido en su forma ahora soluble puede analizarse entonces usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar un polipéptido CRP1 o B7RP1, el aislamiento puede lograrse usando métodos convencionales tales como los expuestos a continuación y en Marston *et al.* (Met. Enz., 182:264-275 (1990)). En algunos casos, un polipéptido CRP1 o B7RP1 puede no ser biológicamente activo tras su aislamiento. Pueden usarse diversos métodos para "replegar" o convertir el polipéptido a su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro para restaurar la actividad biológica. Tales métodos incluyen poner en contacto el polipéptido solubilizado con una disolución que tiene un pH habitualmente por encima de 7 y en presencia de una concentración particular de un caotrópico apropiado. En la mayoría de los casos, la disolución de replegamiento/oxidación contendrá también un agente reductor o el agente reductor y la forma oxidada correspondiente están en una razón específica para generar un potencial redox particular que permite que se produzca el intercambio de disulfuros en la formación del/de los puente(s) de cisteína de la proteína. Algunas de las parejas redox comúnmente usadas incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotreitól (DTT)/ditiano DTT, 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-b(ME). En muchos casos, es necesario un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento y los reactivos más comunes usados para este fin incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

También pueden prepararse polipéptidos CRP1 o B7RP1, fragmentos y/o derivados de los mismos mediante métodos de síntesis química (tal como síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en la técnica tales como las expuestas por Merrifield *et al.*, (J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963)), Houghten *et al.* (Proc Natl Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985)), y Stewart y Young (Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)). Tales polipéptidos pueden sintetizarse con o sin una metionina en el extremo amino-terminal. Pueden oxidarse polipéptidos CRP1 o B7RP1 o fragmentos sintetizados químicamente usando métodos expuestos en estas referencias para formar puentes disulfuro. Se espera que polipéptidos CRP1 o B7RP1 o fragmentos tengan actividad biológica comparable a polipéptidos CRP1 o B7RP1 producidos de manera recombinante o purificados de fuentes naturales, y por tanto puedan usarse de manera intercambiable con polipéptido CRP1 o B7RP1 natural o recombinante.

Polipéptidos

El término "polipéptido CRP1 o B7RP1" se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 1A (SEQ ID NO: 2), figura 2A (SEQ ID NO: 7) o figura 3A (SEQ ID NO: 12) y todos los polipéptidos relacionados descritos en el presente documento. Los polipéptidos relacionados incluyen variantes alélicas, variantes de corte y empalme, fragmentos, derivados, variantes de sustitución, delección e inserción, polipéptidos de fusión y ortólogos. Tales polipéptidos relacionados pueden ser polipéptidos maduros, es decir, un polipéptido que carece de un péptido señal. Un polipéptido CRP1 o B7RP1 puede tener o no una metionina amino-terminal,

dependiendo de la manera en la que se preparan.

El término "fragmento de polipéptido CRP1 o B7RP1" se refiere a un péptido o polipéptido que es menor que la secuencia de aminoácidos de longitud completa de un polipéptido CRP1 o B7RP1 tal como se expone en la figura 1A (SEQ ID NO: 2), figura 2A (SEQ ID NO: 7) o figura 3A (SEQ ID NO: 12). Un fragmento de este tipo puede resultar de truncamiento en el extremo amino-terminal, truncamiento en el extremo carboxilo-terminal y/o una delección interna en la secuencia de polipéptido. Tales fragmentos de polipéptidos CRP1 o B7RP1 pueden prepararse con o sin una metionina amino-terminal. Además, fragmentos de polipéptidos CRP1 o B7RP1 pueden ser variantes de corte y empalme que se producen de manera natural, otras variantes de corte y empalme y fragmentos que resultan de actividad proteasa *in vivo* que se produce de manera natural. Los fragmentos de polipéptido CRP1 o B7RP1 preferidos incluyen formas solubles de CRP1 o B7RP1 que carecen de un dominio transmembrana funcional y comprenden parte o todo del dominio extracelular de o bien CRP1 o bien B7RP1.

El término "variantes de polipéptido CRP1 o B7RP1" se refiere a polipéptidos CRP1 o B7RP1 cuyas secuencias de aminoácidos contienen una o más sustituciones, delecciones y/o adiciones de la secuencia de aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos de polipéptidos CRP1 o B7RP1 expuestas en la figura 1A (SEQ ID NO: 2), figura 2A (SEQ ID NO: 7) o figura 3A (SEQ ID NO: 12). Tales variantes de polipéptidos CRP1 o B7RP1 pueden prepararse a partir de las variantes de moléculas de ácido nucleico de polipéptidos CRP1 y B7RP1 correspondientes, que tienen una secuencia de ADN que varía por consiguiente de las secuencias de ADN para polipéptidos CRP1 o B7RP1.

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivados de polipéptido CRP1 o B7RP1" se refiere a polipéptidos CRP1 o B7RP1, variantes o fragmentos de los mismos, que se han modificado químicamente, como por ejemplo, mediante adición de uno o más polímeros solubles en agua, hidratos de carbono unidos a N o unidos a O, azúcares, fosfatos y/u otras moléculas de este tipo, en los que la molécula o moléculas no están unidas de manera natural a polipéptidos CRP1 o B7RP1 silvestres. Los derivados incluyen además la delección de uno o más grupos químicos unidos de manera natural al polipéptido CRP1 o B7RP1.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "polipéptidos CRP1 o B7RP1 biológicamente activos", "fragmentos de polipéptido CRP1 o B7RP1 biológicamente activos", "variantes de polipéptido CRP1 o B7RP1 biológicamente activas" y "derivados de polipéptido CRP1 o B7RP1 biológicamente activos" se refieren a polipéptidos CRP1 o B7RP1 que tienen al menos una de las actividades características de CRP1 o B7RP1. Una actividad es unión de B7RP1 a CRP1. Otra actividad es la capacidad de CRP1 o B7RP1 para estimular la proliferación y/o activación de células T.

El término "ortólogo" se refiere a un polipéptido que corresponde a un polipéptido identificado de una especie. Por ejemplo, polipéptidos B7RP1 de ser humano y ratón se consideran ortólogos.

El término "secuencia de aminoácidos madura" se refiere a un polipéptido que carece de una secuencia líder.

El término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido que está libre de al menos un polipéptido contaminante que se encuentra en su entorno natural, y de manera preferible sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido de mamífero contaminante.

El término "identidad", tal como se conocen en la técnica, es una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de ácido nucleico o dos o más polipéptidos, tal como se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de moléculas de polipéptido o ácido nucleico, tal como puede ser el caso, tal como se determina por la coincidencia entre hebras de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre dos o más secuencias con alineaciones de huecos tratadas mediante programas informáticos particulares (es decir, "algoritmos").

El término "similitud" se refiere a un concepto relacionado, pero en contraposición a "identidad", una medida de similitud incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias de sustituciones conservativas. Puesto que las sustituciones conservativas se aplican a polipéptidos y no a moléculas de ácido nucleico, la similitud sólo se ocupa de comparaciones de secuencias de polipéptido. Si dos secuencias de polipéptido tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos, y el resto son sustituciones no conservativas, entonces el porcentaje de identidad y similitud serían ambos del 50%. Si en el mismo ejemplo hay 5 posiciones más en las que hay sustituciones conservativas, entonces el porcentaje de identidad sigue siendo del 50%, pero el porcentaje de similitud sería del 75% (15/20). Por tanto, en casos en los que hay sustituciones conservativas, el grado de similitud entre dos secuencias de polipéptido será más alto que el porcentaje de identidad entre esas dos secuencias. Se describen sustituciones de aminoácidos "conservativas" a continuación en el presente documento en referencia a la tabla I. Basándose en la tabla I, sustituciones de aminoácidos conservativas son aminoácidos alternativos seleccionados de la misma agrupación, por ejemplo, básicos, ácidos, polares no cargados y no polares. Por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservativas para arginina serían lisina e histidina.

La identidad y similitud pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo pero sin limitarse a los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988;

Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Los métodos preferidos para determinar la identidad y/o similitud están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul, S.F. *et al.*, J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990). El programa BLAST X está disponible públicamente del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.* NCB NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

A modo de ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia para lograr una coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el "tramo coincidente", tal como se determina mediante el algoritmo). Se usan una penalización por apertura de huecos (que se calcula como 3 X la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada coincidencia de aminoácidos perfecta por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de huecos (que es habitualmente 1/10 veces la penalización por apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 conjuntamente con el algoritmo. También se usa por el algoritmo una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff *et al.*, en: Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, sup. 3 (1978) para la matriz de comparación PAM250; véase Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de polipéptido incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48.: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.89:10915-10919 (1992)

Penalización por huecos: 12

Penalización por longitud de huecos: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con sin penalización para huecos de extremos) usando el algoritmo GAP.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de ácido nucleico incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970)

Matriz de comparación: coincidencias = +10, apareamiento erróneo = 0

Penalización por huecos: 50

Penalización por longitud de huecos: 3

El programa GAP también es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

Pueden usarse otros algoritmos, penalizaciones por apertura de huecos, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc. a modo de ejemplo por los expertos en la técnica, incluyendo los expuestos en el Program Manual, Wisconsin Package, versión 9, septiembre de 1997. Las elecciones particulares que van a hacerse dependerán de la comparación específica que va a hacerse, tal como ADN con ADN, proteína con proteína, proteína con ADN; y adicionalmente, de si la comparación es entre pares de secuencias (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una base de datos de secuencias grande (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

Los polipéptidos que son idénticos al menos aproximadamente al 70 por ciento tendrán normalmente una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido CRP1 o B7RP1 silvestre.

En una realización preferida, los polipéptidos tendrán aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% de identidad con polipéptidos CRP1 o B7RP1. Habitualmente, las sustituciones del residuo nativo serán o bien alanina, o bien un aminoácido conservativo de modo que tiene poco o ningún efecto sobre la carga neta global, polaridad o hidrofobicidad del polipéptido. Se exponen sustituciones conservativas en la tabla I a continuación.

5

Tabla I

Sustituciones de aminoácidos conservativas

Básicos	argina lisina histidina
Ácidos	ácido glutámico ácido aspártico
Polares no cargados	glutamina asparagina serina treonina tirosina
No polares	fenilalanina triptófano cisteína glicina alanina valina prolina metionina leucina norleucina isoleucina

10

Se abarcan derivados de polipéptido B7RP1 por la invención. En una realización, se incluyen dentro del alcance de la presente invención composiciones de polipéptido B7RP1 modificado químicamente en la que los polipéptidos B7RP1 están unidos a un polímero. El polímero seleccionado normalmente es soluble en agua de modo que la proteína a la que está unido no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero seleccionado se modifica habitualmente para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, de modo que el grado de polimerización puede controlarse tal como se proporciona en los presentes métodos. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. Se incluye dentro del alcance de la invención una mezcla de polímeros. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

15

El polímero soluble en agua o mezcla del mismo puede seleccionarse del grupo que consiste en, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros a base de hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y poli(alcohol vinílico).

20

Para las reacciones de acilación, el/los polímero(s) seleccionado(s) debe(n) tener un único grupo éster reactivo. Para alquilación reductora, el/los polímero(s) seleccionado(s) debe(n) tener un único grupo aldehído reactivo. Un aldehído reactivo preferido es propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o derivados de monoalcóxido o arilóxido C1-C10 de los mismos (véase la patente estadounidense n.º 5.252.714).

25

Puede llevarse a cabo la pegilación de polipéptidos CRP1 o B7RP1 mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica, tal como se describe por ejemplo en las siguientes referencias: Focus on Growth Factors 3: 4-10 (1992); documento EP 0 154 316; y documento EP 0 401 384. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo) tal como se describe a continuación.

30

Un polímero soluble en agua particularmente preferido para su uso en el presente documento es polietilenglicol, abreviado PEG. Tal como se usa en el presente documento, polietilenglicol pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono-alcóxi- o arilóxi (C1-C10)-polietilenglicol.

35

En general, la derivatización química puede realizarse en cualquier condición adecuada usada para hacer reaccionar una sustancia biológicamente activa con una molécula de polímero activada. Los métodos para preparar polipéptidos CRP1 y B7RP1 pegilados comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con polietilenglicol (tal como un derivado de aldehído o éster reactivo de PEG) en condiciones mediante las cuales el polipéptido CRP1 o B7RP1 se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el/los producto(s) de reacción. En

general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la razón de PEG:proteína, mayor será el porcentaje de producto polipegilado.

Generalmente, los estados que pueden aliviarse o modularse mediante la administración de conjugados de polímero de CRP1 o B7RP1 incluyen los descritos en el presente documento para polipéptidos CRP1 o B7RP1 no conjugados. Sin embargo, los conjugados dados a conocer en el presente documento pueden tener actividades adicionales, actividad biológica potenciada o reducida u otras características, tales como semivida aumentada o disminuida, en comparación con las moléculas no derivatizadas.

Pueden emplearse polipéptidos CRP1 o B7RP1, fragmentos, variantes y derivados solos, juntos o en combinación con otras composiciones farmacéuticas. Pueden usarse polipéptidos CRP1 o B7RP1, fragmentos, variantes y derivados en combinación con citocinas, factores de crecimiento, antibióticos, antiinflamatorios y/o agentes quimioterápicos según sea apropiado para la indicación que esté tratándose.

La presente descripción proporciona agentes de unión selectiva de CRP1 o B7RP1. Un agente de unión selectiva se refiere a una molécula que tiene especificidad por CRP1 o B7RP1 y puede incluir una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un hidrato de carbono, un lípido o un compuesto de peso molecular pequeño. Un agente de unión selectiva interacciona con o bien CRP1 o bien B7RP1 y a su vez regula la unión de CRP1 a B7RP1. En un aspecto, un agente de unión selectiva bloquea parcial o completamente la unión de CRP1 a B7RP1 e inhibe parcial o completamente al menos una actividad biológica de CRP-1 o B7RP-1, tal como actividad coestimuladora inmunitaria. En otro aspecto, el agente de unión selectiva es un anticuerpo. El anticuerpo puede ser inmunorreactivo con o bien CRP1 o bien B7RP1 y es preferiblemente inmunorreactivo con B7RP1. Aún en otro aspecto de la descripción, un anticuerpo reactivo con B7RP1 se une a un epítipo en B7RP1 de manera que la unión a CRP1 se bloquea parcial o completamente y al menos una actividad biológica de B7RP1, tal como actividad coestimuladora inmunitaria, se inhibe parcial o completamente. El término parcialmente inhibido significa que se ha producido al menos un nivel detectable de inhibición. El término completamente inhibido significa que no se ha producido aumento adicional en la inhibición.

Pueden usarse polipéptidos CRP1 o B7RP1, fragmentos, variantes y/o derivados para preparar anticuerpos usando métodos conocidos en la técnica. Por tanto, también se contemplan anticuerpos que reaccionan con los polipéptidos B7RP1, así como fragmentos reactivos de tales anticuerpos, como dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, recombinantes, quiméricos, de cadena sencilla y/o biespecíficos. Normalmente, el anticuerpo o fragmento del mismo será o bien de origen humano, o bien estará "humanizado", es decir, preparado de modo que evita o minimiza una reacción inmunitaria frente al anticuerpo cuando se administra a un paciente. El fragmento de anticuerpo puede ser cualquier fragmento que sea reactivo con polipéptidos CRP1 y B7RP1 de la presente invención, tal como, F_{ab} , $F_{ab'}$, etc. También se dan a conocer en el presente documento los híbrdomas generados mediante la presentación de cualquier polipéptido CRP1 o B7RP1 o fragmentos del mismo como antígeno a un mamífero seleccionado, seguido por fusión de las células (por ejemplo, células de bazo) del mamífero con determinadas células cancerosas para crear líneas celulares inmortalizadas mediante técnicas conocidas. Los métodos empleados para generar tales líneas celulares y anticuerpos dirigidos contra todo o partes de un polipéptido CRP1 o B7RP1 humano de la presente invención también se abarcan por esta invención.

Los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idénticas a u homóloga(s) a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81., 6851-6855 (1985)).

En una realización preferida, el anticuerpo anti-CRP1 o B7RP1 quimérico es un anticuerpo "humanizado". Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. La humanización puede realizarse siguiendo métodos conocidos en la técnica (Jones, *et al.*, Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann, *et al.*, Nature, 332, 323-327 (1988); Verhoeyen, *et al.*, Science 239, 1534-1536 (1988)), sustituyendo regiones determinantes de complementariedad (CDR) de ratón por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

También se abarcan por la invención anticuerpos anti-B7RP1 completamente humanos. Tales anticuerpos pueden producirse mediante inmunización con un antígeno CRP1 o B7RP1 de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Véanse, por ejemplo, Jakobovits, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 2551-2555 (1993); Jakobovits, *et al.*, Nature 362, 255-258 (1993). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de presentación en fago (Hoogenboom, *et al.*, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991); Marks, *et al.*, J. Mol. Biol. 222, 581 (1991).

Pueden usarse agentes de unión selectiva de la invención para regular la unión de CRP1 a B7RP1 y regular al menos una actividad biológica mediada por CRP1 y B7RP1 tal como coestimulación inmunitaria. Un ejemplo de tales agentes de unión selectiva son anticuerpos inmunorreactivos con B7RP1. Los anticuerpos pueden usarse terapéuticamente, tal como para inhibir la unión del polipéptido CRP1 y B7RP1 a su pareja de unión. Los anticuerpos pueden usarse además para fines de diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, tal como en forma marcada para detectar la presencia de polipéptido CRP1 y B7RP1 en una muestra de células o fluido corporal.

Composiciones farmacéuticas y administración

Composiciones farmacéuticas de polipéptidos B7RP1 están dentro del alcance de la presente invención. Tales composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o fragmentos, variantes o derivados en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En aspectos preferidos, las composiciones farmacéuticas comprenden polipéptidos B7RP1 como formas solubles que comprenden parte de o todo un dominio extracelular de B7RP1. Normalmente, se administrará un compuesto terapéutico de polipéptido B7RP1 en forma de una composición que comprende polipéptido, fragmento, variante o derivado purificado conjuntamente con uno o más portadores, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. El material portador puede ser agua para inyección, preferiblemente complementada con otros materiales comunes en disoluciones para su administración a mamíferos. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son portadores apropiados a modo de ejemplo. Preferiblemente, el producto se formula como un liofilizado usando excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa). Pueden incluirse otros portadores, diluyentes y excipientes habituales según se desee. Otras composiciones a modo de ejemplo comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo.

Las composiciones farmacéuticas de B7RP1 pueden administrarse por vía parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden administrarse por vía intravenosa o por vía subcutánea. Cuando se administran por vía sistémica, las composiciones terapéuticas para su uso en esta invención pueden estar en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral, libre de pirógenos. La preparación de tales disoluciones de proteínas farmacéuticamente aceptables, con adecuada atención al pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, está dentro de la experiencia de la técnica.

Pueden prepararse formulaciones terapéuticas de composiciones de polipéptido B7RP1 útiles para poner en práctica la presente invención para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990)) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores y preferiblemente son inertes a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

Una cantidad eficaz de una composición/composiciones de polipéptido B7RP1 que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos tales como la indicación para la que está usándose el polipéptido B7RP1, la vía de administración y el estado del paciente. Por consiguiente, será necesario que el terapeuta valore la dosificación y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Normalmente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que logra el efecto deseado. Por tanto, puede administrarse la composición como una única dosis o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de un polipéptido B7RP1) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua por medio de un dispositivo de implantación o catéter.

A medida que se realicen estudios adicionales, surgirá información referente a niveles de dosificación apropiados para el tratamiento de diversos estados en diversos pacientes, y el experto habitual podrá determinar la dosificación apropiada, considerando el contexto terapéutico, el tipo de trastorno en tratamiento, la edad y la salud general del receptor.

La composición de polipéptido B7RP1 que va a usarse para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril. Cuando se liofiliza la composición, puede realizarse la esterilización usando estos métodos o bien antes de, o bien después de, la liofilización y reconstitución. La composición para la administración parenteral se almacenará habitualmente en forma liofilizada o en disolución.

Las composiciones terapéuticas se colocan generalmente en un envase que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de

inyección hipodérmica.

La vía de administración de la composición es acorde con métodos conocidos, por ejemplo oral, inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida o dispositivo de implantación que puede implicar opcionalmente el uso de un catéter. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse de manera continua mediante infusión, inyección en bolo o mediante dispositivo de implantación.

Alternativa o adicionalmente, la composición puede administrarse localmente por medio de implantación en el área afectada de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido polipéptido B7RP1.

Cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de un polipéptido B7RP1 puede ser directamente a través del dispositivo por medio de bolo, o por medio de administración continua, o por medio de catéter usando infusión continua. Puede administrarse un polipéptido B7RP1 en una formulación o preparación de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos U.S. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)), acetato de etilvinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico) (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Eppstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); documentos EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949).

En algunos casos, puede ser deseable usar composiciones de polipéptido B7RP1 de manera *ex vivo*. En este caso, las células, los tejidos o los órganos que se han retirado del paciente se exponen a composiciones de polipéptido B7RP1 tras lo cual se implantan posteriormente las células, los tejidos y/o los órganos de nuevo en el paciente.

En otros casos, puede administrarse un polipéptido B7RP1 mediante implantación en pacientes de determinadas células que se han modificado mediante ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar los polipéptidos, fragmentos, variantes o derivados. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden derivarse del tejido del propio paciente o de otra fuente, o bien humana o bien no humana. Opcionalmente, las células pueden immortalizarse. Sin embargo, con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, se prefiere que las células se encapsulen para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son normalmente envolturas o membranas poliméricas biocompatibles, semi-permeables que permiten la liberación del/de los producto(s) proteicos pero impiden la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Los métodos usados para la encapsulación en membranas de células son familiares para el experto en la técnica, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden lograrse sin excesiva experimentación. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.892.538; 5.011.472; y 5.106.627. Se describe un sistema para encapsular células vivas en el documento PCT WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores liposómicos, perlas o partículas bioerosionables, y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.653.975. Las células, con o sin encapsulación, pueden implantarse en órganos o tejidos corporales adecuados del paciente.

Tal como se comentó anteriormente, puede ser deseable tratar preparaciones celulares con uno o más polipéptidos B7RP1, variantes, derivados y/o fragmentos. Esto puede lograrse exponiendo, por ejemplo, células que comprenden células T, tales como células de médula ósea, al polipéptido, la variante, el derivado o el fragmento directamente, cuando está en una forma que es permeable para la membrana celular. Por ejemplo, pueden exponerse células que comprenden células T a un polipéptido B7RP1 con el fin de activar la función de células T y las células así tratadas se implantan en el paciente.

Alternativamente, puede emplearse terapia génica. Una manera en la que puede aplicarse la terapia génica es usar un gen de B7RP1 (cualquiera de ADN genómico, ADNc y/o ADN sintético que codifican para un polipéptido B7RP1, o un fragmento, una variante o un derivado del mismo) que puede unirse operativamente a un promotor constitutivo o inducible para formar un "constructo de ADN de terapia génica". El promotor puede ser homólogo o heterólogo con respecto al gen de B7RP1 endógeno, siempre que sea activo en el tipo de célula o tejido en el que se insertará el constructo. Otros componentes del constructo de ADN de terapia génica pueden incluir opcionalmente, según se requiera, moléculas de ADN diseñadas para la integración específica de sitio (por ejemplo, secuencias flanqueantes endógenas útiles para la recombinación homóloga), promotor específico de tejido, potenciador(es) o silenciador(es), moléculas de ADN que pueden proporcionar una ventaja selectiva con respecto a la célula original, moléculas de ADN útiles como marcadores para identificar células transformadas, sistemas de selección negativa, agentes de unión específica a células (como, por ejemplo, para direccionamiento celular), factores de internalización específicos

de células y factores de transcripción para potenciar la expresión mediante un vector así como factores para permitir la preparación del vector.

Este constructo de ADN de terapia génica puede introducirse entonces en las células del paciente (o bien *ex vivo* o bien *in vivo*). Un medio para introducir el constructo de ADN de terapia génica es por medio de vectores virales. Los vectores virales adecuados usados normalmente en terapia génica para el suministro de constructos de ADN de terapia génica incluyen, sin limitación, vectores de adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple, lentivirus, virus del papiloma y retrovirus. Algunos de estos vectores, tales como vectores retrovirales, suministrarán el constructo de ADN de terapia génica al ADN cromosómico de las células del paciente, y el constructo de ADN de terapia génica puede integrarse en el ADN cromosómico; otros vectores funcionarán como episomas y el constructo de ADN de terapia génica permanecerá en el citoplasma. El uso de vectores de terapia génica se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.672.344, 5.399.346.

Los medios alternativos para suministrar constructos de ADN de terapia génica a las células de un paciente sin el uso de vectores virales incluyen, sin limitación, transferencia mediada por liposomas, inyección directa de ADN desnudo, transferencia mediada por receptor (complejo ligando-ADN), electroporación, precipitación con fosfato de calcio y bombardeo de micropartículas (por ejemplo, "pistola génica"). Véanse las patentes estadounidenses n.^{os} 4.970.154, WO 96/40958, 5.679.559, 5.676.954 y 5.593.875.

Otros medios para aumentar la expresión de polipéptido B7RP1 endógeno en una célula por medio de terapia génica es insertar uno o más elementos potenciadores en el promotor de polipéptido B7RP1, en los que el/los elemento(s) potenciador(es) puede(n) servir para aumentar la actividad transcripcional de un gen de polipéptido B7RP1. El/los elemento(s) potenciador(es) usado(s) se seleccionará(n) basándose en el tejido en el que se desea activar el/los gen(es); se seleccionarán elementos potenciadores que se sabe que confieren activación del promotor en ese tejido. Por ejemplo, si va a "activarse" un polipéptido B7RP1 en células T, puede usarse el elemento potenciador del promotor Ick. En este caso, la parte funcional del elemento transcripcional que va a añadirse puede insertarse en un fragmento de ADN que contiene un promotor de polipéptido B7RP1 (y opcionalmente, vector, secuencia flanqueante en 5' y/o 3', etc.) usando técnicas de clonación convencionales. Este constructo, conocido como "constructo de recombinación homóloga" puede introducirse entonces en las células deseadas o bien *ex vivo* o bien *in vivo*.

Puede usarse terapia génica para disminuir la expresión de polipéptido B7RP1 modificando la secuencia de nucleótidos del/de los promotor(es) endógeno(s). Tal modificación se logra normalmente por medio de métodos de recombinación homóloga. Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene todo o una parte del promotor de un gen/genes de B7RP1 seleccionado(s) para su inactivación puede modificarse mediante ingeniería genética para eliminar y/o sustituir trozos del promotor que regulan la transcripción. En este caso, la caja TATA y/o el sitio de unión de un activador transcripcional del promotor pueden delecionarse usando técnicas de biología molecular convencionales; tal delección puede inhibir la actividad del promotor reprimiendo de ese modo la transcripción del gen de B7RP1 correspondiente. La delección de la caja TATA o el sitio de unión del activador transcripcional en el promotor puede lograrse generando un constructo de ADN que comprende todo o la parte relevante de un promotor/promotores de polipéptido B7RP1 (de la misma o de una especie relacionada que un gen/genes de B7RP1 que va(n) a regularse) en el que uno o más de los nucleótidos de la caja TATA y/o del sitio de unión del activador transcripcional se mutan por medio de sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótidos de modo que la caja TATA y/o el sitio de unión del activador tiene actividad disminuida o se vuelve completamente inactivo. Este constructo, que normalmente también contendrá al menos aproximadamente 500 bases de ADN que se corresponden con las regiones flanqueantes en 5' y 3' nativas (endógenas) del segmento del promotor que se ha modificado, puede introducirse en las células apropiadas (o bien *ex vivo* o bien *in vivo*) o bien directamente o bien por medio de un vector viral tal como se describió anteriormente. La integración del constructo en el ADN genómico de las células será normalmente por medio de recombinación homóloga, en la que las secuencias de ADN flanqueantes en 5' y 3' en el constructo de promotor pueden servir para ayudar a integrar la región de promotor modificada por medio de hibridación en el ADN cromosómico endógeno.

También pueden emplearse otros métodos de terapia génica en los que es deseable inhibir uno o más polipéptidos B7RP1. Por ejemplo, pueden introducirse moléculas de ADN o ARN antisentido, que tienen una secuencia que es complementaria a al menos una parte de un gen/genes seleccionado(s) de polipéptido B7RP1 en la célula. Normalmente, cada una de tales moléculas antisentido será complementaria al sitio de iniciación (extremo 5') de cada gen de B7RP1 seleccionado. Cuando la molécula antisentido se hibrida entonces con el ARNm de polipéptido B7RP1 correspondiente, se impide la traducción de este ARNm.

Alternativamente, puede emplearse terapia génica para crear un inhibidor dominante negativo de uno o más polipéptidos B7RP1. En esta situación, el ADN que codifica para un polipéptido truncado o de longitud completa mutante de cada polipéptido B7RP1 seleccionado puede prepararse e introducirse en las células de un paciente usando métodos o bien virales o bien no virales tal como se describió anteriormente. Cada uno de tales mutantes se diseña normalmente para competir con el polipéptido endógeno en su papel biológico.

Agonistas y antagonistas

La presente descripción también proporciona agonistas y antagonistas de CRP1 o B7RP1 que regulan la actividad de cualquiera o ambas moléculas. Pueden identificarse agonistas y antagonistas a partir de moléculas de prueba que alteran la unión de B7RP1 a CRP1.

El término "molécula(s) de prueba" se refiere a la(s) molécula(s) que está(n) en evaluación para determinar su capacidad para unirse a un polipéptido CRP1 o B7RP1 y de ese modo alterar la unión de B7RP1 a CRP1. Preferiblemente, la molécula de prueba se unirá con una constante de afinidad de al menos aproximadamente 10^6 M.

Puede usarse una variedad de ensayos para medir la unión de B7RP1 a CRP1. Estos ensayos pueden usarse para examinar moléculas de prueba para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la tasa o el grado de unión de B7RP1 a CRP1. En un tipo de ensayo, un polipéptido CRP1, preferiblemente una forma soluble de CRP1 tal como un dominio extracelular, se inmoviliza mediante unión al fondo de los pocillos de una placa de microtitulación. Entonces pueden añadirse B7RP1 radiomarcado y la(s) molécula(s) de prueba o bien uno cada vez (en cualquier orden) o bien simultáneamente a los pocillos. Tras la incubación, pueden lavarse los pocillos y contarse usando un contador de centelleo para determinar la radioactividad para determinar el grado de unión a proteína CRP1 por B7RP1. Normalmente, las moléculas se someterán a prueba a lo largo de un intervalo de concentraciones, y puede usarse una serie de pocillos de control que carecen de uno o más elementos de los ensayos de prueba para determinar la precisión en la evaluación de los resultados. Una alternativa a este método implica invertir las "posiciones" de las proteínas, es decir, inmovilizar B7RP1 en los pocillos de la placa de microtitulación, incubarlo con la molécula de prueba y CRP1 radiomarcada y determinar el grado de unión de CRP1 (véase, por ejemplo, el capítulo 18 de *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Nueva York, NY [1995]).

Como alternativa al radiomarcaje, pueden conjugarse CRP1 o B7RP1 con biotina y puede detectarse entonces la presencia de proteína biotinilada usando estreptavidina unida a una enzima, tal como peroxidasa del rábano [HRP] o fosfatasa alcalina [AP], que pueden detectarse colorimétricamente o mediante etiquetado fluorescente de estreptavidina. También puede usarse un anticuerpo dirigido frente a CRP1 o B7RP1 que está conjugado con biotina y puede detectarse tras la incubación con estreptavidina unida a enzima unida a AP o HRP.

También pueden inmovilizarse CRP1 y B7RP1 mediante unión a perlas de agarosa, perlas acrílicas u otros tipos de tales sustratos inertes. Puede ponerse el complejo de sustrato-proteína en una disolución que contiene la proteína complementaria y el compuesto de prueba; tras la incubación, pueden precipitarse las perlas mediante centrifugación y puede evaluarse la cantidad de unión entre CRP1 y B7RP1 usando los métodos descritos anteriormente. Alternativamente, puede inmovilizarse el complejo sustrato-proteína en una columna y hacerse pasar la molécula de prueba y la proteína complementaria a lo largo de la columna. Entonces puede evaluarse la formación de un complejo entre CRP1 y B7RP1 usando cualquiera de las técnicas expuestas anteriormente, es decir, radiomarcaje, unión a anticuerpos, o similares.

Otro tipo de ensayo *in vitro* que es útil para identificar una molécula de prueba que aumenta o disminuye la formación de un complejo CRP1/B7RP1 es un sistema de detector de resonancia de plasmones superficiales tal como el sistema de ensayo Biacore (Pharmacia, Piscataway, NJ). El sistema Biacore puede llevarse a cabo usando el protocolo del fabricante. Este ensayo implica esencialmente la unión covalente de o bien CRP1 o bien B7RP1 a un chip sensor recubierto con dextrano que se coloca en un detector. El compuesto de prueba y la otra proteína complementaria pueden inyectarse entonces en la cámara que contiene el chip sensor o bien simultáneamente o bien secuencialmente y puede evaluarse la cantidad de proteína complementaria que se une basándose en el cambio en la masa molecular que se asocia físicamente con el lado recubierto con dextrano del chip sensor; puede medirse el cambio en la masa molecular mediante el sistema detector.

En algunos casos, puede ser deseable evaluar dos o más compuestos de prueba juntos para su uso en el aumento o la disminución de la formación de un complejo CRP1/B7RP1. En estos casos, los ensayos expuestos anteriormente pueden modificarse fácilmente añadiendo tal/tales compuesto(s) de prueba adicional(es) o bien simultáneamente con, o bien posteriormente a, el primer compuesto de prueba. El resto de las etapas en el ensayo son tal como se expuso anteriormente.

Pueden usarse ventajosamente ensayos *in vitro* tales como los descritos anteriormente para examinar rápidamente grandes números de compuestos para determinar efectos sobre la formación de complejos por CRP1 y B7RP1. Los ensayos pueden automatizarse para examinar compuestos generados en bibliotecas de presentación en fago, de péptidos sintéticos y de síntesis química.

También pueden examinarse compuestos que aumentan o disminuyen la formación de complejos de CRP1 y B7RP1 en cultivo celular usando células y líneas celulares que expresan cualquier polipéptido. Pueden obtenerse células y líneas celulares de cualquier mamífero, pero preferiblemente serán de fuentes de ser humano u otro primate, caninas o de roedor. La unión de B7RP1 a células que expresan CRP1 en la superficie se evalúa en presencia o ausencia de moléculas de prueba y puede determinarse el grado de unión mediante, por ejemplo, citometría de flujo usando un anticuerpo biotinilado frente a B7RP1. Pueden usarse ensayos de cultivo celular ventajosamente para evaluar adicionalmente compuestos de puntuación positiva en ensayos de unión a proteínas descritos

anteriormente.

Usos terapéuticos

Los polipéptidos de la invención, y agonistas y antagonistas de los mismos, pueden usarse para regular la función de células T. Los agonistas y antagonistas incluyen aquellas moléculas que regulan la actividad de CRP1 y/o B7RP1 y o bien aumentan o bien disminuyen al menos una actividad de una proteína CRP1 o B7RP1 tal como una actividad asociada con funciones de células T, por ejemplo, activación de células T. Los agonistas o antagonistas pueden ser cofactores, tales como una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido o una molécula de peso molecular pequeño, que interaccionan con o bien CRP1 o bien B7RP1 y de ese modo regulan su actividad. Los posibles agonistas o antagonistas de polipéptidos incluyen anticuerpos que reaccionan con formas o bien solubles o bien unidas a membrana de CRP1 o B7RP1 que comprenden parte de o todos los dominios extracelulares de dichas proteínas. Las moléculas que regulan la expresión de CRP1 o B7RP1 incluyen normalmente ácidos nucleicos que codifican para proteína CRP1 o B7RP1 que pueden actuar como reguladores antisentido de la expresión.

Pueden usarse polipéptidos CRP1 o B7RP1, y agonistas y antagonistas de los mismos, en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, supervivencia a injerto, activación de células inmunitarias para inhibir el crecimiento de células tumorales, enfermedades mediadas por células B dependientes de células T e inmunoterapia génica contra el cáncer. En una realización, los antagonistas o inhibidores de la función de CRP1 y/o B7RP1 pueden ser beneficiosos para aliviar síntomas en enfermedades con disfunción de células inmunitarias crónica. Pueden tratarse enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) y psoriasis, con antagonistas o inhibidores de CRP-1/B7RP-1. Además, también pueden tratarse enfermedades inflamatorias crónicas, tales como enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto y diabetes mellitus con inhibidores para CRP-1/B7RP-1. Tal como se describe en el ejemplo 18, CRP-1-Fc inhibe y B7RP-1-Fc potencia, la aparición de enfermedad en un modelo de enfermedad de artritis reumatoide de roedor. Estos efectos opuestos en este modelo apoyan un papel agonista para la proteína B7RP-1-Fc y un papel antagonista para la proteína CRP-1-Fc. Los resultados también ilustran cómo pueden regularse las respuestas de células T mediante manipulación de esta ruta y la importancia de esta ruta en la progresión de artritis reumatoide. Además, tal como se describe en el ejemplo 19, la expresión de B7RP-1-Fc *in vivo* estimula un fenotipo de enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en ratones transgénicos. Este ejemplo apoya el papel de B7RP-1/CRP-1 en el desarrollo de inflamación en el intestino. Por tanto, pueden usarse antagonistas de la ruta de B7RP-1/CRP-1 para tratar EII humana.

Pueden usarse antagonistas de CRP1 o B7RP1 como agentes inmunosupresores para trasplante de médula ósea y órganos y pueden usarse para prolongar la supervivencia del injerto. Tales antagonistas pueden proporcionar ventajas significativas con respecto al tratamiento existente. La terapia de trasplante de médula ósea y órganos debe lidiar con el rechazo mediado por células T del tejido o las células foráneas por el huésped. Los regímenes terapéuticos actuales para inhibir el rechazo mediado por células T implican tratamiento con los fármacos ciclosporina o FK506. Aunque los fármacos son eficaces, los pacientes padecen graves efectos secundarios, incluyendo hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad. La diana para la clase de ciclosporina/FK506 de compuestos terapéuticos es calcineurina, una fosfatasa con expresión ubicua. Puesto que la expresión de CRP1 está restringida a células T, los inhibidores de CRP1 o B7RP1 pueden carecer de los graves efectos secundarios observados con el uso de los agentes inmunoterapéuticos actuales.

Pueden usarse antagonistas de CRP1 o B7RP1 como agentes inmunosupresores para trastornos autoinmunitarios, tales como artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, diabetes y lupus eritematoso sistémico.

También pueden usarse antagonistas de la ruta coestimuladora mediada por CRP1/B7RP1 para aliviar síndrome de choque tóxico, enfermedad inflamatoria del intestino, alosensibilización debida a transfusiones de sangre, enfermedades mediadas por células B dependientes de células T y el tratamiento de enfermedad de injerto contra huésped.

Pueden usarse anticuerpos, proteínas solubles que comprenden por ejemplo dominios extracelulares y otros reguladores de CRP1 o B7RP1 que dan como resultado activación de células T prolongada o potenciada para aumentar la respuesta inmunitaria frente a tumores. El ejemplo 20 muestra que B7RP-1-Fc puede inhibir el crecimiento de células tumorales en ratones. De manera similar, pueden usarse B7RP-1-Fc humana, u otros activadores de la ruta de B7RP-1/CRP-1, para potenciar respuestas inmunitarias contra tumores humanos. Generalmente se considera que la actividad antitumoral tiene un componente de linfocitos T citolíticos fuerte. De hecho, los efectos antitumorales de proteínas de fusión B7-Fc (Sturmhoefel *et al.*, Cancer Res. 59: 4964-4972, 1999) estaban mediados por células T CD8+ citolíticas. Puesto que CRP-1 también se expresa en células T CD8+ citolíticas (ejemplo 9), es probable que los efectos antitumorales demostrados en el ejemplo 20 se debieran a la acción de B7RP-1-Fc sobre células CD8+. La ruta de B7RP-1/CRP-1 también puede manipularse para regular la respuesta de CTL en varios otros entornos clínicos, incluyendo trasplante de aloinjerto, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedades autoinmunitarias.

Puede usarse terapia génica usando genes de B7RP1 de la invención en inmunoterapia contra el cáncer. Los genes de B7RP1 introducidos en células cancerosas pueden transformarlas en células presentadoras de antígeno que

pueden reconocerse por las células T del sistema inmunitario cuando vuelven a introducirse en un animal. El reconocimiento de las células tumorales transfectadas por las células T da como resultado la erradicación de las células tumorales tanto que expresan como que no expresan, el gen de B7RP1. Este enfoque de inmunoterapia puede usarse para diversas leucemias, sarcomas, melanomas, adenocarcinomas, carcinomas de mama, tumores de próstata, carcinomas de pulmón, carcinomas de colon y otros tumores. Esta invención abarca el uso del gen de B7RP1 de manera similar para potenciar la activación de células T en respuesta a una variedad de tumores.

Tal como se describe en el ejemplo 14, el fenotipo de ratones transgénicos que expresan B7RP1 indica que B7RP1 es importante en el control de la producción de anticuerpos. Los agonistas y antagonistas de la actividad de la proteína B7RP1 pueden ser útiles en indicaciones terapéuticas que requieren la inhibición o potenciación de la producción de anticuerpos.

Por ejemplo, muchas vacunas actúan provocando una respuesta de anticuerpos eficaz y específica. Algunas vacunas, especialmente aquellas contra microorganismos intestinales (por ejemplo virus de la hepatitis A y salmonelas), provocan una respuesta de anticuerpos de vida corta. Es deseable potenciar y prolongar esta respuesta con el fin de aumentar la eficacia de la vacuna. Por tanto, B7RP1 soluble o anticuerpos activantes frente a CRP1 pueden servir como adyuvante de vacuna.

También pueden potenciarse respuestas antivirales mediante activadores o agonistas de la ruta de B7RP-1/CRP-1. Los datos en el ejemplo 20 indican que se potencia la inmunidad celular mediante B7RP-1-Fc. La potenciación de funciones inmunitarias celulares mediante B7RP-1-Fc, u otros activadores de la ruta de B7RP-1/CRP-1, también puede ser beneficiosa en la eliminación de células infectadas por virus. De un modo complementario, B7RP-1-Fc tiene efectos sobre funciones inmunitarias humores que pueden potenciar respuestas mediadas por anticuerpos tal como se observa en el ejemplo 13 que pueden funcionar para ayudar a aclarar el virus libre del organismo.

A la inversa, existen varios estados clínicos que mejorarían mediante la inhibición de la producción de anticuerpos. La hipersensibilidad es una respuesta inmunitaria normalmente beneficiosa que es exagerada o inapropiada, y conduce a reacciones inflamatorias y daño tisular. Las reacciones de hipersensibilidad que están mediadas por anticuerpos pueden ser particularmente susceptibles a antagonismo mediante inhibidores de la actividad de B7RP1. Alergias, rinitis polínica, asma y edema agudo provocan reacciones de hipersensibilidad de tipo I, y estas reacciones pueden suprimirse mediante inhibidores de proteína, anticuerpo o molécula pequeña de la actividad de B7RP1.

Las enfermedades que provocan reacciones de hipersensibilidad mediadas por anticuerpos, incluyendo lupus eritematoso sistémico, artritis (artritis reumatoide, artritis reactiva, artritis psoriásica), nefropatías (glomerulonefritis, membranosa, mesangiocapilar, focal y segmentaria, necrotizante focal, crescénica, proliferativa - tubulopatías), trastornos cutáneos (pénfigo y penfigoide, eritema nudoso), endocrinopatías (tiroiditis, de Grave, de Hashimoto, diabetes mellitus insulino dependiente), diversas neumopatías (especialmente alveolitis extrínseca), diversas vasculopatías, enfermedad celiaca, con producción aberrante de IgA, muchas anemias y trombocitopenias, síndrome de Guillain-Barre y miastenia grave, pueden tratarse con antagonistas de B7RP1.

Además, pueden inhibirse trastornos linfoproliferativos, tales como mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y crioglobulinemias, mediante antagonistas de proteína, anticuerpo o molécula pequeña de B7RP1.

Finalmente, la enfermedad de injerto contra huésped, un trastorno inmunitario "artificial", puede beneficiarse de la inhibición de la producción de anticuerpos mediante antagonistas de B7RP1.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar más completamente la invención, pero no se considera que limiten el alcance de la misma.

Ejemplo 1

Secuencia de aminoácidos y de ADNc de CRP1

Se sacrificaron ratones C57/Black 6 hembra, y se extirparon los intestinos delgados y se separaron los parches de Peyer. Se abrió mediante corte el tejido del intestino delgado y se lavó para eliminar la mucosidad y otros residuos. Se liberó la capa epitelial, que contiene las células intraepiteliales intestinales (iIEL), mediante agitación suave en RPMI-1640 complementado con diotretol 1 mM (DTT), durante 20 minutos a 37°C. Se hicieron pasar células disociadas a través de un filtro de 100 μ , se lavaron en 50 ml de RPMI-1640, se mezclaron para romper adicionalmente los grumos de células y entonces se hicieron pasar a través de un cedazo de 40 μ para obtener poblaciones de células individuales. Entonces se lavaron de nuevo estas células en un volumen de 50 ml de RPMI-1640 para garantizar la eliminación del DTT residual. Entonces se agitó el tejido y se lavó como anteriormente para reunir las iIEL restantes. Se separaron las iIEL de las células adiposas y la mayoría de las células epiteliales en un gradiente de Percol de 3 etapas, formando una banda las iIEL en la superficie de contacto del 40% al 80%. Entonces se lavaron estas células dos veces con RPMI-1640 para eliminar trazas de Percol, se inmunotifieron con anticuerpos frente a CD103 (integrina alfa IEL) y se separaron en un clasificador celular FACs Star. Entonces se usaron estas células clasificadas para preparar ARN total directamente usando Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), o se activaron durante la noche sobre anticuerpos activantes unidos a placas, que reticulan el TCR gamma/delta, TCR alfa/beta o CD3. Se preparó el ARN como anteriormente y se agrupó para su uso en la construcción de bibliotecas

de ADNc de EST.

Un clon de ADNc, designado smil2-00082-al, contenía homología de secuencia de nucleótidos con CD28 (figura 1B). La traducción de la secuencia y la posterior comparación con proteínas conocidas en una base de datos pública revelaron un 19% de identidad de aminoácidos con CD28 murina (figura 1B). Esta baja homología era significativa porque CD28 murina comparte sólo un 26% de identidad de aminoácidos con CTLA-4 murina. Se encontró que todas las supuestas cisteínas que se pensaba que eran críticas para uniones de cisteína intra e intermoleculares en la familia de CD28/CTLA-4 estaban conservadas (residuos de aminoácido 83, 109 y 137; en relación con la metionina de iniciación). Además, la longitud global del marco de lectura abierto supuesto y la posición relativa del dominio transmembrana eran similares a las de tanto CD28 como CTLA-4. Se nombró el gen CRP1, para proteína 1 relacionada con CD28.

Ejemplo 2

Clonación de ADNc de CRP1 humana

Se identifica la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína CRP1 humana mediante los siguientes procedimientos. Se preparó una biblioteca de ADNc humano a partir de linfocitos enriquecidos de sangre humana periférica de voluntarios humanos normales. Se purificaron los linfocitos y se eliminaron los glóbulos rojos mediante medios de separación de linfocitos (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA). Entonces se activaron las células durante la noche en medios que contenían PMA 10 ng/ml, ionomicina 500 ng/ml y anticuerpos activantes unidos a placas frente a CD3. Se preparó ARN total a partir de las células activadas mediante el método de Trizol (Gibco/BRL) y se aisló ARN de poli A mediante purificación con perlas Dynal. Se preparó ADNc a partir del ARN de poli A aislado y se seleccionó el tamaño para los fragmentos de ADNc más grandes. Entonces se ligó el ADNc de tamaño seleccionado en el plásmido pSPORT (Gibco/BRL). Se obtiene ADN que codifica para la proteína CRP1 humana examinando la biblioteca de ADNc de linfocitos activados mediante protocolos de hibridación de o bien placas de bacteriófagos recombinantes o bien colonias de bacterias transformadas (Sambrook *et al.* Citado anteriormente). Se examina la biblioteca de ADNc de fagos o plásmidos usando sondas marcadas radiactivamente derivadas del clon del gen de CRP1 murina tal como se describe en el ejemplo 1 y la figura 1. Se usan las sondas para examinar filtros de nailon obtenidos por levantamiento a partir de la biblioteca sembrada en placas. Se hibridan previamente estos filtros durante 4 h a 42°C en formamida al 50%, 5X SSPE, 2X solución de Denhardt, SDS al 0,5% y ADN de esperma de salmón 100 µg/ml y luego se hibridan durante 24 h a 42°C en formamida al 50%, 5X SSPE, 2X solución de Denhardt, SDS al 0,5%, ADN de esperma de salmón 100 µg/ml y sonda mB7RP1 5 ng/ml. Se lavan las transferencias en 2X SSC, SDS al 0,1% durante 10 min. a TA, 1X SSC, SDS al 0,1% durante 10 min. a 50°C, 0,2X SSC, SDS al 0,1% durante 10 min. a 50°C, luego 0,2X SSC durante 10 min. a 50°C de nuevo. Se secuencian los insertos obtenidos a partir de cualquier clon de CRP1 humana y se analizan tal como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

Secuencia de aminoácidos y ADN de B7RP1

Un clon de ADNc, designado smi11-00003-g5, contenía homología de secuencia de nucleótidos con B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86). La traducción de la secuencia (figura 2A) y la posterior comparación con proteínas conocidas en una base de datos pública revelaron un 20% de identidad de aminoácidos con B7.1 murina (figura 2B). Esta baja homología era significativa porque B7.1 murina comparte sólo un 24% de identidad de aminoácidos con B7.2 murina. A pesar de esta baja homología, se conservan residuos de cisteína críticos entre el marco de lectura abierto de este clon y B7.1 y B7.2 murinas en los residuos 62, 138, 185 y 242 (en relación con la metionina de iniciación, figura 2B). La longitud de la proteína madura aproximada y la ubicación de la región transmembrana en relación con el extremo carboxilo-terminal son también similares en el ORF supuesto de este clon, en comparación con B7.1 y B7.2. Se nombró el gen B7RP1, para proteína 1 relacionada con B7.

Ejemplo 4

Clonación de ADNc de B7RP1 humana

Una búsqueda de homología Blast en Genbank (GCG, University of Wisconsin) usando la secuencia de B7RP1 murina (véase la figura 2) recuperó un clon (AB014553) que contenía una secuencia de 4358 pb con 1679 pb de ORF. Se diseñaron cebadores de clonación de PCR según esta secuencia. Se obtuvo un fragmento de ADN de 1313 pb mediante RACE en 5' y 3' usando ADNc de ganglios linfáticos humanos Marathon-Ready™ (Clontech, Palo Alto, CA) según los procedimientos recomendados por el fabricante.

Cebadores usados para B7RP1 humana de longitud completa:

2083-75 ACC ATG CGG CTG GGC AGT CCT GGA
(SEQ ID NO: 25)

2083-76 TGG TGA CCT ACC ACA TCC CAC AG
(SEQ ID NO: 26)

2083-77 TCC GAT GTC ATT TCC TGT CTG GC
(SEQ ID NO: 27)

5 2083-78 GCT CTG TCT CCG GAC TCA CAG CCC
(SEQ ID NO: 28)

2113-29 GTG GCA GCA AAC TTC AGC GTG CCC GTC G
(SEQ ID NO: 29)

2113-30 CCC AAC GTG TAC TGG ATC AAT AAG ACG G
(SEQ ID NO: 30)

10 2113-31 GCG TGC TGA GGA TCG CAC GGA CCC CCA G
(SEQ ID NO: 31)

Se usaron los cebadores 2083-75 y 2083-76 para amplificar el extremo 5' del gen usando protocolos de RACE. Se usaron los cebadores 2083-77, 2083-78, 2113-29, 2113-30 y 2113-31, para amplificar el extremo 3' del gen usando protocolos de RACE.

La secuencia de nucleótidos resultantes contenía un ORF de 288 residuos de aminoácido que comenzaba en la metionina. Entonces se comparó la secuencia de aminoácidos de B7RP1 humana madura predicha con la secuencia de aminoácidos de B7RP1 de ratón madura (figura 3B) y se encontró que compartían un 48% de identidad de aminoácidos. Esta homología es significativa porque la homología entre especies es baja con el gen de CD80 (B7.1), de hecho, CD80 humana y de ratón comparten sólo un 41% de identidad de aminoácidos. De manera importante, la proteína B7RP1 humana conserva residuos de cisteína críticos necesarios para estructuras de bucles de Ig (residuos de aminoácido 16, 92, 138, 194 y 195, en relación con la proteína madura, figura 3B). Además, la longitud global y la posición del dominio transmembrana concuerdan con un homólogo de B7RP1 humana.

Ejemplo 5

Expresión de ARN de B7RP1

Hibridación *in situ* de ARN usando sondas de ARN para el gen de B7RP1. Se fijaron tejidos de ratón adulto en paraformaldehído al 4%, se incrustaron en parafina y se cortaron a 5 µm. Antes de la hibridación *in situ*, se permeabilizaron los tejidos con HCL 0,2 M, seguido por digestión con proteinasa K, y acetilación con trietanolamina y anhídrido acético. Se hibridaron las secciones durante la noche a 55°C con una ribosonda marcada con ³³P de 969 bases correspondiente a los nucleótidos 1 a 969 de la secuencia de B7RP1 de ratón. Se eliminó la sonda en exceso mediante digestión con ARNasa, seguido por una serie de lavados en tampón con concentraciones de sal decrecientes, y luego un lavado de alta rigurosidad en 0,1X SSC a 55°C. Se mojaron los portaobjetos en emulsión NTB2 de Kodak, se expusieron a 4°C durante 2-3 semanas, se revelaron y se contratiñeron con hematoxilina y eosina. Se examinaron las secciones con campo oscuro e iluminación con luz transmitida para permitir la evaluación simultánea de la morfología tisular y la señal de hibridación.

El análisis del ARN de B7RP1 mediante hibridación *in situ* mostró que el ARN de B7RP1 se expresaba altamente en zonas de maduración linfóide y activación de linfocitos. Se expresaba ARN de B7RP1 en los tejidos linfoides del timo, parches de Peyer del intestino, bazo y ganglios linfáticos. La expresión dentro de estos tejidos linfoides demostró que el ARN de B7RP1 se expresaba generalmente en las zonas de implicación de células B y otras CPA. Estas regiones incluyen la zona de la médula del timo, los folículos primarios de los ganglios linfáticos, y las regiones folicular y de cúpula de los parches de Peyer. La expresión de ARN de B7RP1 es altamente específica para las regiones de implicación de CPA en tejidos linfoides. El análisis de varios tejidos no linfoides también reveló expresión de B7RP1 en regiones de implicación de CPA. En el pulmón, se encontró expresión de B7RP1 en las regiones submucosas, lo que concuerda con una función en el procesamiento de antígenos. En el intestino delgado, se encontró ARN de B7RP1 en la lámina propia. De manera notable, se encontró una sección de hígado dañado, que mostraba infiltración de linfocitos que se solapaba con la expresión de ARN de B7RP1. Esta coincidencia de expresión de B7RP1 con acumulación de linfocitos en respuesta a daño tisular indica fuertemente que B7RP1 está implicada en la activación de linfocitos.

Ejemplo 6

Expresión de ARN de CRP1

Hibridación *in situ* de ARN usando sondas de ARN para el gen de CRP1. Se prepararon tejidos de ratón como en el ejemplo 5. La permeabilización del tejido, la hibridación de las sondas, el tratamiento de los portaobjetos y la tinción de los tejidos fueron tal como se describe en el ejemplo 5. Se hibridaron secciones durante la noche a 55°C con una ribosonda marcada con ³³P de 603 bases correspondiente a los nucleótidos 1 a 603 de la secuencia de CRP1 de ratón. Se examinaron las secciones con campo oscuro e iluminación con luz transmitida para permitir la evaluación simultánea de la morfología tisular y la señal de hibridación.

Se extirparon ganglios linfáticos de ratones normales o un ratón tratado con oxazolona y se analizaron para determinar la expresión de ARN de CRP1. El ganglio linfático de ratón sensibilizado mostraba mayor expresión de ARN de CRP1 que el ganglio linfático de ratón normal. La expresión de CRP1 era en la paracorteza, una región de actividad de células T. Por tanto, la expresión de ARN de CRP1 concuerda con la expresión de linfocitos T y se regula por incremento tras la activación de células T.

Ejemplo 7

Expresión y purificación de proteínas de fusión CRP1-Fc y B7RP1-Fc

Para construir el vector de expresión de ADN para la proteína de fusión CRP1-Fc, se fusionó la secuencia codificante para los primeros 147 aminoácidos amino-terminales del CRP1, en marco, con la secuencia codificante para los 235 aminoácidos carboxilo-terminales del gen de Fc humano (isotipo IgG1) y se ligaron dentro de la secuencia de poliligador de pcDNA3 (pcDNA3/CRP1-Fc). Para construir el vector de expresión de ADN para la proteína de fusión B7RP1-Fc, se fusionó la secuencia codificante para los primeros 269 aminoácidos amino-terminales de la B7RP1, en marco, con la secuencia codificante para los 235 aminoácidos carboxilo-terminales del gen de Fc humano (isotipo IgG1) y se ligaron dentro de la secuencia de poliligador de pcDNA3 (pcDNA3/B7RP1-Fc). Las secuencias codificantes de tanto CRP1 como B7RP1 contenían secuencias del extremo N-terminal de cada proteína hasta, pero no incluyendo, la región transmembrana supuesta de cada proteína. Se transfectaron células 293T con o bien pcDNA3/CRP1-Fc o bien pcDNA3/B7RP1-Fc usando el reactivo de transfección FuGene 6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Tras cuatro días, se recogieron los medios condicionados y se purificaron las proteínas de fusión de Fc mediante cromatografía discontinua usando proteína A Sepharose (Pharmacia). Se eluyeron las proteínas de fusión de Fc unidas a la columna con tres volúmenes de columna de tampón de elución Immunopure Gentle (Pierce), y entonces se dializaron frente a 150 volúmenes de HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5. Se concentró la proteína dializada usando concentrados centrífugos Macrosep, MWCO de 30 kD (Pall Filtron), y se calcularon las concentraciones de proteína usando coeficientes de extinción derivados de la secuencia de aminoácidos de cada proteína. Se muestra la expresión de la proteína de fusión CRP1-Fc en la figura 4A, se muestra la expresión de la proteína de fusión B7CPR1-Fc en la figura 4B.

Ejemplo 8

Identificación de CRP1 y B7RP1 como pareja de receptor-ligando

Con el fin de determinar si las proteínas novedosas eran parte de la misma ruta coestimuladora que la que contiene CD28, CTLA-4, B7.1 y B7.2, se utilizó un ensayo de presentación en la superficie celular. Este ensayo usa análisis ACAS (análisis y clasificación de células adherentes) para analizar si proteínas unidas a la membrana expresadas en células interaccionan con diversas proteínas de fusión de Fc. Se incubaron células que expresaban proteínas unidas a la membrana, indicadas en el lado izquierdo de la figura 5, con proteínas de fusión de Fc, indicadas en la parte superior de la figura.

Se sembraron en placa células Cos-7, hechas crecer en medios DMEM con FBS al 10%, a 500.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Se transfectaron las células usando el reactivo FuGene 6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Para cada transfección, se añadieron 3 µl de reactivo FuGene 6 a 47 µl de medio DMEM libre de suero. Tras una incubación de 10 min. a temperatura ambiente, se añadió la mezcla a 0,25 µg de plásmido gota a gota y entonces se incubó durante 15 minutos. Entonces se añadió la mezcla anterior a las células con 0,5 ml de DMEM con FBS al 10%. Se incubaron las células a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. Como control, se sembraron en placa también células CHO D, transfectadas de manera estable con un plásmido de expresión que contenía el ADNc para CD28 humana, a 500.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos.

Tras 48 h, se eliminó el medio con reactivo de transfección y se lavaron las células dos veces con RPMI más FBS al 5%. Se añadieron de 10 a 20 ng de proteínas de fusión de Fc purificadas en 1 ml de medio a las células, que se incubaron durante 30 min. sobre hielo. Se lavaron las células tres veces con RPMI más FBS al 5% y entonces se incubaron con 2 µl de anticuerpo anti-Fc humano conjugado con FITC (1 mg/ml) durante otros 30 min. sobre hielo. Tras tres lavados sucesivos con RPMI, se cubrieron las células con 250 µl de medio RPMI sin rojo fenol para el análisis ACAS.

El análisis ACAS de las células que se unían a las diversas proteínas de fusión de Fc demostró que la proteína B7RP1 se unía a CRP1, pero no a las proteínas en la ruta coestimuladora conocida, CD28 o CTLA-4. A la inversa, CRP1 interaccionaba con B7RP1, pero no con B7.2, un componente en la ruta conocida. (Véase la figura 5). Estos resultados indican fuertemente que CRP1 y B7RP1 representan una pareja de receptor-ligando novedosa, análoga a

CD28 y B7.2. Sin embargo, puesto que CRP1 y B7RP1 no interaccionan con B7.2, CTLA-4 o CD28, están separadas y son independientes de la ruta coestimuladora conocida.

Ejemplo 9

Identificación de células que expresan receptores de B7RP1

- 5 Se utilizó la proteína de fusión B7RP1-Fc para detectar células que expresaban receptores para B7RP1, presumiblemente incluyendo la proteína CRP1 (véase el ejemplo 6), mediante análisis de FACS. Se extrajeron bazo de ratones C57/Black 6 hembra, se trituraron sobre filtros de malla de 100 micrómetros para liberar los linfocitos, se hicieron pasar a través de filtros de 70 micrómetros y entonces se lavaron en 50 ml de RPMI-1640. Se sedimentaron a 1500 rpm, se resuspendieron en RPMI nuevo, se mezclaron para romper los grumos de células y se
- 10 hicieron pasar a través de un filtro de 40 micrómetros. Se sembraron las células T que iban a activarse en placas de 6 pocillos en RPMI-1640, FBS al 5%, 1XPSG, PMA, ionomicina, y se incubaron a 37°C, el 5% de CO₂ durante la noche. Se comprobó la activación de células T mediante confirmación visual tras 12 h.

- Se lavaron células de bazo activadas para la inmunotinción en tampón de lavado de PBS, BSA al 0,5% (Path-o-cyte 4, ICN Pharmaceuticals), se resuspendieron y entonces se alicuotaron en volúmenes de 100 µl. Se añadieron 15 µg/ml de o bien la proteína de fusión CRP1-Fc o bien la proteína de fusión B7RP1-Fc (1,5 µg/muestra) según fuese apropiado, y entonces se incubaron las mezclas sobre hielo durante 30 min. con mezclado ocasional. Se lavaron las células dos veces en 5,0 ml de tampón de lavado. Se visualizó la unión de las proteínas de fusión con 2 µg de anticuerpo secundario de cabra conjugado anti-ser humano (GaHuFc-FITC) en un volumen de 100 µl para cada tinción celular. Se añadieron anticuerpos frente a marcadores celulares conjugados con PE con el GaHUFc-FITC, así como controles de anticuerpo conjugado con PE de isotipo control cuando se indique (isotipo de rata). Se incubaron las muestras sobre hielo y se lavaron como anteriormente. Se realizó la visualización mediante análisis de FACSscan con separación en las poblaciones de linfocitos. La tinción doble con anticuerpos CD4+ y la proteína de fusión B7RP1-Fc indicó que las células expresaban tanto el marcador CD4 como el receptor para B7RP1, presumiblemente CRP1 (figura 6). De manera similar, la tinción doble con anticuerpos CD8+ y la proteína de fusión B7RP1-Fc demostró que las células expresaban receptores para tanto CD8 como B7RP1 (figura 6). No pudo detectarse de manera fiable células con tal tinción doble en preparaciones de esplenocitos inactivados. Puesto que CD4 y CD8 son marcadores de linfocitos T, puede postularse que CRP1 se expresa en células T CD4+ y CD8+ activadas. Estos datos concuerdan con el aumento de la expresión de ARN de CRP1 en las regiones de células T de ganglios linfáticos de ratones sensibilizados en comparación con ratones normales (ejemplo 6).

Ejemplo 10

Identificación de células que expresan ligandos de CRP1

- Se utilizó la proteína de fusión CRP1-Fc para detectar células que expresaban ligandos para CRP1, presumiblemente incluyendo la proteína B7RP1 (véase el ejemplo 8), mediante análisis de FACS (figura 7). Se prepararon esplenocitos como en el ejemplo 8, excepto porque se omitió la etapa de activación de células T de 12 h y se analizaron directamente las células. Se tiñeron de manera doble esplenocitos con anticuerpos frente al marcador CD45R (B220) y la proteína de fusión CRP1-Fc. Se detectaron células que expresaban tanto el marcador de células B CD45R como los supuestos ligandos para CRP1, presumiblemente incluyendo B7RP1 (ejemplo 8). Por tanto, se concluye que B7RP1 se expresa en células B, un tipo de célula presentadora de antígeno. Estos datos concuerdan con la expresión de ARN de B7RP1 en regiones de células B de diversos tejidos linfoides (ejemplo 5).

- 40 Análisis de FACS de la expresión de B7RP1 sobre macrófagos peritoneales (figura 8). Se recogieron células peritoneales mediante lavado local de un ratón normal y se lavaron antes de incubarse con la proteína de fusión CRP1-Fc o la proteína Fc como control o con el anticuerpo monoclonal frente a F4/80 (que detecta un antígeno específico para macrófagos) o un anticuerpo monoclonal de control irrelevante, de isotipo coincidente. Entonces se lavaron las células de nuevo y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-Fc humano conjugado con FITC. Tras lavar
- 45 adicionalmente, se evaluaron las células en un analizador de FACS para determinar su dispersión de luz y propiedades de tinción de fluorescencia. Se distinguieron en primer lugar células peritoneales en subconjuntos en el nivel inferior de sus propiedades de dispersión de luz (figura 8A). Se identificaron macrófagos en la región 5 (R5) debido a su capacidad para dispersar fuertemente la luz hacia delante (FSC) y hacia los lados (SSC) y debido a su tinción positiva para el antígeno F4/80, un marcador para macrófagos (figura 8B). Se individualizaron macrófagos en la región 6 (R6) basándose en su tinción menos intensa para el antígeno F4/80 y se encontró que se teñían
- 50 mediante la proteína de fusión CRP1-Fc (figura 8C). Estos datos indican que se expresan ligandos para CRP1, posiblemente incluyendo B7RP1, en macrófagos, una célula presentadora de antígeno profesional. Esto concuerda con la función de CRP1 y B7RP1 en la activación de linfocitos T.

Ejemplo 11

- 55 Actividad inhibidora *in vitro* de la proteína de fusión B7RP1-Fc sobre linfocitos T estimulados con ConA

Se prepararon esplenocitos de ratón como en el ejemplo 8 y se enriquecieron en linfocitos T mediante selección negativa (R and D Systems, Inc., Minneapolis, MN)). Se usaron 200.000 esplenocitos en ensayos de proliferación de

células T en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Se incubaron las células durante 1 h con medio (sin adiciones), proteínas de fusión CRP1-Fc, B7RP1-Fc o B7.2-Fc, tal como se indica en la figura 9. Se añadieron medio (sin adiciones), o Con A a diversas concentraciones tal como se indica en la parte inferior de la figura 9. Entonces se incubaron las células a 37°C y el 5% de CO₂. Tras 42 h, se pulsaron las células con 3H-timidina durante 6 h, se recogieron y se determinó la radioactividad incorporada. Se representan en la figura 9 las CPM promedio y la desviación estándar de muestras por triplicado.

Las proteínas de fusión de Fc no demostraron actividad inhibitoria o estimuladora de células T significativa por sí mismas, sin embargo, en presencia de Con A 1 µg/ml y 3 µg/ml, las proteínas de fusión tanto B7RP1-Fc como B7.2-Fc mostraron actividad inhibitoria significativa (figura 9). A altas concentraciones (10 µg/ml), la estimulación con Con A da como resultado muerte celular, presumiblemente a través de sobreactivación de las células T. La adición de o bien B7RP1-Fc o bien B7.2-Fc protegía significativamente las células de los efectos perjudiciales de altas concentraciones de Con A. En funciones tanto inhibitorias como protectoras, el efecto por la proteína B7RP1-Fc era mayor que el de la proteína B7.2-Fc sobre las células estimuladas con Con A. Estos datos indican que la proteína B7RP1 funciona regulando la proliferación de células T.

Ejemplo 12

Administración sistémica de proteína de fusión B7RP1-Fc en ratones transgénicos

Se subclonó la proteína de fusión B7RP1-Fc descrita en el ejemplo 7 en un vector de expresión específico de hígado ApoE (Simonet *et al.* J. Clin. Invest. 94, 1310-1319 (1994) y solicitud PCT n.º US94/11675). Se cortó la región codificante de pCEP4/B7RP1-Fc usando las enzimas de restricción Spe I y Not I, y se subclonó el fragmento en los mismos sitios en el vector de expresión específico de hígado ApoE mencionado anteriormente. Se secuenció el plásmido resultante, HE-B7RP1-Fc, a través de su región que codifica para proteína, y las secuencias que flanquean la región codificante, para garantizar que estaba libre de mutación.

Se amplificó el plásmido y se purificó a través de dos rondas de centrifugación en gradiente de densidad de CsCl. Se digirió el ADN de plásmido purificado con las enzimas de restricción Cla I y Ase I, y se purificó el inserto transgénico de 1,5 kb mediante electroforesis en gel de agarosa. Se diluyó el fragmento purificado en una disolución de inyección madre de 1 µg/ml en Tris 5 mM, pH 7,4 y EDTA 0,2 mM. Se sometieron a inyección embriones unicelulares de ratones cruzados BDF1 X BDF1 esencialmente tal como se describe (Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4338 (1985)), excepto porque las agujas de inyección se biselaron y siliconizaron antes de su uso. Se cultivaron los embriones durante la noche en un incubador con CO₂ y se transfirieron de 15 a 20 embriones de 2 células a los oviductos de ratones hembra CD1 pseudopreñadas.

Tras el periodo de embarazo, se obtuvieron 56 crías de la implantación en los embriones microinyectados. Se examinaron las crías mediante amplificación por PCR del transgén integrado en muestras de ADN genómico. La región diana para la amplificación era una región de 369 pb del intrón Apo E humano que se incluyó en el vector de expresión. Los oligos usados para la amplificación por PCR fueron:

5'-GCC TCT AGA AAG AGC TGG GAC-3' (SEQ ID NO: 32)

5'-CGC CGT GTT CCA TTT ATG AGC-3' (SEQ ID NO: 33)

Las condiciones para la PCR fueron: 94°C durante 2 min., 1 ciclo; 94°C durante 1 min., 63°C durante 20 s y 72°C durante 30 s, 30 ciclos. De las 56 crías originales, se identificaron 7 como ratones fundadores transgénicos positivos por PCR.

A las 12 semanas de edad, se sacrificaron nueve fundadores transgénicos (ratón n.º 1, 2, 4, 6, 8, 30, 32, 33, 40) y cinco controles (ratón n.º 5, 9, 10, 25, 28) para la necropsia y el análisis patológico. Se aisló el ARN celular total de los hígados de los animales fundadores y compañeros de camada control negativo tal como se describe (McDonald *et al.* Met. Enzymol. 152, 219 (1987)). Se realizó análisis de transferencia de tipo Northern en estas muestras para evaluar el nivel de expresión transgénica. Se resolvieron aproximadamente 10 µg de ARN total de cada animal mediante geles desnaturalizantes de electroforesis en agarosa (Ogden *et al.* Met. Enzymol. 152, 61 (1987)), luego se transfirieron a una membrana de nailon HYBOND-N (Amersham) y se estudiaron con sonda con ADN de inserto de mB7RP1-Fc marcado con ³²P dCTP. Se realizó la hibridación durante 1 h a 63°C en disolución ExpressHyb (Clontech) y 2-4 X 10⁵ CPM de sonda marcada/ml de tampón de hibridación. Tras la hibridación, se lavaron las transferencias dos veces en 2X SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 5 min. cada una, y luego dos veces en 0,1X SSC, SDS al 0,1% a 55°C durante 15-20 min. cada una. Se determinó la expresión del transgén en fundadores y compañeros de camada control tras autorradiografía.

Los análisis de transferencia de tipo Northern indicaron que siete de los fundadores transgénicos expresaban niveles detectables del ARN del transgén (ratón n.º 1, 2, 6, 8, 32, 33 y 40). Los ratones control negativo y tres fundadores (n.º 4, 30 y 31) no expresaban niveles detectables de ARN. Puesto que se determinó que la proteína de fusión B7RP1-Fc se secretaba de células de mamífero en cultivo (figura 4B y ejemplo 7), la expresión del ARNm del transgén debe ser indicativa del nivel de producto génico administrado por vía sistémica.

Ejemplo 13

Actividad biológica de la proteína de fusión B7RP1-Fc

Se sacrificaron siete de los ratones transgénicos (ratón n.º 1, 2, 6, 8, 32, 33 y 40) y cinco compañeros de camada control (n.º 5, 9, 10, 25 y 28) para la necropsia y el análisis patológico usando los siguientes procedimientos: antes de la eutanasia, se verificaron los números de identificación de todos los animales, entonces se pesaron, se anestesiaron y se les extrajo sangre. Se guardó la sangre como suero y como sangre completa para un panel de hematología y química del suero completo. Se realizó radiografía justo después de la anestesia terminal mediante inhalación de CO₂ letal, y antes de la disección macroscópica. Entonces se extrajeron los tejidos y se fijaron en formalina de Zn tamponada al 10% para el examen histológico. Los tejidos recogidos incluían el hígado, bazo, páncreas, estómago, duodeno, íleo, parches de Peyer, colon, riñón, órganos reproductores, piel, glándulas mamarias, hueso, cerebro, corazón, pulmón, timo, tráquea, esófago, glándulas tiroides/paratiroides, yeyuno, ciego, recto, glándulas suprarrenales, grasa blanca y parda, nervio ciático, médula ósea, vejiga urinaria y músculo esquelético. Antes de la fijación, se determinaron los pesos de los órganos completos para el hígado, corazón, estómago, riñón, glándulas suprarrenales, bazo y timo. Tras la fijación, se procesaron los tejidos para obtener bloques de parafina, y se obtuvieron secciones de 3 µm.

Se realizó inmunohistoquímica par el marcador de linfocitos B, B220, y el marcador de linfocitos T, CD3. Para detectar expresión de B220 o CD3, se desparafinaron secciones de 4 µm fijadas en formalina, incrustadas en parafina y se hidrataron con agua desionizada. Se extinguieron las secciones con peróxido de hidrógeno al 3%, se bloquearon con Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) y se incubaron en anticuerpo monoclonal de rata frente a B220 (Pharmingen, San Diego, CA) o anticuerpo policlonal de conejo frente a CD3 (Dako, Carpinteria, CA). Se detectaron los anticuerpos mediante inmunoglobulinas de conejo anti-rata o de cabra anti-conejo biotiniladas, conjugadas con peroxidasa-estreptavidina (BioGenex, San Ramon, CA) con DAB como cromógeno (Biotek, Santa Barbara, CA). Se contratiñeron las secciones con hematoxilina.

En este estudio, se notificaron signos clínicos normales durante la fase en vida del estudio. Las radiografías de cuerpo completo de los ratones transgénicos eran comparables a las de los ratones control. Los parámetros hematológicos globales de los ratones transgénicos eran comparables a los del grupo control negativo, aunque estaban presentes cambios esporádicos en ratones individuales: n.º 8 y n.º 40 transgénicos tenían niveles de globulina en suero aumentados (hiperglobulinemia) y n.º 32 y n.º 33 tenían niveles de globulina en el intervalo normal alto acompañados por niveles de albúmina en el intervalo normal bajo, que es un patrón comúnmente observado con estimulación antigénica crónica del sistema inmunitario. Los pesos de los órganos de los otros ratones transgénicos no eran significativamente diferentes de los del grupo control.

Estaban presentes los siguientes cambios histopatológicos en los ratones transgénicos: Los ganglios linfáticos mesentéricos de los ratones transgénicos para B7RP1-Fc estaban de moderadamente a notablemente agrandados en comparación con los ratones control (figura 10A-10D; figura 11A-11E). La corteza tenía hiperplasia folicular prominente observada como folículos secundarios agrandados (figura 10B-11B) con centros germinales grandes que contenían principalmente células B B220+ (figura 11D) y unas cuantas células T CD3+ dispersadas (figura 11F). La zona paracortical (células T CD3+) estaba también moderadamente agrandada (figura 11B-11F) y los senos medulares tenían números ligeramente aumentados de macrófagos dilatados (histiocitosis sinusal). El cambio más llamativo en los ganglios estaba presente en los cordones medulares, que estaban de levemente a notablemente expandidos por grandes números de células plasmáticas bien diferenciadas en los ratones transgénicos para B7RP1-Fc (figura 10D). En el ratón transgénico n.º 40, también se encontraron pequeños números de cuerpos de Russell dispersados (es decir, células plasmáticas con vesículas intracitoplasmáticas prominentes, grandes, redondas que contienen inmunoglobulinas) en los cordones medulares (figura 10D). De manera interesante, los otros ganglios linfáticos internos y periféricos (por ejemplo cervical, inguinal) tenían características morfológicas similares de hiperplasia linfoide reactiva indicativa de una respuesta sistémica. Estos hallazgos concuerdan con una estimulación inmunitaria crónica, en curso con potenciación de la reacción inmunitaria humoral, que conduce a proliferación de células B y diferenciación terminal en células plasmáticas.

El bazo de ratones transgénicos para B7RP1-Fc tenía zonas de pulpa blanca agrandadas de manera variable con hiperplasia linfoide reactiva moderada que implica particularmente los folículos secundarios de células B con centros germinales prominentes y vainas de células T periarteriolas en comparación con los ratones control (figura 10E-10F). Otro hallazgo llamativo en ratones transgénicos para B7RP1-Fc era plasmacitosis de mínima a leve en la zona marginal que rodea a las zonas de pulpa blanca y en la pulpa roja adyacente. El ratón transgénico n.º 6 tenía unos cuantos cuerpos de Russell dispersados (figura 10F, recuadro). La pulpa roja tenía hematopoyesis extramedular de leve a moderada, que era comparable a la observada en los ratones control (figura 10E).

Los parches de Peyer del intestino delgado estaban de levemente a notablemente agrandados en los ratones transgénicos para B7RP1-Fc con respecto a los de los ratones control (figura 10G) y tenían folículos muy grandes con centros germinales prominentes, particularmente en el ratón transgénico n.º 40 y n.º 32 (figura 10H). Además, había un aumento de mínimo (en n.º 32) a leve (en n.º 8 y n.º 33) en los números de linfocitos y células plasmáticas (mezclado con un infiltrado eosinofílico leve en el íleo del ratón n.º 32) en la capa de lámina propia engrosada de la mucosa, que estaba presente en el intestino delgado, pero más prominente en el colon de los ratones transgénicos.

Los agregados linfoides intestinales grandes (GALT) eran también ligeramente más prominentes en algunos ratones transgénicos para B7RP1-Fc (particularmente el ratón n.º 8 y n.º 2) que en el grupo control.

Generalmente, los otros tejidos examinados, incluyendo el timo, médula ósea, hígado, pulmón, corazón, páncreas, riñones, glándula suprarrenal, tiroides, paratiroides, tráquea, órganos reproductores, vejiga urinaria, glándula mamaria, piel, músculo esquelético, nervio periférico, cerebro, esófago, estómago, intestino delgado y grueso, hueso (fémur/tibia), babilla, grasa blanca y parda parecían normales y comparables con los cambios de fondo detectados en los ratones control.

Los datos de este estudio demuestran que la sobreexpresión de la quimera proteína relacionada con B7-Fc (B7RP1-Fc) en ratones transgénicos induce un fenotipo caracterizado por hiperplasia linfoide reactiva prominente detectada en el bazo, los ganglios linfáticos periféricos e internos y el tejido linfoide asociado al intestino, como hiperplasia folicular, expansión de zonas de células T y plasmacitosis llamativa acompañadas por hiperglobulinemia en algunos animales. La plasmacitosis va acompañada de niveles superiores de IgG circulante (media $\pm$ DE = 597 $\pm$ 298 mg/ml en ratones transgénicos frente a 209 $\pm$ 80 mg/ml en compañeros de camada control, $n = 7$, $P < 0,05$, prueba de la t), en particular IgG2a (217 $\pm$ 100 mg/ml frente a 75 $\pm$ 29 mg/ml, $n = 7$, $P < 0,01$, prueba de la t). La inducción de IgG2a está asociada normalmente con citocinas Th1 tales como IFN- γ . Por tanto, B7RP-1 induce proliferación de células B y T y estimula a células B para que se diferencien en células plasmáticas y para que produzcan inmunoglobulina.

Estos cambios concuerdan con una respuesta inmunitaria sistémica persistente con hiperestimulación del brazo humoral del sistema inmunitario que da como resultado estimulación, proliferación y diferenciación de células B en células plasmáticas que producen anticuerpos a lo largo de todos los órganos linfoides examinados.

Se concluye a partir de la hiperplasia linfoide marcada demostrada en los ratones transgénicos para B7RP1-Fc que la proteína B7RP1 tiene actividad biológica *in vivo* significativa, relacionada con estimulación del sistema inmunitario.

Ejemplo 14

Clonación de B7RP1 humana

Se separaron linfocitos periféricos circulantes humanos normales de glóbulos rojos usando medio de separación de linfocitos (ICN Pharmaceuticals). Entonces se activaron las células T con anticuerpo anti-CD3 unido a placas 10 μ g/ml (Immunotech, Westbrook, ME), PMA 10 ng/ml y ionomicina 500 ng/ml durante la noche (16 horas) a 37°C y el 5% de CO₂. Entonces se preparó el ARN total de las células usando reactivo TRIzol (Gibco BRL). Se sedimentaron las células mediante centrifugación y se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de reactivo TRIzol por cada 5 $\times 10^6$ células y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron entonces 0,2 ml de cloroformo por 1 ml de reactivo TRIzol original. Se agitaron los tubos vigorosamente a mano durante 15 segundos y se incubaron durante 3 minutos a TA y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min. a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa superior transparente que contiene el ARN y se precipitó el ARN de muestras mediante la adición de alcohol isopropílico. Entonces se incubó la disolución a TA durante 10 min., se sedimentó el ARN, se lavó con etanol al 75% y entonces se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 min. a 4°C. Se secó al aire el sedimento, se resuspendió en agua libre de ARNasa, entonces se alícuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

Se construyó la biblioteca usando el sistema de plásmidos Superscript para síntesis de ADNc y clonación de plásmidos (Gibco BRL). En resumen, se ligaron insertos de ADNc con un tamaño promedio de 2 kb en el vector pSport en el sitio de clonación Sal1/Not1. Se sometieron a electroporación los plásmidos ligados en *E. coli* competente para transformación Electromax (Gibco BRL), se titularon y se sembraron en placa a quince mil colonias por placa de LB (ampicilina 100 μ g/ml). Se obtuvieron por levantamiento 300.000 colonias sobre membranas de transferencia de hibridación de examen de colonias/placas (NEN Life Sciences), se desnaturalizaron en NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M durante 5 minutos, entonces se neutralizaron sucesivamente durante 5 minutos cada uno en los siguientes tampones, Tris HCl 1 M pH 8,0, Tris HCl 0,5 M pH 8,0 y NaCl 1,5 M y 2X SSC. Entonces se reticularon los filtros mediante irradiación ultravioleta y se cocieron durante 30 min. a 80°C en un horno de vacío. Se lavaron previamente los filtros extensamente en 2X SSC a 42°C para eliminar los residuos, entonces se hibridaron previamente a 42°C en formamida al 50%, 5X SSPE, 5X solución de Denhardt, SDS al 0,5%, ADN de esperma de salmón 100 μ g/ml, durante 2 horas.

Se examinó la biblioteca de ADNc de linfocitos humanos con un fragmento de ADN de 895 pb que tenía los nucleótidos 1-711 tal como se muestra en la figura 3A, 167 pb inmediatamente en 5' con respecto al codón de metionina iniciador en la figura 3A y 17 pb inmediatamente en 3' con respecto a la posición 711 en la figura 3A. Se obtuvo esta secuencia en el sentido de 5' de 167 pares de bases mediante RACE en 5' del ADNc de HuB7RP1 (ejemplo 4) y se liberó de un vector TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) en el sitio de escisión de enzima de restricción Eco RI. Se purificó dos veces este inserto en un gel TAE de agarosa al 0,8%. Se usó un kit de purificación de gel de ADN (Qiagen) para aislar el inserto de ADN de la agarosa.

Se marcaron 125 ng del fragmento de ADN con ³²P dCTP (Amersham) siguiendo el protocolo del sistema de marcaje Prime al azar Redi-Prime 2 (Amersham). Entonces se permitió que los filtros obtenidos por levantamiento de las colonias se hibridaran durante la noche con la sonda a 42°C en el siguiente tampón durante la noche a 42°C;

formamida al 50%, 5X SSPE, 2X solución de Denhardt, SDS al 0,5%, ADNes 100 mg/ml. La actividad específica de la sonda era de $2,38 \times 10^9$ cpm/ μ g de ADN, en aproximadamente 2 ng de sonda marcada por ml de tampón de hibridación. Se retiró la sonda y se guardó para la siguiente ronda de examen. Entonces se lavaron los filtros en 2X SSC, SDS al 0,1% TA durante 15 min., seguido por 1X SSC, SDS al 0,1% a 55°C durante 15 min. y 1X SSC, SDS al 0,1% a 60°C durante 10 min. Se envolvieron los filtros en plástico y se expusieron a película de autorradiografía durante la noche a -80°C con 2 pantallas de potenciación. Se identificaron tres clones positivos independientes. Se alinearon las exposiciones con las placas bacterianas y se rasparon los clones positivos, se diluyeron y volvieron a sembrarse en placa sobre placas LB con ampicilina 100 μ g/ml, se hicieron crecer durante la noche como anteriormente y se obtuvieron por levantamiento las colonias, se prepararon y se estudiaron con sonda tal como se describió anteriormente. Se aislaron tres colonias de clones independientes, se aisló el ADN y se secuenció el ADN para cada clon por triplicado.

La longitud completa de la proteína B7RP1 humana es de 302 aminoácidos. La longitud del polipéptido y la posición relativa del dominio transmembrana concuerdan con otros miembros de la familia de B7. El gen de B7RP1 humana tiene un 43% de identidad de aminoácidos con el clon de ratón. Este grado de homología es significativo puesto que las proteínas CD80 de ratón y ser humano son sólo idénticas al 41%. Los residuos de cisteína en las posiciones de aminoácido 37, 113, 158, 215 y 216 están notablemente conservados entre los genes de ratón y ser humano.

Ejemplo 15

Clonación de CRP1 humana

Una búsqueda de homología Blast en Genbank (GCG, University of Wisconsin) usando la secuencia de B7RP1 murina (véase la figura 2) recuperó un clon genómico (n.º de registro de Gen Bank AQ022676) que contenía una secuencia de 104 pb que mostraba alta homología con el gen de CRP1 murina. Se diseñaron cebadores de clonación por PCR para que se solapasen con esta secuencia.

5'-GCA TAT TTA TGA ATC CCA-3' (SEQ ID NO: 34)

5'-ACT ATT AGG GTC ATG CAC-3' (SEQ ID NO: 35)

Usando los cebadores anteriores, se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 151 pb de la CRP1 murina usando el plásmido de CRP1 murina descrito en la figura 1 y el ejemplo 1 como molde. Se marcaron 125 ng del ADN con 32P dCTP (Amersham) siguiendo el protocolo del sistema de marcaje Prime al azar Redi-Prime 2 (Amersham). Entonces se permitió que los filtros obtenidos por levantamiento a partir de las bibliotecas de sangre periférica humana descritas en el ejemplo 15 se hibridaran con la sonda en el siguiente tampón de hibridación durante la noche (15 h) a 41°C, formamida al 50%, 5X SSPE, 2X solución de Denhardt, SDS al 0,5%, ADNes 100 μ g/ml. La actividad específica de la sonda era de $3,52 \times 10^9$ cpm/ μ g de ADN, 1,5 ng de sonda marcada/ml de tampón de hibridación. Se retiró la sonda y se guardó para la siguiente ronda de examen. Entonces se lavaron los filtros en 2X SSC, SDS al 0,1% a TA durante 10 min., seguido por 1X SSC, SDS al 0,1% a 37°C durante 7 minutos, 40°C durante 7 minutos, 44°C durante 7 minutos, luego 50°C durante 7 minutos, monitorizando de manera continua la velocidad a la que los filtros liberaban la sonda marcada. Se envolvieron los filtros en plástico y se expusieron a una película durante la noche a -80°C con 2 pantallas de potenciación. Este método reveló 9 posibles clones positivos independientes. Se alinearon las exposiciones con las placas bacterianas y se rasparon los clones positivos, se depositaron en 200 μ l de SOC, se realizaron 2 diluciones en serie de 1:10 y volvieron a sembrarse en placa 70 μ l de la segunda dilución sobre placas LB que contenían ampicilina a 100 μ g/ml y se hicieron crecer durante la noche como anteriormente. Se obtuvieron por levantamiento las colonias, se prepararon y se estudiaron con sonda como anteriormente. Se aislaron ocho clones independientes y se preparó el ADN mediante el método miniprep de Qiagen.

Se obtuvo un clon de ADNc que contenía un marco de lectura abierto de 199 aminoácidos (figura 13A). Este clon de ADNc contenía homología de nucleótidos y aminoácidos con el clon de CRP1 murina descrito en el ejemplo 1 y la figura 1. Los nucleótidos correspondientes al marco de lectura abierto de este clon humano eran idénticos al 77% al gen de CRP1 murina. La traducción de la secuencia humana y la posterior comparación con la proteína CRP1 murina reveló un 69% de identidad de aminoácidos con la proteína murina (figura 13B). Además, el motivo entre los aminoácidos 114 a 119, "FDPPPF", se conservaba entre los genes de CRP1 humana y murina. Este motivo corresponde al motivo "MYPPPY" en CD28 humana y murina que es esencial para la interacción por la proteína B7. Además, las cisteínas en las posiciones de aminoácido 42, 109 y 141 también se conservan. Estas cisteínas corresponden a las cisteínas en CD28 y CTLA-4 que están implicadas en la formación de bucles de Ig y dimerización de disulfuros intermoleculares. La estrecha similitud con CRP1 murina, y similitudes estructurales con la familia de homología de CD28, indican que este es el homólogo de CRP1 humana.

Ejemplo 16

CRP-1 se expresa en linfocitos T de memoria en reposo

Con el fin de estudiar la expresión de CRP-1 en células T de memoria, se recogieron células T esplénicas de ratones

de 6-7 meses de edad. Se tiñeron de manera doble estas células usando B7RP-1-Fc marcada mediante un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con FITC y un anticuerpo conjugado con PE frente a o bien CD44 o bien CD45RB o bien CD69. La tinción con la proteína de fusión B7RP-1-Fc detecta la expresión de proteína CRP-1 en estas células T. Ratones más ancianos muestran más células T esplénicas CRP-1+ que ratones más jóvenes. De manera interesante, un número llamativo de estas células son altas en CD44 (figura 14a) y bajas en CD45RB (figura 14b), un perfil típico de células T de memoria. Estas células T de memoria CRP-1+ están en un estado de reposo, puesto que no expresan el marcador de activación CD69 (figura 14c). La expresión de CRP-1 en células T de memoria indica que CRP-1 tiene funciones coestimuladoras en células T de memoria.

Ejemplo 17

10 Coestimulación de células T *in vitro* inhibida por anticuerpos frente a B7RP-1.

Para determinar si la proteína B7RP-1 tiene relevancia funcional para células T, se incubaron células T CD3+ con la proteína de fusión B7RP-1-Fc y un anticuerpo anti-CD3 en un ensayo de proliferación *in vitro*. Entonces se usaron anticuerpos policlonales de conejo anti-B7RP1 de ratón o anticuerpos monoclonales de rata anti-B7RP1 de ratón para inhibir específicamente la proliferación coestimulada por B7RP1-Fc *in vitro*.

15 Preparación de antisuero policlonal de conejo frente a B7RP-1

Se les inyectó a tres conejos blancos New Zealand (peso inicial de 5-8 libras) por vía i.m. proteína B7RP1 murina. Se inmunizó cada conejo en el día 1 con 150 µg de proteína B7RP1 murina emulsionada en un volumen igual de adyuvante completo Hunters Titer Max. Se realizaron refuerzos adicionales (días 14 y 28) mediante el mismo procedimiento. Se monitorizaron los títulos de anticuerpo mediante EIA. Tras el segundo refuerzo, los antisueros revelaron títulos de anticuerpo moderados. Entonces se obtuvo una sangría de producción de 30 ml en cada animal. Se repitió esto cada semana durante 6 semanas. Entonces se purificaron anticuerpos policlonales mediante cromatografía de proteína-A agarosa, seguido por selección negativa mediante cromatografía de afinidad de proteína Fc y selección positiva mediante cromatografía de afinidad de B7RP-1-Fc.

Preparación de anticuerpos monoclonales de rata anti-B7RP1 murina

Se generaron anticuerpos monoclonales de rata anti-B7RP1 murina tal como se describe en Practical Immunology, segunda edición (1980; L. Hudson y F.C. Hay; Blackwell Scientific Publications; St. Louis, MO). En resumen, se les inyectó a ratas Lou (Harlan; Indianápolis, IN) por vía intraperitoneal proteína de fusión muB7RP1-Fc emulsionada en adyuvante de Freund a intervalos de 4 semanas. Tres días antes de la fusión, se reforzaron las ratas por vía intravenosa con muB7RP1 soluble. En el día de la fusión, se sacrificó el animal con dióxido de carbono y se extrajo el bazo de manera aséptica. Se generó una suspensión de células individuales usando un homogeneizador de tejido. Se lavaron tanto esplenocitos como células de mieloma Y3-Ag1.2.3 (Colección Americana de Cultivos Tipo; Rockville, MD) en medio libre de suero, luego se fusionaron mediante la adición de polietilenglicol (PEG 1500; Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianápolis, IN). Se enjuagaron las células una vez, se resuspendieron en medio que contenía suero y se sembraron en placa en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. De diez a 12 días después, se sometió a prueba el medio de cada pocillo para detectar anticuerpo específico frente a B7RP1 mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (EIA) directo. Se hicieron crecer células de los pocillos que indicaban posible unión hasta cultivos de 10 ml y se congelaron en nitrógeno líquido. Se sometió a prueba adicionalmente el medio de cada cultivo en citometría de flujo y en un ensayo de proliferación de células T funcional. Se sembraron en placa las que se determinó que eran de interés mediante estos métodos para dar colonias de células individuales, se seleccionaron de nuevo mediante EIA y se mantuvieron líneas celulares finales para la generación de anticuerpos. Se purificaron los anticuerpos del medio celular mediante cromatografía de proteína A-agarosa.

Preparación de células T y ensayo de proliferación de células T

Se purificaron células T de los bazos de ratones C57B1/6 (hembras de 8-12 semanas de edad, Charles River Laboratories) mediante selección negativa a través de una columna de enriquecimiento de células T murinas (R&D Systems). Entonces se usaron las células T o bien directamente o bien se purificaron adicionalmente mediante anticuerpos y lisis del complemento tal como sigue. Se resuspendieron las células ($2,5 \times 10^6$ células/ml) en medio RPMI que contenía anticuerpos (todas a 10 µg/ml y de Pharmingen) contra CD11b murina (clon M1/70), NK-1.1 (clon PK136), CD8a (clon 53-6.7), I-A^b (clon M5/114.15.2), CD11c (clon HL3) y el antígeno B220 (clon RA3-6B2). Entonces se incubaron las células sobre hielo durante 30 min., se sedimentaron a 1200 rpm, se resuspendieron en RPMI:complemento de conejo 4:1 vol/vol (Sigma, n.º S-7764) y se incubaron durante 30 min. adicionales a 37°C. Se sedimentaron de nuevo las células, y se repitió el tratamiento con complemento. Antes de sembrar en placa, se lavaron las células con RPMI que contenía FCS al 10%. Se recubrieron placas de 96 pocillos con fondo de U con un anticuerpo anti-CD3 (clon 145-2C11, Pharmingen) a concentraciones que oscilaban entre 0 y 1,2 µg/ml, y Fab₂ anti-IgG humana (Sigma, 12,5 µg/ml) durante la noche a 4°C, seguido por una incubación de 6-9 h a 37°C. Se cultivaron células T (1×10^5 /pocillo) en ausencia o presencia de diversas proteínas de fusión de Fc durante 48 h y se pulsaron durante las últimas 18 horas con 1 µCi de ³H-timidina. Las proteínas Fc control incluían una proteína de fusión de OPG y Fc y un fragmento de proteína Fc no fusionado. Entonces se recogieron las células y se contó la

radioactividad incorporada. B7RP-1-Fc coestimula células T para que proliferen de un modo dependiente de la dosis (figura 15a), y un anticuerpo anti-B7RP-1-Fc inhibe específicamente esta coestimulación de manera dependiente de la dosis (figura 15b).

Ejemplo 18

5 Inhibidores de la ruta de CRP-1/B7RP-1 disminuyen la aparición de artritis reumatoide inducida por colágeno.

La artritis inducida por colágeno (AIC) es un modelo animal de poliartritis autoinmunitaria en roedores y primates que tiene muchas similitudes con la artritis reumatoide en seres humanos. La inmunización con una especie heteróloga de colágeno tipo II (CII) induce una respuesta autoinmunitaria frente a CII que conduce al desarrollo de AIC en cepas de ratones susceptibles. Cepas congénicas de ratones con H-2^f y H-2^g son altamente susceptibles a AIC. AIC está mediada por los efectos sinérgicos de tanto células T reactivas con CII como anticuerpos. Se disolvió CII porcino (Nabozny *et al.*, Autoimmunity 20, 51-58 (1995)) en ácido acético 0,01 N a una concentración de 2 mg/ml y entonces se emulsionó a una razón 1:1 con CFA (Difco). Se inmunizaron ratones susceptibles a artritis B10.RIII (H-2^f) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) con 100 µl de emulsión por vía intradérmica en la base de la cola. Se monitorizaron los ratones 2-3 veces a la semana para detectar el desarrollo de artritis. Se determinó la gravedad de la artritis usando un sistema de clasificación para cada garra tal como sigue: 0: sin artritis; 1: enrojecimiento o hinchazón en 1-3 dedos; 2: hinchazón grave de la garra; 3: anquilosis articular. Se sumó la puntuación de cada extremidad para proporcionar un intervalo de gravedad de desde 0 hasta 12 para cada animal.

Se les inyectaron a los ratones 100 µg (en 200 µl) de proteína por vía intraperitoneal dos veces a la semana. El tratamiento comenzó 1 día tras la inmunización con CII porcino y se detuvo en el día 52 tras la inmunización. Se realizó el experimento en grupos de tratamiento de 10 ratones, y animales con puntuaciones de 1 o superiores se puntuaron como positivos. Se muestran los resultados en la figura 16 y la tabla 1.

TABLA 1

Efecto de proteínas de fusión CRP-1, B7RP-1, CTLA-4 y B7.2 Fc sobre la aparición de artritis

<u>Grupos de tratamiento</u>	<u>Día de aparición, media +/- d.e.</u>
CTLA4-Fc	60,0±0,0
CRP1-Fc	48,9±13,2
B7.2-Fc	28,4±14,1
B7RP1-Fc	33,9±16,6
PBS	37,7±17,1

En ratones tratados con proteína de fusión CRP1-Fc, la aparición de síntomas artríticos se retrasó aproximadamente 10 días en comparación con los ratones tratados con PBS. Esto demuestra que la inhibición de la ruta de CRP-1/B7RP-1 puede aliviar síntomas de la enfermedad en este modelo de ratón de artritis reumatoide.

Ratones tratados con B7RP-1-Fc o B7.2-Fc mostraban una aparición más temprana de la enfermedad (tabla 1 y figura 16a) con un aumento de la gravedad artrítica (figura 16b) en comparación con los controles tratados con PBS. Esto indica que la proteína de fusión B7RP-1-Fc potencia la respuesta inmunitaria de células T. Tal actividad puede ser útil en la generación de inmunidad antitumoral *in vivo*.

Los efectos opuestos de CRP-1-Fc y B7RP-1-Fc en este modelo de ratón de artritis reumatoide indican que la ruta puede manipularse para o bien potenciar o bien inhibir la progresión de la enfermedad. La selección como diana de la proteína CRP-1 con B7RP-1-Fc soluble potencia la enfermedad, mientras que la interacción de CRP-1-Fc soluble con B7RP-1 inhibe los síntomas de la enfermedad.

Ejemplo 19

B7RP-1-Fc induce un fenotipo de enfermedad inflamatoria del intestino en ratones transgénicos.

La sobreexpresión persistente de la proteína relacionada con B7 (B7RP1-Fc) en ratones transgénicos de 22 a 25 semanas de edad (ejemplo 12) induce un fenotipo sorprendente de enfermedad inflamatoria del intestino (EII) con engrosamiento marcado e inflamación crónica de los intestinos delgado y grueso (enterocolitis) y pérdida de peso en algunos animales. Histológicamente, se encontraron los cambios inflamatorios más graves en el colon proximal y distal, con cambios más leves en el intestino delgado. El colon proximal estaba notablemente engrosado con ulceración por agrietamiento, inflamación transparietal e hipertrofia de la mucosa colónica, mientras que el colon distal tenía hipertrofia difusa de la mucosa (o erosión focal y atrofia glandular) sin ulceración. El intestino delgado proximal tenía hipertrofia de la mucosa de leve a marcada con cambios inflamatorios más leves, mientras que el intestino delgado distal (ileo) tenía hipertrofia leve de la mucosa en algunos animales y atrofia en otros ratones. Los cambios intestinales eran los más graves y se hallaron de manera constante en los ratones transgénicos para B7RP-1 hembra, pero también se observaron en varios de los ratones transgénicos macho en este estudio.

Es interesante observar que las características histológicas halladas en el colon proximal, incluyendo la ulceración

por agrietamiento y la inflamación granulomatosa crónica transparietal con células gigantes multinucleadas, se asemejan más estrechamente a las observadas en la enfermedad de Crohn que en colitis ulcerosa en seres humanos. Morfológicamente, esta colitis también imita la EII descrita en ratones deficientes en interleucina-10, que desarrollan consunción, anemia y enterocolitis que afectan a todo su tracto intestinal (Kuhn *et al.* 1993; Sartor 1995; Leach *et al.* 1999). Como en los ratones deficientes en IL-10, los cambios iniciales en los ratones transgénicos para B7RP-1-Fc consisten en infiltrados leves, focales de células inflamatorias en la lámina propia sin hiperplasia epitelial colónica (ejemplo 13). En ratones más ancianos, los segmentos colónicos afectados se engrosan debido a hipertrofia/hiperplasia glandular e inflamación crónica.

Los cólores proximales y distales de los ratones B7RP-1-Fc tenían colitis de moderada a grave con características histológicas de enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Los segmentos afectados del colon proximal (figura 17B-17D) estaban engrosados de manera difusa, debido a hipertrofia e hiperplasia glandular prominente con alargamiento y dilatación de las glándulas mucosas (figura 17B), que tenían números aumentados de figuras mitóticas y abscesos crípticos poco comunes, pero conservaban células caliciformes con mucina (figura 17D). La mucosa tenía inflamación crónica difusa en la lámina propia, que en algunos animales se extendía de manera transparietal implicando las capas subyacentes de la pared del intestino, incluyendo la submucosa, la capa muscular de la mucosa, la serosa y el tejido graso mesentérico adyacente (figura 17B-17C). Los infiltrados inflamatorios consistían en linfocitos (predominantemente células T CD3+, CD44+), células plasmáticas y macrófagos epitelioides (figura 17F) mezclados con algunos neutrófilos y células gigantes multinucleadas ocasionales (figura 17E), características de inflamación granulomatosa crónica. También estaban presentes agregados linfoides (principalmente células B220+ mezcladas con pequeños números de células CD3+) en la mucosa y alrededor de vasos sanguíneos más pequeños en la submucosa y capas más profundas, incluyendo grasa mesentérica (figura 17C). La luz contenía exudado mucopurulento o mucoso (figura 17D). Se hallaron pruebas serias de colitis, con ulceración por agrietamiento multifocal de la mucosa e inflamación transparietal (figura 17B-17C), en estos ratones transgénicos para B7RP-1-Fc.

El colon distal de los ratones transgénicos para B7RP-1-Fc también estaba engrosado de manera difusa y era hiperplásico con alargamiento, basofilia y dilatación de las glándulas colónicas (figura 18B-18G), algunas de las cuales contenían abscesos crípticos (figura 18D y 18F) y mucosidad. La lámina propia tenía un infiltrado inflamatorio difuso leve de linfocitos (predominantemente células CD3+, CD44+, particularmente en la mucosa superficial; figura 18E), así como células plasmáticas y agregados focales de macrófagos epitelioides mezclados con algunos neutrófilos. También estaban dispersos agregados linfoides (de predominantemente células B220+; figura 18D y 18F) por toda la mucosa. El intestino delgado de ratones transgénicos para B7RP-1-Fc tenía más cambios variables, incluyendo hipertrofia e hiperplasia mucosa y críptica de leve a focalmente marcada (figura 19B y 19D con razones de criptas/vellosidades que oscilan entre 1:4 y 1,5:1, en comparación con 1:10 en los ratones control) acompañadas por un infiltrado predominantemente linfoplasmacítico en la lámina propia. La hiperplasia de la mucosa era lo más prominente en el intestino delgado proximal, incluyendo el duodeno (figura 19B) y particularmente el yeyuno (figura 19D). La arquitectura de las criptas estaba focalmente alterada y era displásica en los ratones más gravemente afectados (figura 19D). En cambio, los intestinos delgados distales (íleo) de algunos ratones, tenían atrofia vellosa leve, irregular de la mucosa del íleo (figura 19F) con aplanamiento, engrosamiento o pérdida focal de vellosidades (con una razón de criptas:vellosidades de 1:1 o menos, en lugar de la razón normal de 1:2), mientras que otros ratones tenían hipertrofia leve de la mucosa del íleo.

La proteína de fusión B7RP-1-Fc actúa activando células que son responsables de provocar un fenotipo muy similar al de la enfermedad de Crohn humana. Esto indica que las células que pueden ser responsables de la inflamación en la enfermedad de Crohn se activan por la proteína de fusión B7RP-1-Fc. Por tanto, inhibidores de proteína soluble, anticuerpo o molécula pequeña de B7RP-1 pueden ser útiles en la inhibición de EII.

Ejemplo 20

La proteína de fusión B7RP-1-Fc inhibe el crecimiento tumoral en ratones

Para examinar el efecto de B7RP-1 y CRP-1 sobre el crecimiento del sarcoma Meth A murino inmunogénico, se investigó si la B7RP-1-Fc soluble afecta al crecimiento de un sarcoma Meth A establecido en ratones Balb/c.

Se implantaron células de sarcoma Meth A en crecimiento exponencial mediante inyección intradérmica de 0,5 millones de células en el abdomen de ratones Balb/c en el día 0. En el día 7, cuando los tumores alcanzaron ~ 100 mm³, se trataron los ratones con o bien vehículo (PBS) o bien B7RP-1-Fc (8 mg/kg), por vía subcutánea en el cuello en los días 7, 10, 14 y 17. Se midieron los diámetros bidimensionales de los tumores mediante calibres y se estimó el volumen tumoral (en mm³) usando la fórmula: Volumen tumoral = [(anchura) 2x longitud]/2. Se monitorizó el crecimiento tumoral hasta el día 28. Cada grupo tenía ocho ratones.

El patrón de crecimiento de sarcoma Meth A del tumor control era bifásico: a una fase inicial lenta le seguía una fase exponencial relativamente rápida. En ratones tratados con B7RP-1-Fc, el crecimiento del tumor era significativamente más lento en la fase exponencial rápida. En el día 28, los volúmenes promedio de los ratones control y tratados con B7RP1-Fc eran de 1410 mm³ y 580 mm³, respectivamente (figura 20). Por tanto, el tratamiento con B7RP-1-Fc inhibió el crecimiento tumoral significativamente en este modelo. Los datos sugieren fuertemente la

utilidad terapéutica beneficiosa de la proteína B7RP-1-Fc soluble, y otros activadores de la ruta de B7RP-1/CRP-1, en el tratamiento de tumores inmunogénicos.

La actividad antitumoral inmunológica está estrechamente asociada con la función de linfocitos T citolíticos (CTL). Consecuentemente, se expresa la proteína B7RP-1-Fc en células T CD8+ citolíticas (ejemplo 9, figura 6). Estos datos apoyan fuertemente que B7RP-1 funciona en células T CD8+ citolíticas. Por tanto, puede usarse B7RP-1-Fc, u otros estimuladores de la ruta de B7RP-1/CRP-1, para potenciar funciones inmunitarias celulares y de células T citolíticas para varias indicaciones no relacionadas con cáncer.

Ejemplo 21

Inhibición de la actividad de B7RP-1 humana *in vitro*

Para determinar si B7RP-1 humana tiene propiedades coestimuladoras positivas, se sometieron a prueba células que expresaban B7RP-1 humana y proteína de fusión B7RP-1-Fc humana en ensayos de proliferación de células T. Se construyó la proteína de fusión B7RP-1-Fc humana fusionando secuencias génicas correspondientes a los aminoácidos 1 a 247 con una secuencia génica de IgG1 humana parcial (ejemplo 14). Se construyó la proteína de fusión CRP-1-Fc humana fusionando secuencias génicas correspondientes a los aminoácidos 1 a 146 con una secuencia génica de IgG1 humana parcial (ejemplo 2). Se realizaron los métodos de construcción, expresión y purificación de ambas proteínas de fusión tal como se describe en el ejemplo 7. B7RP-1-Fc demostró actividades coestimuladoras que dependen de la estimulación con anticuerpo anti-CD3 (figura 21a). Además, esta actividad puede inhibirse específicamente con proteína CRP-1-Fc soluble (figura 21b). Se obtuvieron efectos coestimuladores similares usando células CHO que expresan B7RP-1 humana, unida a la membrana, que contiene toda la secuencia codificante (figura 21c).

Se determinó la producción de citocinas por células T humanas en las condiciones de proliferación *in vitro* anteriores. Se analizaron los sobrenadantes de cultivos de células T estimulados durante 48 y 72 horas para detectar IL-2, IL-10 e IFN-gamma mediante ELISA según las especificaciones del fabricante (BioSource International). Los niveles de IFN-gamma e IL-10 estaban significativamente aumentados; sin embargo, a diferencia del caso con coestimulación con CD28, IL-2 no estaba notablemente inducida (figura 21d). Los niveles aumentados de IFN-gamma, una citocina Th1, se correlacionan con las funciones de B7RP-1 aumentando IgG2a, tal como se describe en el ejemplo 13.

Se realizaron ensayos de coestimulación de células T *in vitro* tal como sigue. Se aislaron células T humanas altamente purificadas (>98% CD3+) mediante selección negativa de PBMC nuevas o descongeladas, agotadas por adherencia usando perlas magnéticas marcadas con AcM (Miltenyi Biotec). Se cultivaron células T (1×10^5 células/pocillo) en pocillos por triplicado en placas de 96 pocillos en 200 μ l/pocillo de RPMI + FCS al 10%. Para evaluar la coestimulación con B7RP-1-Fc, se recubrieron previamente placas con fondo de U con diversas concentraciones de anticuerpo anti-CD3 (Pharmingen) y Fc anti-IgG humana 10 μ g/ml (Sigma) en 100 μ l de 1x PBS mediante una incubación a 4°C durante la noche. Se eliminaron el anticuerpo anti-CD3 y Fc anti-IgG humana no unidos y se cultivaron las células en presencia o ausencia de diversas concentraciones de B7RP-1-Fc, OPG-Fc control o anticuerpo anti-CD28 (Pharmingen). Para la inhibición por CRP-1-Fc de la coestimulación con B7RP-1-Fc, se cultivaron células T en pocillos recubiertos previamente con anticuerpo anti-CD3 0,33 μ g/ml y Fc anti-IgG humana 10 μ g/ml con B7RP-1-Fc 0,5 μ g/ml en presencia de CRP-1-Fc u OPG-Fc diluida en serie, comenzando a 10 μ g/ml. Para evaluar la coestimulación por células CHO que expresan B7RP-1, se cultivaron células T en placas de fondo plano con diversas concentraciones de anticuerpo anti-CD3 soluble en presencia o ausencia de diversas cantidades de células CHO B7RP-1 tratadas con mitomicina-C o células vector CHO. Para someter a prueba la proliferación de células T, se pulsaron cultivos con [3 H]TdR 1 uCi/pocillo durante las últimas 18 h de un cultivo de 72 h. Se determinó la proliferación de células T mediante la incorporación de [3 H]TdR. Se expresan los resultados de un experimento representativo de tres donantes al azar como CPM medias incorporadas $\pm$ DE. Para análisis de producción de citocinas, se cultivaron las células durante 48 y 72 horas y se recogieron los sobrenadantes para el ELISA.

Estos experimentos muestran que la parte extracelular de B7RP-1 humana, tal como se describe en el ejemplo 14, cuando se fusiona a un fragmento de Fc humano, puede coestimular células T *in vitro*. Esta coestimulación se inhibe por CRP-1-Fc y por tanto se demuestra cómo puede funcionar un inhibidor soluble de B7RP-1 humana. Podrían usarse ensayos *in vitro*, tales como los descritos en el presente documento usando B7RP-1 y CRP-1 humanas, para seleccionar inhibidores de anticuerpo, proteína soluble, peptidocuerpo o molécula pequeña de la actividad de B7RP-1/CRP-1.

Lista de secuencias

<110> AMGEN INC.

<120> POLIPÉPTIDOS NOVEDOSOS IMPLICADOS EN RESPUESTA INMUNITARIA

<130> A-579A

<140> 09/264.527

<141> 08-03-1999

<160> 35

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

5 <211> 600

<212> ADN

<213> ratón

<220>

<221> CDS

10 <222> Complemento ((1) .. (600))

<400> 1

atg aag ccg tac ttc tgc cgt gtc ttt gtc ttc tgc ttc cta atc aga	48
Met Lys Pro Tyr Phe Cys Arg Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Arg	
1 5 10 15	
ctt tta aca gga gaa atc aat ggc tcg gcc gat cat agg atg ttt tca	96
Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser	
20 25 30	
ttt cac aat gga ggt gta cag att tct tgt aaa tac cct gag act gtc	144
Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val	
35 40 45	
cag cag tta aaa atg cga ttg ttc aga gag aga gaa gtc ctc tgc gaa	192
Gln Gln Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu	
50 55 60	
ctc acc aag acc aag gga agc gga aat gcg gtg tcc atc aag aat cca	240
Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro	
65 70 75 80	
atg ctc tgt cta tat cat ctg tca aac aac agc gtc tct ttt ttc cta	288
Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu	
85 90 95	
aac aac cca gac agc tcc cag gga agc tat tac ttc tgc agc ctg tcc	336
Asn Asn Pro Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser	
100 105 110	
att ttt gac cca cct cct ttt caa gaa agg aac ctt agt gga gga tat	384
Ile Phe Asp Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr	
115 120 125	
ttg cat att tat gaa tcc cag ctc tgc tgc cag ctg aag ctc tgg cta	432
Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu	
130 135 140	
ccc gta ggg tgt gca gct ttc gtt gtg gta ctc ctt ttt gga tgc ata	480
Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile	
145 150 155 160	

ctt atc atc tgg ttt tca aaa aag aaa tac gga tcc agt gtg cat gac 528
 Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Val His Asp
 165 170 175

cct aat agt gaa tac atg ttc atg gcg gca gtc aac aca aac aaa aag 576
 Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys
 180 185 190

tct aga ctt gca ggt gtg acc tca 600
 Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser
 195 200

<210> 2

<211> 200

<212> PRT

5 <213> ratón

<400> 2

Met Lys Pro Tyr Phe Cys Arg Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser
 20 25 30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val
 35 40 45

Gln Gln Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu
 50 55 60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro
 65 70 75 80

Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
 85 90 95

Asn Asn Pro Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser
 100 105 110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr
 115 120 125

Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
 130 135 140

Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile
 145 150 155 160

Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Val His Asp
 165 170 175

Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys
 180 185 190

Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser
 195 200

<210> 3

$\langle 211 \rangle$ 200

<212> PRT

<213> ratón

<400> 3

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

5

<210> 4

<211> 218

<212> PRT

<213> ratón

10 <400> 4

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

<210> 5

<211> 234

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 5

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

<210> 6

<211> 966

5 <212> ADN

<213> ratón

<220>

<221> CDS

<222> Complemento ((1) .. (966))

10 <400> 6

atg	cag	cta	aag	tgt	ccc	tgt	ttt	gtg	tcc	ttg	gga	acc	agg	cag	cct	48
Met	Gln	Leu	Lys	Cys	Pro	Cys	Phe	Val	Ser	Leu	Gly	Thr	Arg	Gln	Pro	
1				5					10					15		
gtt	tgg	aag	aag	ctc	cat	gtt	tct	agc	ggg	ttc	ttt	tct	ggt	ctt	ggt	96
Val	Trp	Lys	Lys	Leu	His	Val	Ser	Ser	Gly	Phe	Phe	Ser	Gly	Leu	Gly	
			20					25					30			
ctg	ttc	ttg	ctg	ctg	ttg	agc	agc	ctc	tgt	gct	gcc	tct	gca	gag	act	144
Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Ala	Glu	Thr	
			35				40					45				
gaa	gtc	ggt	gca	atg	gtg	ggc	agc	aat	gtg	gtg	ctc	agc	tgc	att	gac	192
Glu	Val	Gly	Ala	Met	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Val	Leu	Ser	Cys	Ile	Asp	
	50					55					60					
ccc	cac	aga	cgc	cat	ttc	aac	ttg	agt	ggt	ctg	tat	gtc	tat	tgg	caa	240
Pro	His	Arg	Arg	His	Phe	Asn	Leu	Ser	Gly	Leu	Tyr	Val	Tyr	Trp	Gln	
65					70					75					80	
atc	gaa	aac	cca	gaa	gtt	tcg	gtg	act	tac	tac	ctg	cct	tac	aag	tct	288
Ile	Glu	Asn	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Lys	Ser	
				85					90					95		
cca	ggg	atc	aat	gtg	gac	agt	tcc	tac	aag	aac	agg	ggc	cat	ctg	tcc	336
Pro	Gly	Ile	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Tyr	Lys	Asn	Arg	Gly	His	Leu	Ser	
			100					105					110			
ctg	gac	tcc	atg	aag	cag	ggt	aac	ttc	tct	ctg	tac	ctg	aag	aat	gtc	384
Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Gln	Gly	Asn	Phe	Ser	Leu	Tyr	Leu	Lys	Asn	Val	
		115					120					125				
acc	cct	cag	gat	acc	cag	gag	ttc	aca	tgc	cgg	gta	ttt	atg	aat	aca	432
Thr	Pro	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Phe	Met	Asn	Thr	

130	135	140	
gcc aca gag tta gtc aag atc ttg gaa gag gtg gtc agg ctg cgt gtg Ala Thr Glu Leu Val Lys Ile Leu Glu Glu Val Val Arg Leu Arg Val 145 150 155 160			480
gca gca aac ttc agt aca cct gtc atc agc acc tct gat agc tcc aac Ala Ala Asn Phe Ser Thr Pro Val Ile Ser Thr Ser Asp Ser Ser Asn 165 170 175			528
ccg ggc cag gaa cgt acc tac acc tgc atg tcc aag aat ggc tac cca Pro Gly Gln Glu Arg Thr Tyr Thr Cys Met Ser Lys Asn Gly Tyr Pro 180 185 190			576
gag ccc aac ctg tat tgg atc aac aca acg gac aat agc cta ata gac Glu Pro Asn Leu Tyr Trp Ile Asn Thr Thr Asp Asn Ser Leu Ile Asp 195 200 205			624
acg gct ctg cag aat aac act gtc tac ttg aac aag ttg ggc ctg tat Thr Ala Leu Gln Asn Asn Thr Val Tyr Leu Asn Lys Leu Gly Leu Tyr 210 215 220			672
gat gta atc agc aca tta agg ctc cct tgg aca tct cgt ggg gat gtt Asp Val Ile Ser Thr Leu Arg Leu Pro Trp Thr Ser Arg Gly Asp Val 225 230 235 240			720
ctg tgc tgc gta gag aat gtg gct ctc cac cag aac atc act agc att Leu Cys Cys Val Glu Asn Val Ala Leu His Gln Asn Ile Thr Ser Ile 245 250 255			768
agc cag gca gaa agt ttc act gga aat aac aca aag aac cca cag gaa Ser Gln Ala Glu Ser Phe Thr Gly Asn Asn Thr Lys Asn Pro Gln Glu 260 265 270			816
acc cac aat aat gag tta aaa gtc ctt gtc ccc gtc ctt gct gta ctg Thr His Asn Asn Glu Leu Lys Val Leu Val Pro Val Leu Ala Val Leu 275 280 285			864
gcg gca gcg gca ttc gtt tcc ttc atc ata tac aga cgc acg cgt ccc Ala Ala Ala Ala Phe Val Ser Phe Ile Ile Tyr Arg Arg Thr Arg Pro 290 295 300			912
cac cga agc tat aca gga ccc aag act gta cag ctt gaa ctt aca gac His Arg Ser Tyr Thr Gly Pro Lys Thr Val Gln Leu Glu Leu Thr Asp 305 310 315 320			960
cac gcc His Ala			966

<210> 7

<211> 322

<212> PRT

5 <213> ratón

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 322

<212> PRT

5 <213> ratón

<400> 8

```

Met Gln Leu Lys Cys Pro Cys Phe Val Ser Leu Gly Thr Arg Gln Pro
1           5           10           15
Val Trp Lys Lys Leu His Val Ser Ser Gly Phe Phe Ser Gly Leu Gly
20           25           30
Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ser Ser Leu Cys Ala Ala Ser Ala Glu Thr
35           40           45
Glu Val Gly Ala Met Val Gly Ser Asn Val Val Leu Ser Cys Ile Asp
50           55           60
Pro His Arg Arg His Phe Asn Leu Ser Gly Leu Tyr Val Tyr Trp Gln
65           70           75           80
Ile Glu Asn Pro Glu Val Ser Val Thr Tyr Tyr Leu Pro Tyr Lys Ser
85           90           95
Pro Gly Ile Asn Val Asp Ser Ser Tyr Lys Asn Arg Gly His Leu Ser
100          105          110
Leu Asp Ser Met Lys Gln Gly Asn Phe Ser Leu Tyr Leu Lys Asn Val
115          120          125
Thr Pro Gln Asp Thr Gln Glu Phe Thr Cys Arg Val Phe Met Asn Thr
130          135          140
Ala Thr Glu Leu Val Lys Ile Leu Glu Glu Val Val Arg Leu Arg Val
145          150          155          160
Ala Ala Asn Phe Ser Thr Pro Val Ile Ser Thr Ser Asp Ser Ser Asn
165          170          175
Pro Gly Gln Glu Arg Thr Tyr Thr Cys Met Ser Lys Asn Gly Tyr Pro
180          185          190
Glu Pro Asn Leu Tyr Trp Ile Asn Thr Thr Asp Asn Ser Leu Ile Asp
195          200          205
Thr Ala Leu Gln Asn Asn Thr Val Tyr Leu Asn Lys Leu Gly Leu Tyr
210          215          220
Asp Val Ile Ser Thr Leu Arg Leu Pro Trp Thr Ser Arg Gly Asp Val
225          230          235          240
Leu Cys Cys Val Glu Asn Val Ala Leu His Gln Asn Ile Thr Ser Ile
245          250          255
Ser Gln Ala Glu Ser Phe Thr Gly Asn Asn Thr Lys Asn Pro Gln Glu
260          265          270
Thr His Asn Asn Glu Leu Lys Val Leu Val Pro Val Leu Ala Val Leu
275          280          285
Ala Ala Ala Ala Phe Val Ser Phe Ile Ile Tyr Arg Arg Thr Arg Pro
290          295          300
His Arg Ser Tyr Thr Gly Pro Lys Thr Val Gln Leu Glu Leu Thr Asp
305          310          315          320
His Ala

```

<211> 306

<212> PRT

<213> ratón

<400> 9

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

<210> 10

<211> 327

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 10

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

275						280					285						
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		
290						295					300						
Xaa	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Thr	Xaa	Gly	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		
305						310					315					320	
Xaa	Glu	Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Xaa											
325																	

<210> 11

<211> 864

<212> ADN

5 <213> ratón

<220>

<221> CDS

<222> Complemento ((1) .. (864))

<400> 11

atg	cgg	ctg	ggc	agt	cct	gga	ctg	ctc	ttc	ctg	ctc	ttc	agc	agc	ctt	48
Met	Arg	Leu	Gly	Ser	Pro	Gly	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Ser	Leu	
1				5					10					15		
cga	gct	gat	act	cag	gag	aag	gaa	gtc	aga	gcg	atg	gta	ggc	agc	gac	96
Arg	Ala	Asp	Thr	Gln	Glu	Lys	Glu	Val	Arg	Ala	Met	Val	Gly	Ser	Asp	
			20					25					30			
gtg	gag	ctc	agc	tgc	gct	tgc	cct	gaa	gga	agc	cgt	ttt	gat	tta	aat	144
Val	Glu	Leu	Ser	Cys	Ala	Cys	Pro	Glu	Gly	Ser	Arg	Phe	Asp	Leu	Asn	
		35					40					45				
gat	gtt	tac	gta	tat	tgg	caa	acc	agt	gag	tcg	aaa	acc	gtg	gtg	acc	192
Asp	Val	Tyr	Val	Tyr	Trp	Gln	Thr	Ser	Glu	Ser	Lys	Thr	Val	Val	Thr	
	50					55					60					
tac	cac	atc	cca	cag	aac	agc	tcc	ttg	gaa	aac	gtg	gac	agc	cgc	tac	240
Tyr	His	Ile	Pro	Gln	Asn	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Val	Asp	Ser	Arg	Tyr	
65					70					75					80	
cgg	aac	cga	gcc	ctg	atg	tca	ccg	gcc	ggc	atg	ctg	cgg	ggc	gac	ttc	288
Arg	Asn	Arg	Ala	Leu	Met	Ser	Pro	Ala	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Asp	Phe	
				85					90					95		
tcc	ctg	cgc	ttg	ttc	aac	gtc	acc	ccc	cag	gac	gag	cag	aag	ttt	cac	336
Ser	Leu	Arg	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Pro	Gln	Asp	Glu	Gln	Lys	Phe	His	
			100					105					110			
tgc	ctg	gtg	ttg	agc	caa	tcc	ctg	gga	ttc	cag	gag	gtt	ttg	agc	gtt	384
Cys	Leu	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Leu	Gly	Phe	Gln	Glu	Val	Leu	Ser	Val	
		115					120					125				
gag	gtt	aca	ctg	cat	gtg	gca	gca	aac	ttc	agc	gtg	ccc	gtc	gtc	agc	432
Glu	Val	Thr	Leu	His	Val	Ala	Ala	Asn	Phe	Ser	Val	Pro	Val	Val	Ser	
	130					135					140					
gcc	ccc	cac	agc	ccc	tcc	cag	gat	gag	ctc	acc	ttc	acg	tgt	aca	tcc	480
Ala	Pro	His	Ser	Pro	Ser	Gln	Asp	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Cys	Thr	Ser	
145					150				155						160	
ata	aac	ggc	tac	ccc	agg	ccc	aac	gtg	tac	tgg	atc	aat	aag	acg	gac	528
Ile	Asn	Gly	Tyr	Pro	Arg	Pro	Asn	Val	Tyr	Trp	Ile	Asn	Lys	Thr	Asp	

	165	170	175	
aac agc ctg ctg gac cag gct ctg cag aat gac acc gtc ttc ttg aac				576
Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn				
	180	185	190	
atg cgg ggc ttg tat gac gtg gtc agc gtg ctg agg atc gca cgg acc				624
Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr				
	195	200	205	
ccc agc gtg aac att ggc tgc tgc ata gag aac gtg ctt ctg cag cag				672
Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln				
	210	215	220	
aac ctg act gtc ggc agc cag aca gga aat gac atc gga gag aga gac				720
Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp				
	225	230	235	240
aag atc aca gag aat cca gtc agt acc ggc gag aaa aac gcg gcc acg				768
Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr				
	245	250	255	
tgg agc atc ctg gct gtc ctg tgc ctg ctt gtg gtc gtg gcg gtg gcc				816
Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala				
	260	265	270	
ata ggc tgg gtg tgc agg gac cga tgc ctc caa cac agc tat gca ggt				864
Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly				
	275	280	285	

<210> 12

<211> 288

<212> PRT

5 <213> ratón

<400> 12

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

<210> 13

<211> 267

5 <212> PRT

<213> ser humano

<400> 13

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

<210> 14

<211> 276

5 <212> PRT

<213> ratón

<400> 14

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

<210> 15

<211> 280

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 15

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

<210> 16

<211> 1294

<212> ADN

<213> ser humano

5 <220>

<221> UTR en 5'

<222> (1) .. (199)

<220>

<221> CDS

10 <222> (200) .. (1105)

<400> 16

```

gctggtacgc ctgcaggtac cgggccggaa ttcccgggtc gacccacgcg tccgcccacg 60
cgtccgcggg agcgcagtta gagccgatct cccgcgcccc gaggttgctc ctctccgagg 120
tctcccgcgg ccgaagtctt cgcgcgcccc aggtctccgc gccccgaggt ctccgcggcc 180
cgaggtctcc gcccgccacc atg cgg ctg ggc agt cct gga ctg ctc ttc ctg 232
          Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu
              1              5              10

ctc ttc agc agc ctt cga gct gat act cag gag aag gaa gtc aga gcg 280
Leu Phe Ser Ser Leu Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala
              15              20              25

atg gta ggc agc gac gtg gag ctc agc tgc gct tgc cct gaa gga agc 328
Met Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser
              30              35              40

cgt ttt gat tta aat gat gtt tac gta tat tgg caa acc agt gag tcg 376
Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser
              45              50              55

aaa acc gtg gtg acc tac cac atc cca cag aac agc tcc ttg gaa aac 424
Lys Thr Val Val Thr Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn
              60              65              70              75

gtg gac agc cgc tac cgg aac cga gcc ctg atg tca ccg gcc ggc atg 472
Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met
              80              85              90

```

ctg cgg ggc gac ttc tcc ctg cgc ttg ttc aac gtc acc ccc cag gac	520
Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp	
95 100 105	
gag cag aag ttt cac tgc ctg gtg ttg agc caa tcc ctg gga ttc cag	568
Glu Gln Lys Phe His Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln	
110 115 120	
gag gtt ttg agc gtt gag gtt aca ctg cat gtg gca gca aac ttc agc	616
Glu Val Leu Ser Val Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser	
125 130 135	
gtg ccc gtc gtc agc gcc ccc cac agc ccc tcc cag gat gag ctc acc	664
Val Pro Val Val Ser Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr	
140 145 150 155	
ttc acg tgt aca tcc ata aac ggc tac ccc agg ccc aac gtg tac tgg	712
Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp	
160 165 170	
atc aat aag acg gac aac agc ctg ctg gac cag gct ctg cag aat gac	760
Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp	
175 180 185	
acc gtc ttc ttg aac atg cgg ggc ttg tat gac gtg gtc agc gtg ctg	808
Thr Val Phe Leu Asn Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu	
190 195 200	
agg atc gca cgg acc ccc agc gtg aac att ggc tgc tgc ata gag aac	856
Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn	
205 210 215	
gtg ctt ctg cag cag aac ctg act gtc ggc agc cag aca gga aat gac	904
Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp	
220 225 230 235	
atc gga gag aga gac aag atc aca gag aat cca gtc agt acc ggc gag	952
Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu	
240 245 250	
aaa aac gcg gcc acg tgg agc atc ctg gct gtc ctg tgc ctg ctt gtg	1000
Lys Asn Ala Ala Thr Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val	
255 260 265	
gtc gtg gcg gtg gcc ata ggc tgg gtg tgc agg gac cga tgc ctc caa	1048
Val Val Ala Val Ala Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln	
270 275 280	
cac agc tat gca ggt gcc tgg gct gtg agt ccg gag aca gag ctc act	1096
His Ser Tyr Ala Gly Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr	
285 290 295	
ggc cac gtt tgaccggagc tcaccgccca gagcgtggac agggcttccg	1145
Gly His Val	
300	
tgagacgccca ccgtgagagg ccaggtggca gcttgagcat ggactcccag actgcagggg	1205
agcacttggg gcagccccca gaaggaccac tgctggatcc cagggagaac ctgctggcgt	1265
tggetgtgat cctggaatga ggccctttc	1294

<210> 17

<211> 302

<212> PRT

<213> ser humano

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 302

<212> PRT

<213> ser humano

5 <400> 18

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

<210> 19

<211> 322

<212> PRT

<213> ratón

<400> 19

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

His	Arg	Ser	Tyr	Thr	Gly	Pro	Lys	Thr	Val	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Asp
305					310					315					320

His Ala

<210> 20

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 20

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

Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
260 265 270

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Ala
275 280 285

Val Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
290 295 300

Arg Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Val Xaa
305 310 315 320

Xaa Glu Xaa Xaa Leu Thr Xaa His Xaa
325

<210> 21

<211> 1370

<212> ADN

5 <213> ser humano

<220>

<221> UTR en 5'

<222> (1) .. (165)

<220>

10 <221> CDS

<222> (166) .. (762)

<400> 21

```

aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctctaa tacgactcac 60
tatagggaaa gctggtacgc ctgcaggtac cgggtccggaa ttcccgggtc gaccacgcg 120
tccgtgaaca ctgaacgcga ggactgttaa ctgtttctgg caaac atg aag tca gcc 177
                                     Met Lys Ser Gly
                                     1

ctc tgg tat ttc ttt ctc ttc tgc ttg cgc att aaa gtt tta aca gga 225
Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly
  5                10                15                20

gaa atc aat ggt tct gcc aat tat gag atg ttt ata ttt cac aac gga 273
Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile Phe His Asn Gly
                25                30                35

ggg gta caa att tta tgc aaa tat cct gac att gtc cag caa ttt aaa 321
Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys
                40                45                50

atg cag ttg ctg aaa ggg ggg caa ata ctc tgc gat ctc act aag aca 369
Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr
                55                60                65

aaa gga agt gga aac aca gtg tcc att aag agt ctg aaa ttc tgc cat 417
Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His
  70                75                80

tct cag tta tcc aac aac agt gtc tct ttt ttt cta tac aac ttg gac 465
Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp
  85                90                95                100

cat tct cat gcc aac tat tac ttc tgc aac cta tca att ttt gat cct 513

```

His	Ser	His	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser	Ile	Phe	Asp	Pro	
				105					110					115		
cct	cct	ttt	aaa	gta	act	ctt	aca	gga	gga	tat	ttg	cat	att	tat	gaa	561
Pro	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Tyr	Leu	His	Ile	Tyr	Glu	
			120					125					130			
tca	caa	ctt	tgt	tgc	cag	ctg	aag	ttc	tgg	tta	ccc	ata	gga	tgt	gca	609
Ser	Gln	Leu	Cys	Cys	Gln	Leu	Lys	Phe	Trp	Leu	Pro	Ile	Gly	Cys	Ala	
		135					140					145				
gcc	ttt	gtt	gta	gtc	tgc	att	ttg	gga	tgc	ata	ctt	att	tgt	tgg	ctt	657
Ala	Phe	Val	Val	Val	Cys	Ile	Leu	Gly	Cys	Ile	Leu	Ile	Cys	Trp	Leu	
	150					155					160					
aca	aaa	aag	aag	tat	tca	tcc	agt	gtg	cac	gac	cct	aac	ggg	gaa	tac	705
Thr	Lys	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	His	Asp	Pro	Asn	Gly	Glu	Tyr	
165					170					175					180	
atg	ttc	atg	aga	gca	gtg	aac	aca	gcc	aaa	aaa	tct	aga	ctc	aca	gat	753
Met	Phe	Met	Arg	Ala	Val	Asn	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Asp	
			185					190						195		
gtg	acc	cta	taatatggaa	ctctggcacc	caggcatgaa	gcacgttggc										802
Val	Thr	Leu														
cagttttcct	caacttgaag	tgcaagattc	tcttatttcc	gggaccacgg	agagtctgac											862
ttaactacat	acatcttctg	ctggtgtttt	gttcaatctg	gaagaatgac	tgtatcagtc											922
aatggggatt	taaacagact	gccttgggtac	tgccgagtc	tctcaaaaca	aacaccctct											982
tgcaaccagc	tttgagaaaa	gcccagctcc	tgtgtgctca	ctgggagtgg	aatccctgtc											1042
tccacatctg	ctcctagcag	tgcattcagcc	agtaaaacaa	acacatttac	aagaaaaatg											1102
ttttaaagat	gccaggggta	ctgaatctgc	aaagcaaagt	agcagccaag	gaccagcatc											1162
tgteccgcatt	tcactatcat	actacctctt	ctttctgtag	ggatgagaat	tcctctttta											1222
atcagtcaag	ggagatgctt	caaagctgga	gctattttat	ttctgagatg	ttgatgtgaa											1282
ctgtacatta	gtacatactc	agtactctcc	ttcaattgct	gaaccccagt	tgaccatttt											1342
accaagactt	tagatgcttt	cttgtgccc														1370

<210> 22

<211> 199

<212> PRT

5 <213> ser humano

<400> 22

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

<210> 23

<211> 199

5 <212> PRT

<213> ser humano

<400> 23

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

<210> 24

<211> 200

5 <212> PRT

<213> ratón

<400> 24

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

<210> 25

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 25

accatgcggc tgggcagtc tggc

24

10 <210> 26

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 26	
	tggtgaccta ccacatccca cag	23
	<210> 27	
5	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
10	<400> 27	
	tccgatgtca ttccctgtct ggc	23
	<210> 28	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 28	
	gctctgtctc cggactcaca gccc	24
20	<210> 29	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 29	
	gtggcagcaa acttcagcgt gcccgtcg	28
	<210> 30	
	<211> 28	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 30	
35	cccaacgtgt actggatcaa taagacgg	28

	<210> 31		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 31		
	gcgtgctgag gatcgcacgg acccccag		28
	<210> 32		
10	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
15	<400> 32		
	gcctctagaa agagctggga c		21
	<210> 33		
	<211> 21		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 33		
	cgccgtgttc catttatgag c		21
25	<210> 34		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 34		
	gcatatttat gaatccca		18
	<210> 35		
	<211> 18		
35	<212> ADN		

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 35

5 ⁻⁻⁻⁻⁻⁻⁻⁻⁻⁻⁻⁻ **actattaggg tcatgcac**

18

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de:
 - a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la figura 12A (SEQ ID NO: 16);
 - b) la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido expuesto en la figura 12A (SEQ ID NO: 17) de los residuos 1-302, o de los residuos 19-302, 20-302, 21-302, 22-302, 24-302 ó 28-302; o
 - c) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a) o (b).
2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a una secuencia de control de la expresión.
3. Célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2.
4. Célula huésped según la reivindicación 3, que es una célula eucariota.
5. Célula huésped según la reivindicación 3, que es una célula procariota.
6. Procedimiento para producir un polipéptido codificado por el ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2 que comprende hacer crecer un cultivo de la célula huésped según la reivindicación 3 en un medio de cultivo adecuado y aislar el polipéptido del cultivo.
7. Polipéptido producido mediante el procedimiento según la reivindicación 6.
8. Polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1.
9. Polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de:
 - a) la secuencia de aminoácidos expuesta en la figura 3A (SEQ ID NO: 12) o la figura 12A (SEQ ID NO: 17); o
 - b) la secuencia de aminoácidos madura expuesta en la figura 3A (SEQ ID NO: 12) que comprende un extremo amino-terminal maduro en cualquiera de los residuos 19, 20, 21, 22, 24 ó 28, o la figura 12A (SEQ ID NO: 17) que comprende un extremo amino-terminal maduro en cualquiera de los residuos 19, 20, 21, 22, 24 ó 28.
10. Anticuerpo o fragmento del mismo, que se une al polipéptido según la reivindicación 7.
11. Anticuerpo o fragmento del mismo, que se une al polipéptido según la reivindicación 8.
12. Anticuerpo o fragmento del mismo, que se une al polipéptido según la reivindicación 9.
13. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 10, 11 ó 12, que es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.
14. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 10, 11 ó 12, que es un anticuerpo humano o fragmento del mismo.
15. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 10, 11 ó 12, que es un anticuerpo humanizado o injertado con CDR o un fragmento del mismo.
16. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 10, que inhibe la unión del polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9 al polipéptido maduro expuesto en la figura 13A.
17. Composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9 y un portador, adyuvante, solubilizante, estabilizador o antioxidante farmacéuticamente aceptable.
18. Polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9, que se ha modificado químicamente.
19. Polipéptido según la reivindicación 18, que se ha modificado químicamente mediante la adición de uno o más polímeros solubles en agua.
20. Polipéptido de fusión que comprende el polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9 fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.
21. Polipéptido de fusión según la reivindicación 20, en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo.
22. Uso de un polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9 para la preparación de un medicamento para tratar,

prevenir o mejorar un trastorno mediado por células T.

23. Método de diagnóstico de un trastorno mediado por células T o una susceptibilidad a un trastorno mediado por células T en un animal que comprende:
 - a) determinar la presencia o cantidad de expresión del polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9; y
 - 5 b) diagnosticar un trastorno mediado por células T o una susceptibilidad a un trastorno mediado por células T basándose en la presencia o cantidad de expresión del polipéptido.
24. Método de identificación de una molécula de prueba que se une al polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9 que comprende:
 - a) poner en contacto el polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9 con una molécula de prueba; y
 - 10 b) determinar el grado de unión del polipéptido a la molécula de prueba.
25. Método según la reivindicación 24, que comprende además determinar la actividad del polipéptido cuando está unido a la molécula de prueba.
26. Uso de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2 para la preparación de un medicamento para regular la activación o proliferación de células T en un animal.
- 15 27. Mamífero no humano transgénico que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2.
28. Uso de un antagonista para la preparación de un medicamento para suprimir una respuesta inmunitaria en un animal, en el que el antagonista es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9.
- 20 29. Polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9 para tratar, prevenir o mejorar un trastorno mediado por células T.
30. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2 para su uso en la regulación de la activación o proliferación de células T en un animal.
31. Antagonista para suprimir una respuesta inmunitaria en un animal, en el que el antagonista es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9.
- 25 32. Uso según la reivindicación 28 para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.
33. Antagonista según la reivindicación 31 para su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.
34. Uso según la reivindicación 32 o antagonista según la reivindicación 33, en el que el trastorno autoinmunitario es uno cualquiera de artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, diabetes y lupus eritematoso sistémico.
- 30 35. Uso de un antagonista para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria crónica, en el que el antagonista es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al polipéptido según la reivindicación 7, 8 ó 9.

FIGURA 1A

ATG AAG CCG TAC TTC TGC CGT GTC TTT GTC TTC TGC TTC CTA ATC	45
M K P Y F C R V F V F C F L I	
5 10 15	
AGA CTT TTA ACA GGA GAA ATC AAT GGC TCG GCC GAT CAT AGG ATG	90
R L L T G E I N G S A D H R M	
20 25 30	
TTT TCA TTT CAC AAT GGA GGT GTA CAG ATT TCT TGT AAA TAC CCT	135
F S F H N G G V Q I S C K Y P	
35 40 45	
GAG ACT GTC CAG CAG TTA AAA ATG CGA TTG TTC AGA GAG AGA GAA	180
E T V Q Q L K M R L F R E R E	
50 55 60	
GTC CTC TGC GAA CTC ACC AAG ACC AAG GGA AGC GGA AAT GCG GTG	225
V L C E L T K T K G S G N A V	
65 70 75	
TCC ATC AAG AAT CCA ATG CTC TGT CTA TAT CAT CTG TCA AAC AAC	270
S I K N P M L C L Y H L S N N	
80 85 90	
AGC GTC TCT TTT TTC CTA AAC AAC CCA GAC AGC TCC CAG GGA AGC	315
S V S F F L N N P D S S Q G S	
95 100 105	
TAT TAC TTC TGC AGC CTG TCC ATT TTT GAC CCA CCT CCT TTT CAA	360
Y Y F C S L S I F D P P P F Q	
110 115 120	
GAA AGG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CAT ATT TAT GAA TCC CAG	405
E R N L S G G Y L H I Y E S Q	
125 130 135	
CTC TGC TGC CAG CTG AAG CTC TGG CTA CCC GTA GGG TGT GCA GCT	450
L C C Q L K L W L P V G C A A	
140 145 150	
TTC GTT GTG GTA CTC CTT TTT GGA TGC ATA CTT ATC ATC TGG TTT	495
F V V V L L F G C I L I I W F	
155 160 165	
TCA AAA AAG AAA TAC GGA TCC AGT GTG CAT GAC CCT AAT AGT GAA	540
S K K K Y G S S V H D P N S E	
170 175 180	
TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC AAA AAG TCT AGA CTT	585
Y M F M A A V N T N K K S R L	
185 190 195	
GCA GGT GTG ACC TCA	600
A G V T S	
200	

FIGURA 1B

mCRP1	MKPYFCRVFV	FCFLIRLL--	-----TGEIN	GS-----ADHR	MFSFHNGGVQ	39
mCD28	MT-----	----LRLFL	ALNFFSVQVT	ENKILVKQSP	LLVVDSNEVS	38
Consenso	M.....	RLL..			V.	
mCRP1	ISCKYPETV-	-QQLKMRLFR	--EREV-LCE	LTKTKGSGNA	VSIKNPMLCL	24
mCD28	LSCRYSYNLL	AKEFRASLYK	GVNSDVEVCV	GNGNFTYQPO	FRSNAEFNCD	28
Consenso	.SC.Y.....	L..	V..C.		C.	
mCRP1	YHLSNNSVSF	FLNNPDSSQG	SYFCSLSIF	DPPPFQERNL	SGGYL-HIYE	133
mCD28	GDFDNETVTF	RLWNLHVNHT	DIYFCKIEFM	YPPPYLDNER	SNGTIIHIKE	138
Consenso	...N..V.F	.L.N.....	..YFC.....	.PPP.....	S.G...HI.E	
mCRP1	SQLC---CQL	KL-W-LPVGC	AA-FVVLLF	GCIL-IIWFS	KKKY-----GS	172
mCD28	KHLCHTQSSP	KLFWALVVVA	GVLFYGLLV	TVALCVIWTN	SRNRLLQVT	188
Consenso	..LC.....	KL.W.L.V..	...F...LL.	L..IW..		
mCRP1	SVH-DPNSEY	MFMAAVNTNK	KSR-LAGVTS			200
mCD28	TMNMTPRRPG	LTRKPYQPYA	PARDFAAYRP			218
Consenso	P....		..R..A....	...		

FIGURA 2A

ATG CAG CTA AAG TGT CCC TGT TTT GTG TCC TTG GGA ACC AGG CAG	45
M Q L K C P C F V S L G T R Q	15
CCT GTT TGG AAG AAG CTC CAT GTT TCT AGC GGG TTC TTT TCT GGT	90
P V W K K L H V S S G F F S G	30
CTT GGT CTG TTC TTG CTG CTG TTG AGC AGC CTC TGT GCT GCC TCT	135
L G L F L L L L S S L C A A S	45
GCA GAG ACT GAA GTC GGT GCA ATG GTG GGC AGC AAT GTG GTG CTC	180
A E T E V G A M V G S N V V L	60
AGC TGC ATT GAC CCC CAC AGA CGC CAT TTC AAC TTG AGT GGT CTG	225
S C I D P H R R H F N L S G L	75
TAT GTC TAT TGG CAA ATC GAA AAC CCA GAA GTT TCG GTG ACT TAC	270
Y V Y W Q I E N P E V S V T Y	90
TAC CTG CCT TAC AAG TCT CCA GGG ATC AAT GTG GAC AGT TCC TAC	315
Y L P Y K S P G I N V D S S Y	105
AAG AAC AGG GGC CAT CTG TCC CTG GAC TCC ATG AAG CAG GGT AAC	360
K N R G H L S L D S M K Q G N	120
TTC TCT CTG TAC CTG AAG AAT GTC ACC CCT CAG GAT ACC CAG GAG	405
F S L Y L K N V T P Q D T Q E	135
TTC ACA TGC CGG GTA TTT ATG AAT ACA GCC ACA GAG TTA GTC AAG	450
F T C R V F M N T A T E L V K	150
ATC TTG GAA GAG GTG GTC AGG CTG CGT GTG GCA GCA AAC TTC AGT	495
I L E E V V R L R V A A N F S	165
ACA CCT GTC ATC AGC ACC TCT GAT AGC TCC AAC CCG GGC CAG GAA	540
T P V I S T S D S S N P G Q E	180
CGT ACC TAC ACC TGC ATG TCC AAG AAT GGC TAC CCA GAG CCC AAC	585
R T Y T C M S K N G Y P E P N	195
CTG TAT TGG ATC AAC ACA ACG GAC AAT AGC CTA ATA GAC ACG GCT	630
L Y W I N T T D N S L I D T A	210
CTG CAG AAT AAC ACT GTC TAC TTG AAC AAG TTG GGC CTG TAT GAT	675
L Q N N T V Y L N K L G L Y D	225
GTA ATC AGC ACA TTA AGG CTC CCT TGG ACA TCT CGT GGC GAT GTT	720
V I S T L R L P W T S R G D V	240

FIGURA 2A (Continuación)

CTG	TGC	TGC	GTA	GAG	AAT	GTG	GCT	CTC	CAC	CAG	AAC	ATC	ACT	AGC	755
L	C	C	V	E	N	V	A	L	H	Q	N	I	T	S	
				245					250					255	
ATT	AGC	CAG	GCA	GAA	AGT	TTC	ACT	GGA	AAT	AAC	ACA	AAG	AAC	CCA	810
I	S	Q	A	E	S	F	T	G	N	N	T	K	N	P	
				260					265					270	
CAG	GAA	ACC	CAC	AAT	AAT	GAG	TTA	AAA	GTC	CTT	GTC	CCC	GTC	CTT	855
Q	E	T	H	N	N	E	L	K	V	L	V	P	V	L	
				275					280					285	
GCT	GTA	CTG	GCG	GCA	GCG	GCA	TTC	GTT	TCC	TTC	ATC	ATA	TAC	AGA	900
A	V	L	A	A	A	A	F	V	S	F	I	I	Y	R	
				290					295					300	
CGC	ACG	CGT	CCC	CAC	CGA	AGC	TAT	ACA	GGA	CCC	AAG	ACT	GTA	CAG	945
R	T	R	P	H	R	S	Y	T	G	P	K	T	V	Q	
				305					310					315	
CTT	GAA	CTT	ACA	GAC	CAC	GCC									966
L	E	L	T	D	H	A									
				320		322									

FIGURA 2B

mB7RP1	MQLKPCFVS	LGTRQPVWKK	LHVSSGFFSG	LGLFLLLLS-	SLCAASAETE	49
mCD80	MA--CNC--Q	LMQDTPL---	LKFPCPRI-	L-LFVLLIRL	SQVSSDVDEQ	41
Consenso	M...C.C...	L....P....	L.....	L.LF.LL...	S.....	
mB7RP1	VGAMVGSNVV	LSCIDPHRRK	FNLSGLVYVW	QIENPEVSVT	YYLPYKSPGI	99
mCD80	LSKSVKDKVL	LPC-RYNSPH	EDESEDRIYW	QKHDKVW---	--LSVTAGKL	85
Consenso	...V...V.	L.C.....H	...S....YW	Q...V...	..L.....	
mB7RP1	NVDSSYKVRG	HLSLDSMKQG	NFSLYLKQVT	PQDTQEFTCR	VFMNTATELV	149
mCD80	KVWFYKVR-	--TL--YDNT	TYSLIILGLV	LSDRGTYSYCV	VQKKERGTYE	130
Consenso	.V...YKVR.	...L.....	..SL.....	..D....C.	V.....	
mB7RP1	KILEEVVRLR	VAANFSTPVI	STSDSSNPGQ	ERTYTCMSKN	GYPEPNLYWI	199
mCD80	VGHLLALVKS	IKADFSTPNI	TESGNPSADT	KRI-TCFASG	GFPKPRFSWL	179
Consenso	...V.L.	...A.FSTP.I	..S.....	.R..TC...	G.P.P...W.	
mB7RP1	-NTTNSLID	TALQNTTVYL	NKLGLYDVIS	TLRLPWTSRG	DVLCCVENVA	248
mCD80	ENGRELPGIN	TTISQDPESE	LYTISSQLDF	NTTRNRTIKC	LIKYGDAHVS	229
Consenso	.N.....I.	T.....		T...	V.	
mB7RP1	LHQNITSISQ	AESFTGNNTK	NPOETHNNEL	KVLVPVLAVL	A-AAAFVSFI	297
mCD80	EDFTWEKPPE	DPPDSKNTLV	LFGAGFGAVI	TVVVIVVIK	CFCKHRSCFR	279
Consenso		N...		.V.V.V....	F.	
mB7RP1	IYRTR-PHR	SYT-GPKTVQ	LELTDHA			322
mCD80	RNEASRETN	SLTFGPPEAL	AEQTVFL			306
Consenso	...R...	S.T.GP...	.E.T...			

FIGURA 3A

ATG	CGG	CTG	GGC	AGT	CCT	GGA	CTG	CTC	TTC	CTG	CTC	TTC	AGC	AGC	45
M	R	L	G	S	P	G	L	L	F	L	L	F	S	S	
				5					10					15	
CTT	CGA	GCT	GAT	ACT	CAG	GAG	AAG	GAA	GTC	AGA	GCG	ATG	GTA	GGC	90
L	R	A	D	T	Q	E	K	E	V	R	A	M	V	G	
				20					25					30	
AGC	GAC	GTG	GAG	CTC	AGC	TGC	GCT	TGC	CCT	GAA	GGA	AGC	CGT	TTT	135
S	D	V	E	L	S	C	A	C	P	E	G	S	R	F	
				35					40					45	
GAT	TTA	AAT	GAT	GTT	TAC	GTA	TAT	TGG	CAA	ACC	AGT	GAG	TCG	AAA	180
D	L	N	D	V	Y	V	Y	W	Q	T	S	E	S	K	
				50					55					60	
ACC	GTG	GTG	ACC	TAC	CAC	ATC	CCA	CAG	AAC	AGC	TCC	TTG	GAA	AAC	225
T	V	V	T	Y	H	I	P	Q	N	S	S	L	E	N	
				65					70					75	
GTG	GAC	AGC	CGC	TAC	CGG	AAC	CGA	GCC	CTG	ATG	TCA	CCG	GCC	GGC	270
V	D	S	R	Y	R	N	R	A	L	M	S	P	A	G	
				80					85					90	
ATG	CTG	CGG	GGC	GAC	TTC	TCC	CTG	CGC	TTG	TTC	AAC	GTC	ACC	CCC	315
M	L	R	G	D	F	S	L	R	L	F	N	V	T	P	
				95					100					105	
CAG	GAC	GAG	CAG	AAG	TTT	CAC	TGC	CTG	GTG	TTG	AGC	CAA	TCC	CTG	360
Q	D	E	Q	K	F	H	C	L	V	L	S	Q	S	L	
				110					115					120	
GGA	TTC	CAG	GAG	GTT	TTG	AGC	GTT	GAG	GTT	ACA	CTG	CAT	GTG	GCA	405
G	F	Q	E	V	L	S	V	E	V	T	L	H	V	A	
				125					130					135	
GCA	AAC	TTC	AGC	GTG	CCC	GTC	GTC	AGC	GCC	CCC	CAC	AGC	CCC	TCC	450
A	N	F	S	V	P	V	V	S	A	P	H	S	P	S	
				140					145					150	
CAG	GAT	GAG	CTC	ACC	TTC	ACG	TGT	ACA	TCC	ATA	AAC	GGC	TAC	CCC	495
Q	D	E	L	T	F	T	C	T	S	I	N	G	Y	P	
				155					160					165	
AGG	CCC	AAC	GTG	TAC	TGG	ATC	AAT	AAG	ACG	GAC	AAC	AGC	CTG	CTG	540
R	P	N	V	Y	W	I	N	K	T	D	N	S	L	L	
				170					175					180	
GAC	CAG	GCT	CTG	CAG	AAT	GAC	ACC	GTC	TTC	TTG	AAC	ATG	CGG	GGC	585
D	Q	A	L	Q	N	D	T	V	F	L	N	M	R	G	
				185					190					195	
TTG	TAT	GAC	GTG	GTC	AGC	GTG	CTG	AGG	ATC	GCA	CGG	ACC	CCC	AGC	630
L	Y	D	V	V	S	V	L	R	I	A	R	T	P	S	
				200					205					210	
GTG	AAC	ATT	GGC	TGC	TGC	ATA	GAG	AAC	GTG	CTT	CTG	CAG	CAG	AAC	675
V	N	I	G	C	C	I	E	N	V	L	L	Q	Q	N	
				215					220					225	
CTG	ACT	GTC	GGC	AGC	CAG	ACA	GGA	AAT	GAC	ATC	GGA	GAG	AGA	GAC	720
L	T	V	G	S	Q	T	G	N	D	I	G	E	R	D	
				230					235					240	

FIGURA 3A (Continuación)

AAG	ATC	ACA	GAG	AAT	CCA	GTC	AGT	ACC	GGC	GAG	AAA	AAC	GCG	GCC	765
K	I	T	E	N	P	V	S	T	G	E	K	N	A	A	
				245					250					255	
ACG	TGG	AGC	ATC	CTG	GCT	GTC	CTG	TGC	CTG	CTT	GTG	GTC	GTG	GCG	910
T	W	S	I	L	A	V	L	C	L	L	V	V	V	A	
				260					265					270	
GTG	GCC	ATA	GGC	TGG	GTG	TGC	AGG	GAC	CGA	TGC	CTC	CAA	CAC	AGC	855
V	A	I	G	W	V	C	R	D	R	C	L	Q	H	S	
				275					280					285	
TAT	GCA	GGT													864
Y	A	G													
			288												

FIGURA 3B

hB7RP1	EKEVRAMVGS	DVELSCACPE	GSRFDLNDVY	VYWQTSSEKT	VVTYHI?QNS	30
mB7RP1	ETEVGAMVGS	NVVLSCIDPH	RRHFNLSGLY	VYWQIENPEV	SVTYLPLPKS	30
Consenso	E.EV.AMVGS	.V.LSC..P.	#..F.L..Y	VYWQ.....	.VTY..P..S	
hB7RP1	SLENVDSRYR	NRALMSPAGN	LRGDFSLRLF	NVTPQDEQKF	HCLVLSQ-SL	99
mB7RP1	PGINVDSSYK	NRGHLSDSM	KQGNFSLYLK	NVTPQDTQEF	TCRVFMNTAT	100
Consenso	...NVDS.Y.	NR...S...M	..G.FSL.L.	NVTPQD.Q.F	.C.V.....	
hB7RP1	GFQEVLSVEV	TLHVAANFSV	PVVSAPHSPS	Q-DELTFTCT	SINGYPRENV	143
mB7RP1	ELVKILEEVV	RLRVAANFST	PVISTSDSSN	PGQERTYTCM	SKNGYPEPNL	150
Consenso	L...V	.L.VAANFS.	PV.S...S..	...E.T.TC.	S.NGY.P.N.	
hB7RP1	YWINKTDNSL	LDQALQNDTV	FLNMRGLYDV	VSVLRIARTP	SVNIGCCIEH	198
mB7RP1	YWINTTDNSL	IDTALQNNTV	YLNKLGLYDV	ISTLRLPWTs	RGDVLCCVEN	200
Consenso	YWIN.TDNSL	.D.ALQN.TV	.LN..GLYDV	.S.LR...T.	CC.EN	
hB7RP1	VLLQONLTVG	SQTGNDIGER	DKITENPVST	GEKNAATWSI	LAVLCLLVVV	248
mB7RP1	VALHQNITSI	SQAESFTGNN	TKNPQETHNN	ELKVLV--PV	LAVLAAAFAV	248
Consenso	V.L.QN.T..	SQ...F..G..	.K....K...	...K...7...	LAVL.....V	
hB7RP1	AVAIGWVCRD	RCLQHSYAG				257
mB7RP1	SFIIYR--RT	R-PHRSYTGp	KTVQLELTDH	A		276
Consenso	...I...R.	R...SY.G.				

Figura 4A

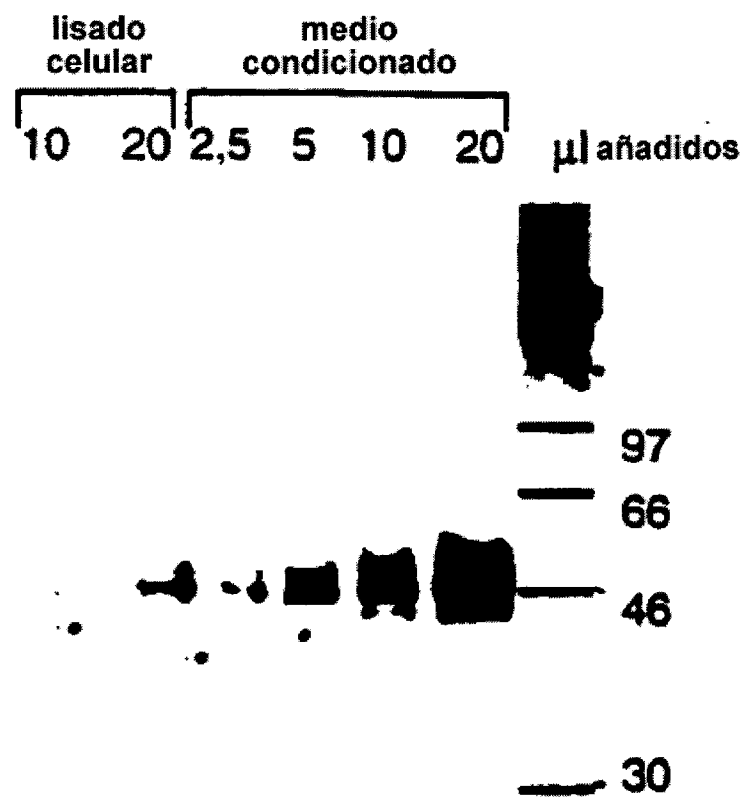


Figura 4B

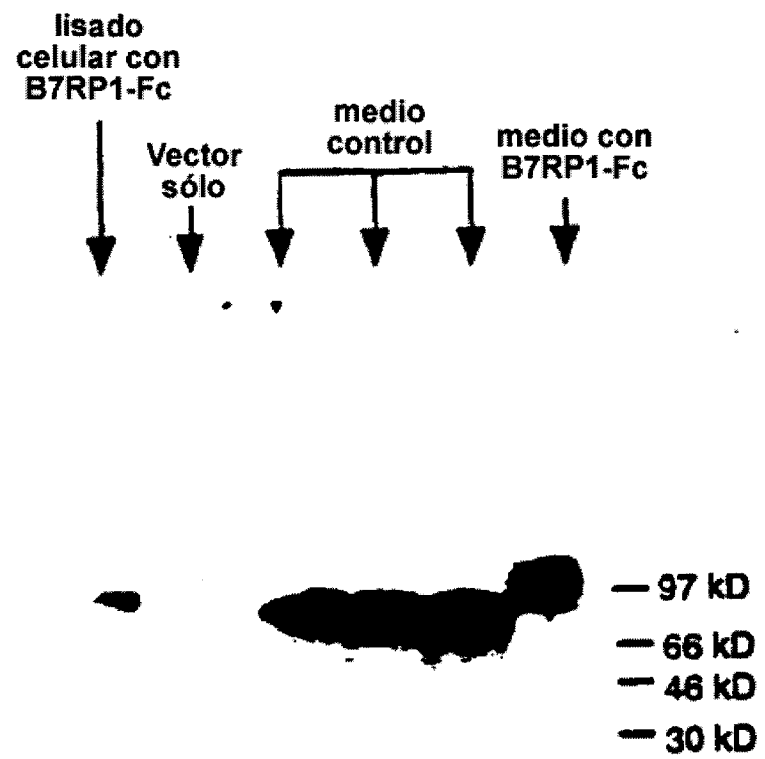


Figura 5

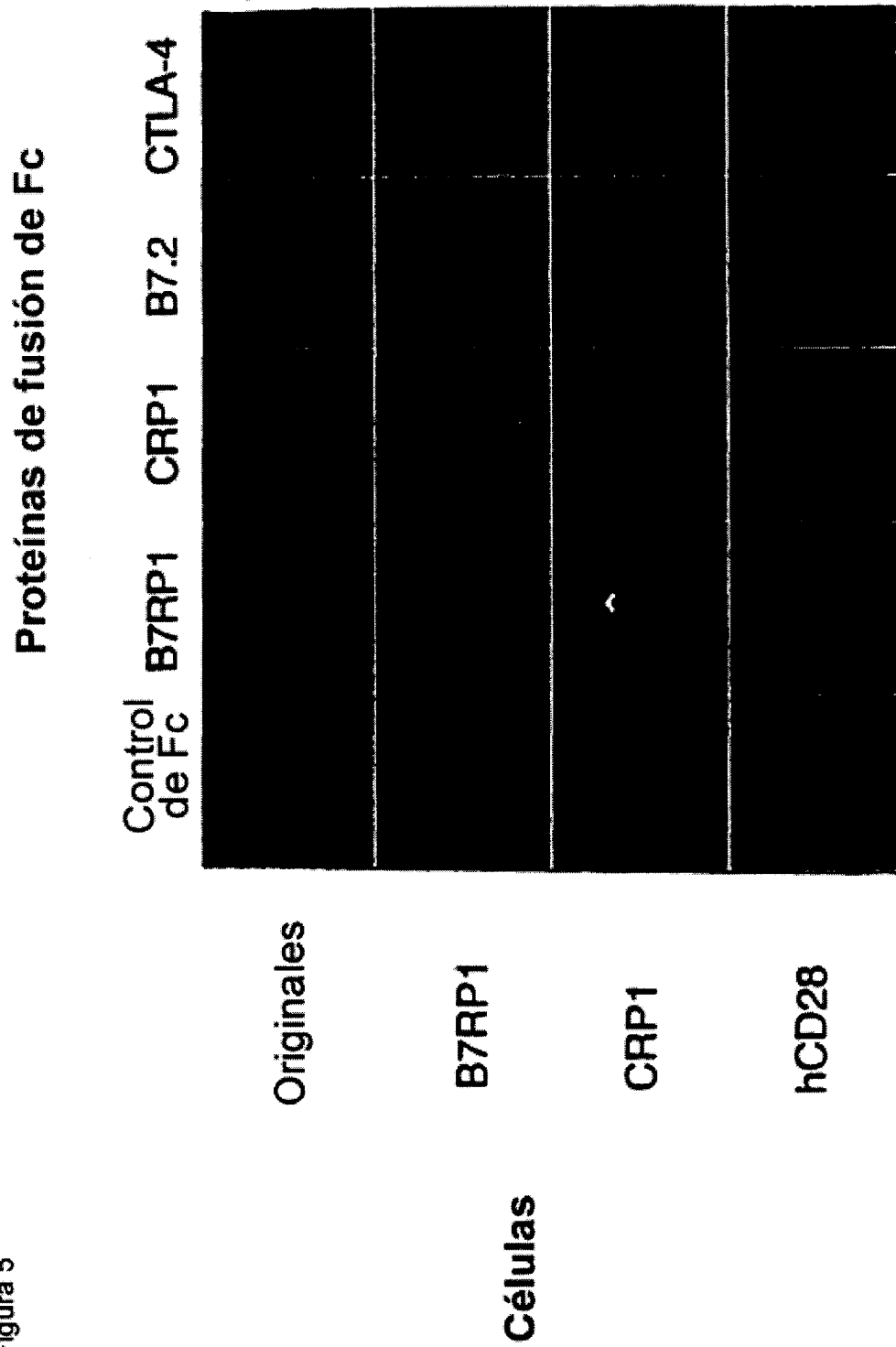


Figura 6

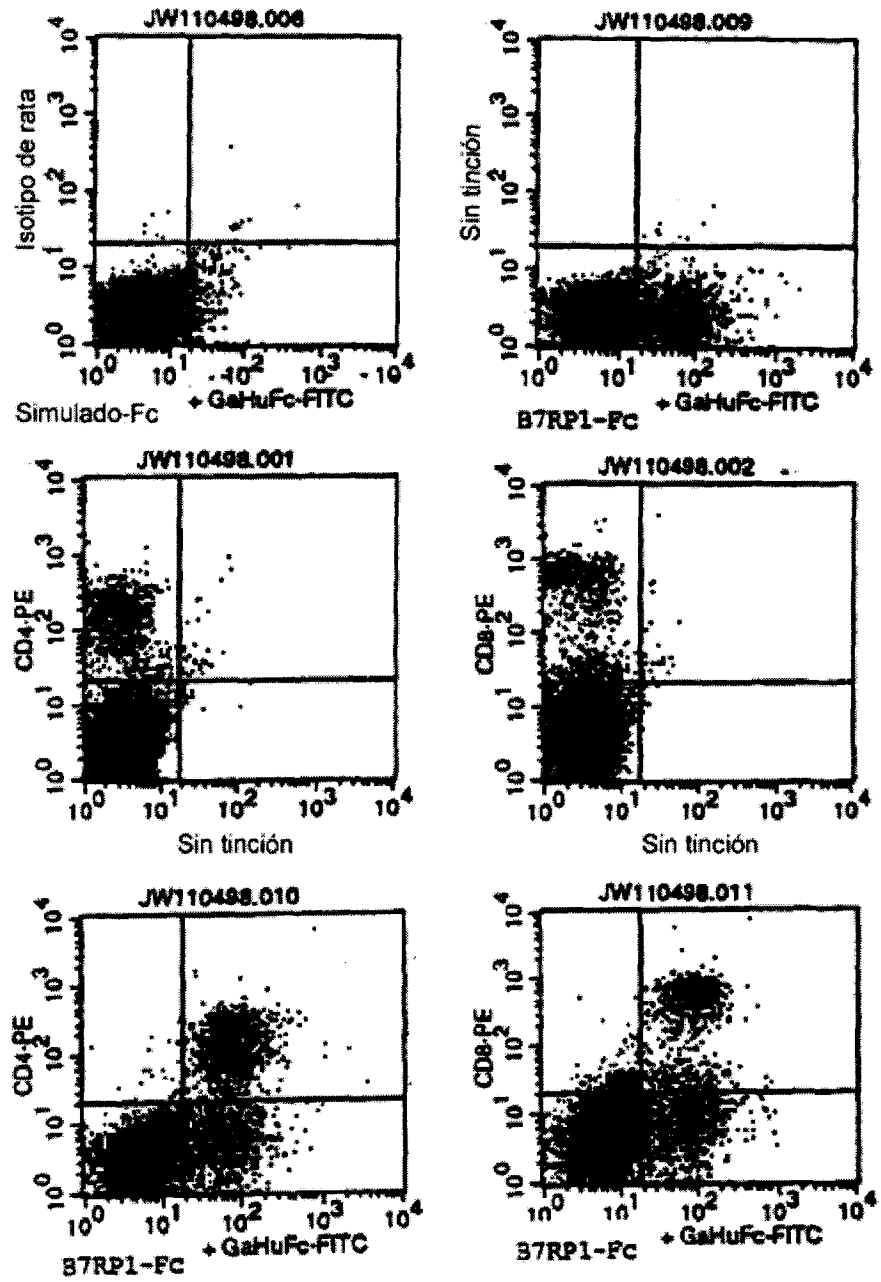


Figura 7

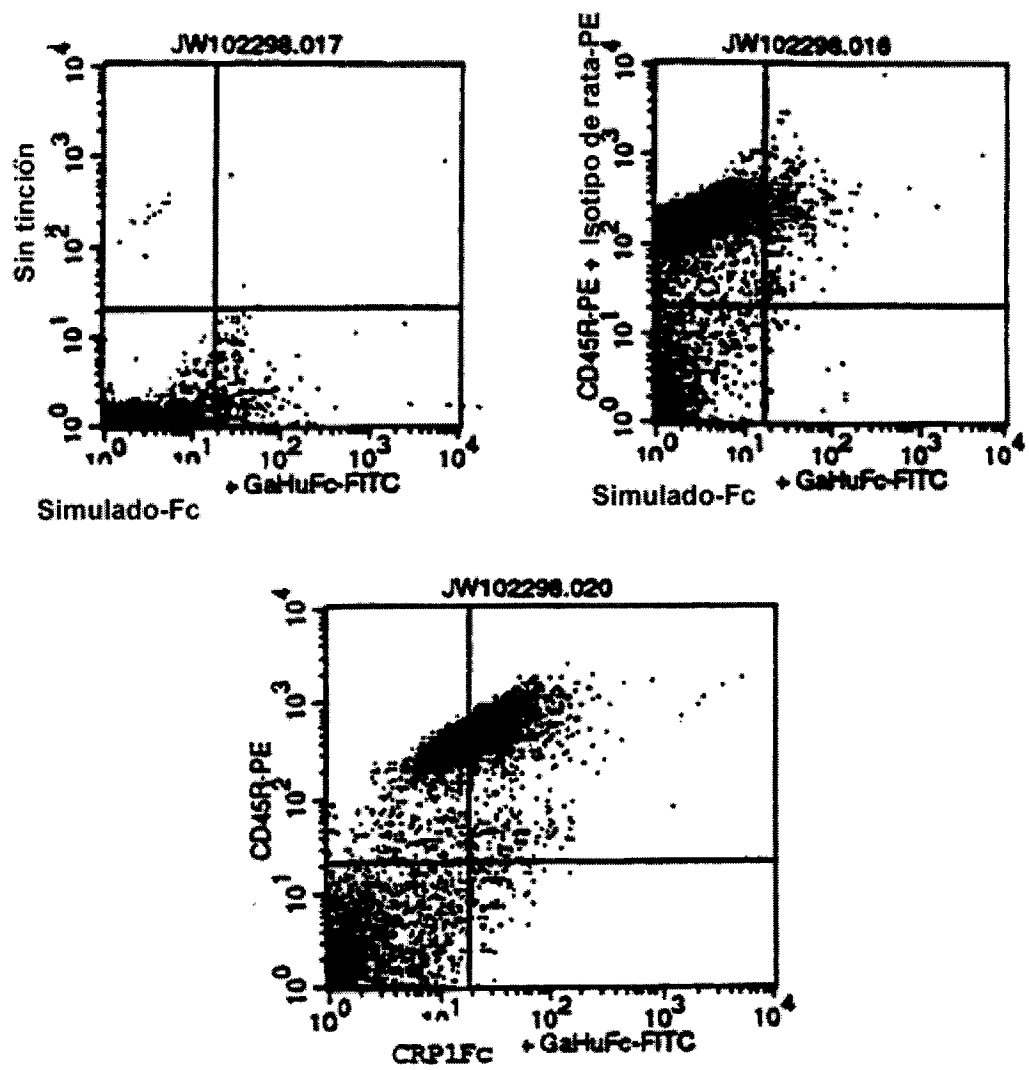


Figura 8

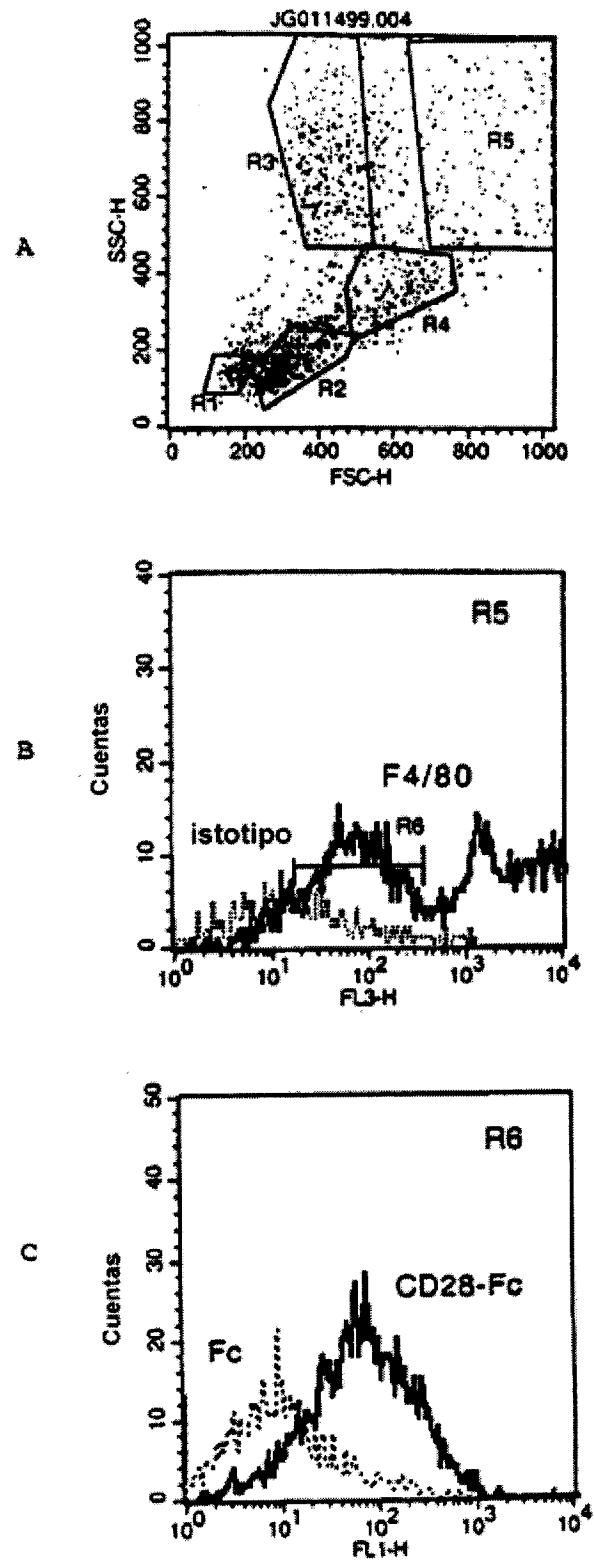


Figura 9

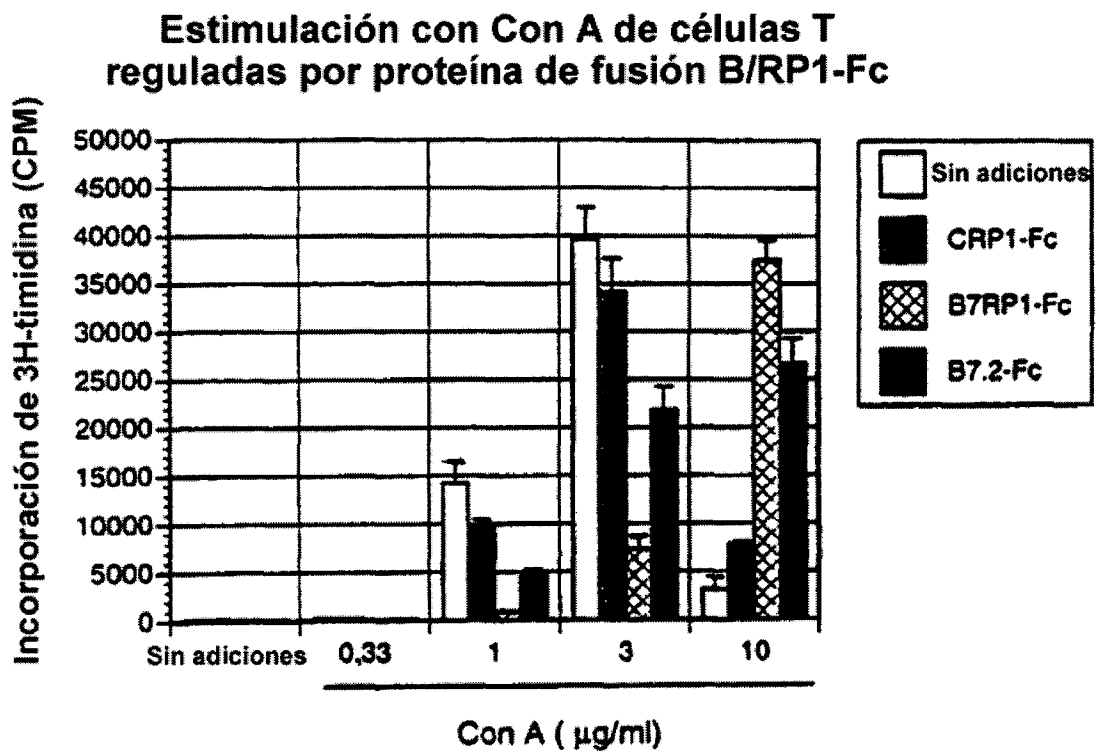


Figura 10

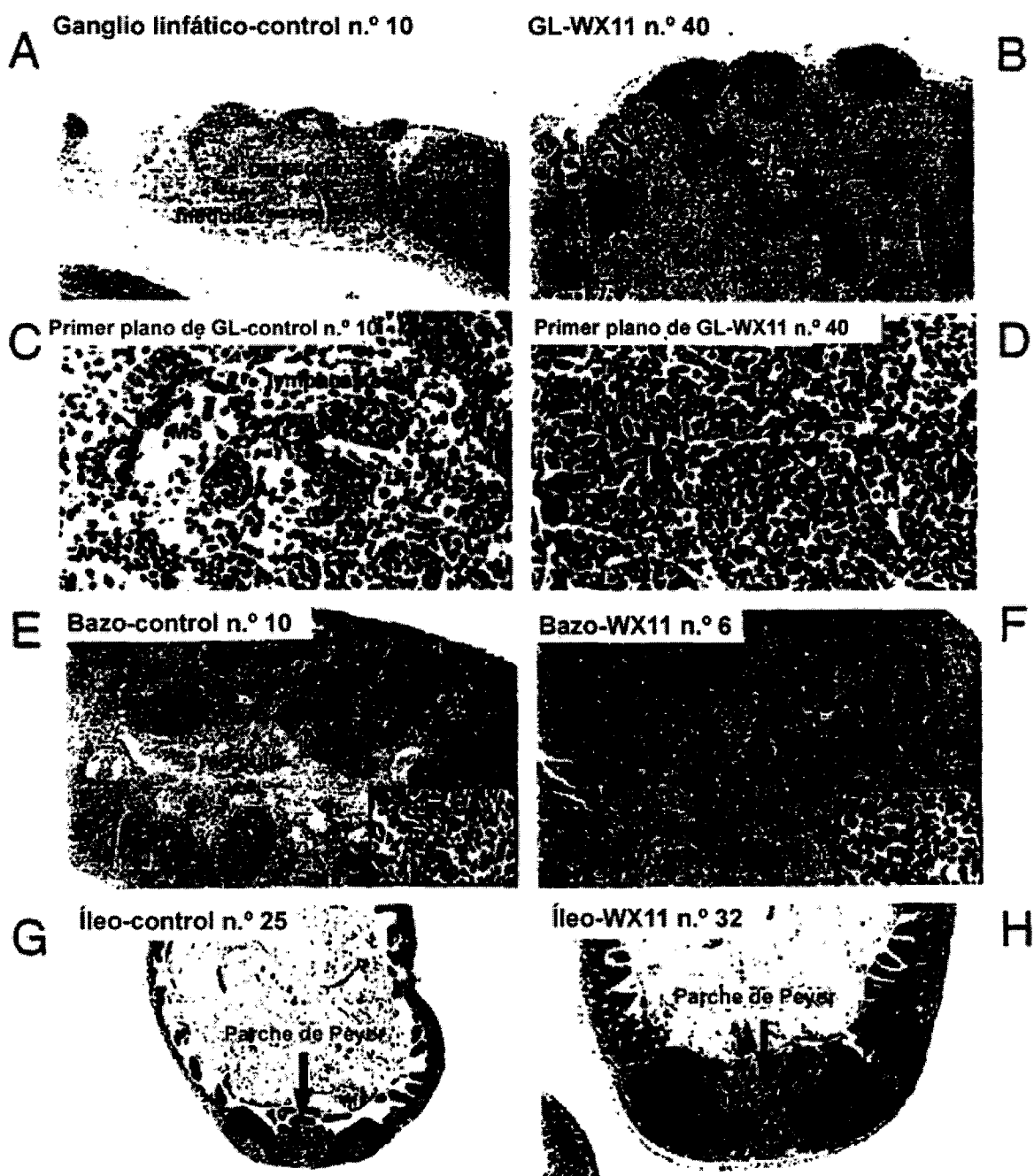


Figura 11

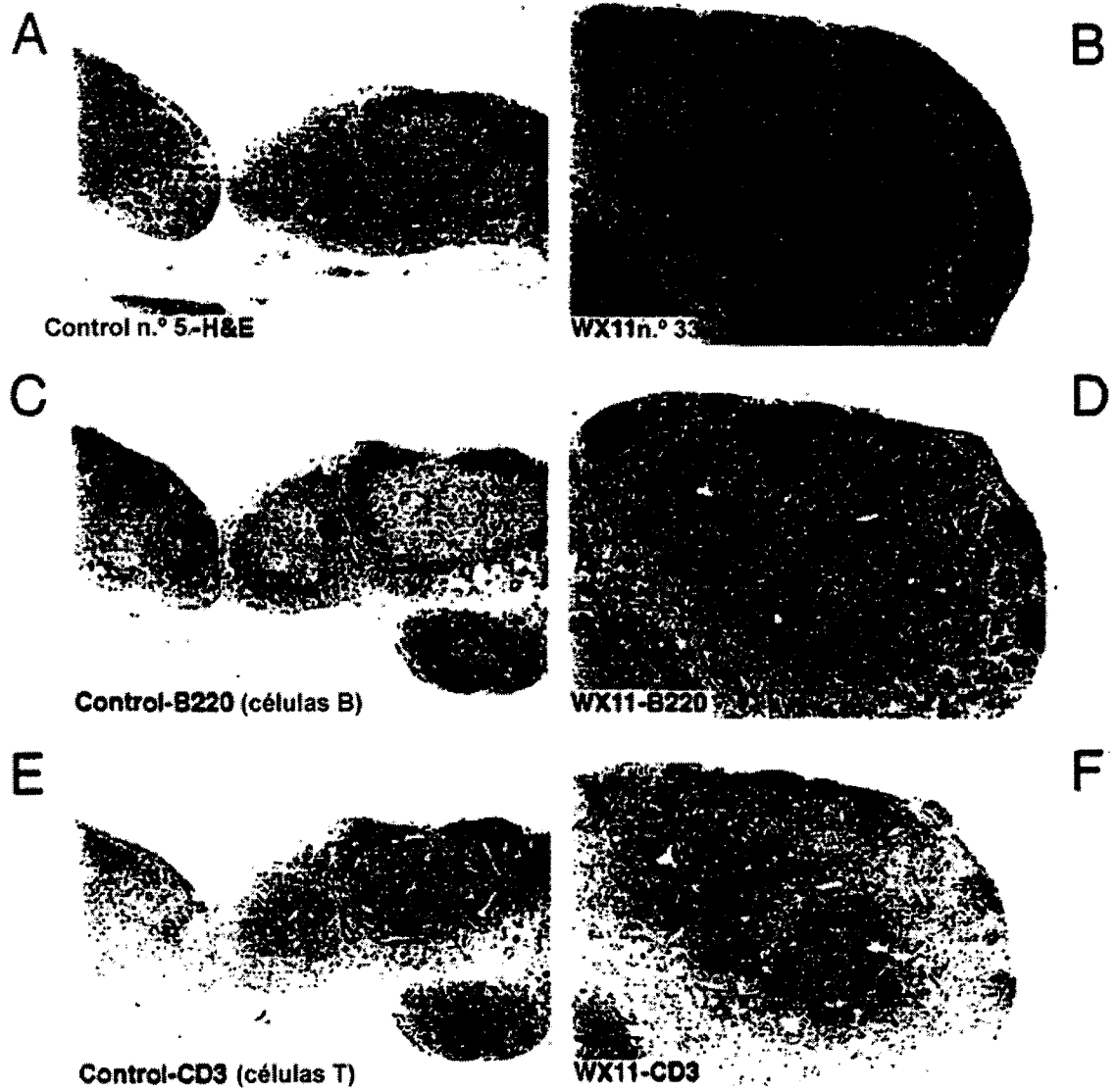


Figura 12A.

GCTGGTACGCCTGCAGGTACCGGTCCGGAATCCCGGGTCGACCCACGGTCCGCCCCACGCG	-138
TCCGCGGGAGCGCAGTTAGAGCCGATCTCCCGCGCCCCGAGGTTGCTCCTCTCCGAGGTCTC	-76
CCGCGGCCCAAGTTCTCCCGCGCCCCGAGGTCTCCCGCGCCCCGAGGTCTCCGCGGCCCGAGGT	-14
CTCCGCCCCGACC	-1
ATG CGG CTG GGC AGT CCT GGA CTG CTC TTC CTG CTC TTC AGC AGC	45
M R L G S P G L L F L L F S S	
5 10 15	
CTT CGA GCT GAT ACT CAG GAG AAG GAA GTC AGA GCG ATG GTA GGC	90
L R A *D *T *Q *E K *E V R A *M V G	
20 25 30	
AGC GAC GTG GAG CTC AGC TGC GCT TGC CCT GAA GGA AGC CGT TTT	135
S D V E L S C A C P E G S R F	
35 40 45	
GAT TTA AAT GAT GTT TAC GTA TAT TGG CAA ACC AGT GAG TCG AAA	180
D L N D V Y V Y W Q T S E S K	
50 55 60	
ACC GTG GTG ACC TAC CAC ATC CCA CAG AAC AGC TCC TTG GAA AAC	225
T V V T Y H I P Q N S S L E N	
65 70 75	
GTG GAC AGC CGC TAC CGG AAC CGA GCC CTG ATG TCA CCG GCC GGC	270
V D S R Y R N R A L M S P A G	
80 85 90	
ATG CTG CGG GGC GAC TTC TCC CTG CGC TTG TTC AAC GTC ACC CCC	315
M L R G D F S L R L F N V T P	
95 100 105	
CAG GAC GAG CAG AAG TTT CAC TGC CTG GTG TTG AGC CAA TCC CTG	360
Q D E Q K F H C L V L S Q S L	
110 115 120	
GGA TTC CAG GAG GTT TTG AGC GTT GAG GTT ACA CTG CAT GTG GCA	405
G F Q E V L S V E V T L H V A	
125 130 135	
GCA AAC TTC AGC GTG CCC GTC GTC AGC GCC CCC CAC AGC CCC TCC	450
A N F S V P V V S A P H S P S	
140 145 150	
CAG GAT GAG CTC ACC TTC ACG TGT ACA TCC ATA AAC GGC TAC CCC	495
Q D E L T F T C T S I N G Y P	
155 160 165	
AGG CCC AAC GTG TAC TGG ATC AAT AAG ACG GAC AAC AGC CTG CTG	540
R P N V Y W I N K T D N S L L	
170 175 180	
GAC CAG GCT CTG CAG AAT GAC ACC GTC TTC TTG AAC ATG CGG GGC	585
D Q A L Q N D T V F L N M R G	
185 190 195	
TTG TAT GAC GTG GTC AGC GTG CTG AGG ATC GCA CGG ACC CCC AGC	630
L Y D V V S V L R I A R T P S	
200 205 210	
GTG AAC ATT GGC TGC TGC ATA GAG AAC GTG CTT CTG CAG CAG AAC	675
V N I G C C I E N V L L Q Q N	
215 220 225	

CTG ACT GTC GGC AGC CAG ACA GGA AAT GAC ATC GGA GAG AGA GAC	720
L T V G S Q T G N D I G E R D	
230 235 240	
AAG ATC ACA GAG AAT CCA GTC AGT ACC GGC GAG AAA AAC GCG GCC	765
K I T E N P V S T G E K N A A	
245 250 255	
ACG TGG AGC ATC CTG GCT GTC CTG TGC CTG CTT GTG GTC GTG GCG	810
T W S I L A V L C L L V V V A	
260 265 270	
GTG GCC ATA GGC TGG GTG TGC AGG GAC CGA TGC CTC CAA CAC AGC	855
V A I G W V C R D R C L Q H S	
275 280 285	
TAT GCA GGT GCC TGG GCT GTG AGT CCG GAG ACA GAG CTC ACT GGC	900
Y A G A W A V S P E T E L T G	
300	
CAC GTT TGA	909
H V TERMINACIÓN	
302	
CCGGAGCTCACCGCCCAGAGCGTGGACAGGGCTTCCGTGAGACGCCACCGTGAGAGGCCAGG	971
TGGCAGCTTGAGCATGGACTCCAGACTGCAGGGGAGCACTTGGGGCAGCCCCAGAAAGGAC	1033
CACTGCTGGATCCCAGGGAGAACCTGCTGGCGTTGGCTGTGATCCTGGAATGAGGCCCTTTC	1095

Figura 12B.

ser humano	MRLGSP----	-----G	L-LF-LLFSS	LRADTQEKEV	25
ratón	MQLKCPCEVS	LGTRQPWWKK	LHVSSGFFSG	LGLFLLLLSS	50
Consenso	M.L..P....	G	L.LF.LL.SS	L.A...E.EV	50
ser humano	RAMVGSDEL	SCACPEGSRF	DLNDVYVWQ	TSESKTVVTY	75
ratón	GAMVGSNVVL	SCIDPHRRHF	NLSGLYVWQ	IENPEVSVTY	100
Consenso	.AMVGS.V.L	SC..P....F	.L...YVWQ	VTY ..P..S...N	100
ser humano	VDSRYNRAL	MSPAGMLRGD	FSLRLFNVT	QDEQKFHCLV	124
ratón	VDSSYKNRGH	LSLDSMKQGN	FSLYLKQVTP	QDTQEFTCRV	150
Consenso	VDS.Y.NR..	.S...M..G.	FSL.L.NVTP	QD.Q.F.C.V	150
ser humano	VLSVEVTLHV	AANFSVPVVS	APHSPSQ-DE	LTFTCTSING	173
ratón	ILEEVVRLRV	AANFSTPVIS	TSDSSNPGQE	RTYTCMSKNG	200
Consenso	.L...V.L.V	AANFS.PV.S	...S.....E	.T.TC.S.NG YP.PN.YWIN	200
ser humano	KTDNSLLDQA	LQNDTVFLNM	RGLYDVVSVL	RIARTPSVNI	223
ratón	TTDNSLIDTA	LQNTFVYLNK	LGLYDVISTL	RLEWTSRGDV	250
Consenso	.TDNSL.D.A	LQN.TV.LN.	.GLYDV.S.L	R...T..... .CC.ENV.L.	250
ser humano	QNLTVGSQTG	NDIGERDKIT	ENPVSTGEKN	AATWSILAVL	273
ratón	QNITSISQAE	SFTGNNTKNP	QETHNNELKV	LV--PVLAVL	298
Consenso	QN.T..SQ..	...G...K..	K.	LAVLV...I	300
ser humano	GWVCRDRCLQ	HSYAGAWAVS	PETELTGHV		302
ratón	YR--RTR-PH	RSYTGPKTVQ	LE--LTDHA		322
Consenso	R.R...	.SY.G...V.	.E..LT.H.		329

Figura 13A

AACAAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGA																				-111			
CTCACTATAGGGAAAGCTGGTACGCCTGCAGGTACCGGTCCGGAATTCCCGGGTC																				-56			
GACCCACGCGTCCGTGAACACTGAACGCGAGGACTGTTAAGTGTCTGCGCAAC																				-1			
ATG	AAG	TCA	GGC	CTC	TGG	TAT	TTC	TTT	CTC	TTC	TGC	TTG	CGC	ATT	45								
M	K	S	G	L	W	Y	F	F	L	F	C	L	R	I									
				5											10								
																				15			
AAA	GTT	TTA	ACA	GGA	GAA	ATC	AAT	GGT	TCT	GCC	AAT	TAT	GAG	ATG	90								
K	V	L	T	G	E	I	N	G	S	A	N	Y	E	M									
				20											25						30		
TTT	ATA	TTT	CAC	AAC	GGA	GGT	GTA	CAA	ATT	TTA	TGC	AAA	TAT	CCT	135								
F	I	F	H	N	G	G	V	Q	I	L	C	K	Y	P									
				35											40						45		
GAC	ATT	GTC	CAG	CAA	TTT	AAA	ATG	CAG	TTG	CTG	AAA	GGG	GGG	CAA	180								
D	I	V	Q	Q	F	K	M	Q	L	L	K	G	G	Q									
				50											55						60		
ATA	CTC	TGC	GAT	CTC	ACT	AAG	ACA	AAA	GGA	AGT	GGA	AAC	ACA	GTG	225								
I	L	C	D	L	T	K	T	K	G	S	G	N	T	V									
				65											70						75		
TCC	ATT	AAG	AGT	CTG	AAA	TTC	TGC	CAT	TCT	CAG	TTA	TCC	AAC	AAC	270								
S	I	K	S	L	K	F	C	H	S	Q	L	S	N	N									
				80											85						90		
AGT	GTC	TCT	TTT	TTT	CTA	TAC	AAC	TTG	GAC	CAT	TCT	CAT	GCC	AAC	315								
S	V	S	F	F	L	Y	N	L	D	H	S	H	A	N									
				95											100						105		
TAT	TAC	TTC	TGC	AAC	CTA	TCA	ATT	TTT	GAT	CCT	CCT	CCT	TTT	AAA	360								
Y	Y	F	C	N	L	S	I	F	D	P	P	P	F	K									
				110											115						120		
GTA	ACT	CTT	ACA	GGA	GGA	TAT	TTG	CAT	ATT	TAT	GAA	TCA	CAA	CTT	405								
V	T	L	T	G	G	Y	L	H	I	Y	E	S	Q	L									
				125											130						135		
TGT	TGC	CAG	CTG	AAG	TTC	TGG	TTA	CCC	ATA	GGA	TGT	GCA	GCC	TTT	450								
C	C	Q	L	K	F	W	L	P	I	G	C	A	A	F									
				140											145						150		
GTT	GTA	GTC	TGC	ATT	TTG	GGA	TGC	ATA	CTT	ATT	TGT	TGG	CTT	ACA	495								
V	V	V	C	I	L	G	C	I	L	I	C	W	L	T									
				155											160						165		
AAA	AAG	AAG	TAT	TCA	TCC	AGT	GTG	CAC	GAC	CCT	AAC	GGT	GAA	TAC	540								
K	K	K	Y	S	S	S	V	H	D	P	N	G	E	Y									
				170											175						180		
ATG	TTC	ATG	AGA	GCA	GTG	AAC	ACA	GCC	AAA	AAA	TCT	AGA	CTC	ACA	585								
M	F	M	R	A	V	N	T	A	K	K	S	R	L	T									
				185											190						195		
GAT	GTG	ACC	CTA	TAA											600								
D	V	T	L	TERMINACIÓN																			
				199																			
TATGGAAGCTCTGGCACCCAGGCATGAAGCAGCTTGGCCAGTTTTCCTCAACTTGA																				655			
AGTGCAAGATTCTCTTATTTCCGGGACCACGGAGAGTCTGACTTAACTACATACA																				710			

TCTTCTGCTGGTGTGTTTGTTCATCTGGAAGAATGACTGTATCAGTCAATGGGGA	765
TTTAAACAGACTGCCTTGGTACTGCCGAGTCCTCTCAAAACAAACACCCTCTTGC	820
AACCAGCTTTGGAGAAAGCCCAGCTCCTGTGTGCTCACTGGGAGTGGAATCCCTG	875
TCTCCACATCTGCTCCTAGCAGTGCATCAGCCAGTAAACAAACACATTTACAAG	930
AAAAATGTTTTAAAGATGCCAGGGGTACTGAATCTGCAAAGCAAATGAGCAGCCA	985
AGGACCAGCATCTGTCCGCATTTCACTATCATACTACCTCTTCTTTCTGTAGGGA	1040
TGAGAATTCCTCTTTTAATCAGTCAAGGGAGATGCTTCAAAGCTGGAGCTATTTT	1095
ATTTCTGAGATGTTGATGTGAACTGTACATTAGTACATACTCAGTACTCTCCTTC	1150
AATTGCTGAACCCCAGTTGACCATTTTACCAAGACTTTAGATGCTTTCTTGTGCC	1205

Figura 13B

hCRP1	MKSGWLWYFFLFCLRIKVLTEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQ	50
mCRP1	MKPYFCRVFVFCFLIRLLTGEINGSADHRMPSFHNGGVQISCKYPETVQQ	50
hCRP1	FKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLD	100
mCRP1	LKMRLFREREVLCELTKTKGSGNAVSIKNPMLCLYHLSNNSVSFFLNND	100
hCRP1	HSHANYYFCNLSIFDPPPFKV.TLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAA	149
mCRP1	SSQGSYYFCSLSIFDPPPFQERNLSGGYLHIYESQLCCQLKLWLPVGCAA	150
hCRP1	FVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL	199
mCRP1	FVVVLLFGCILIIFWSKKKYSSSVHDPNSEYMFMAAVNTNKKSRLAGVTS	200

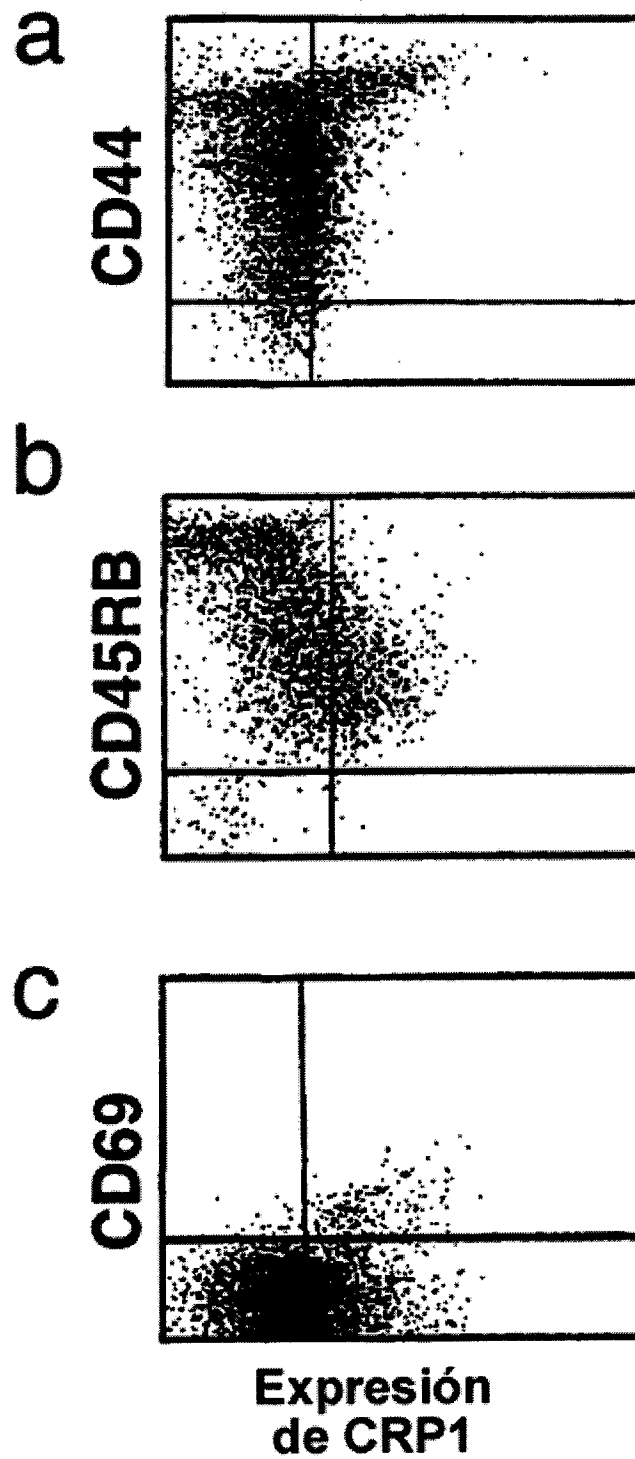
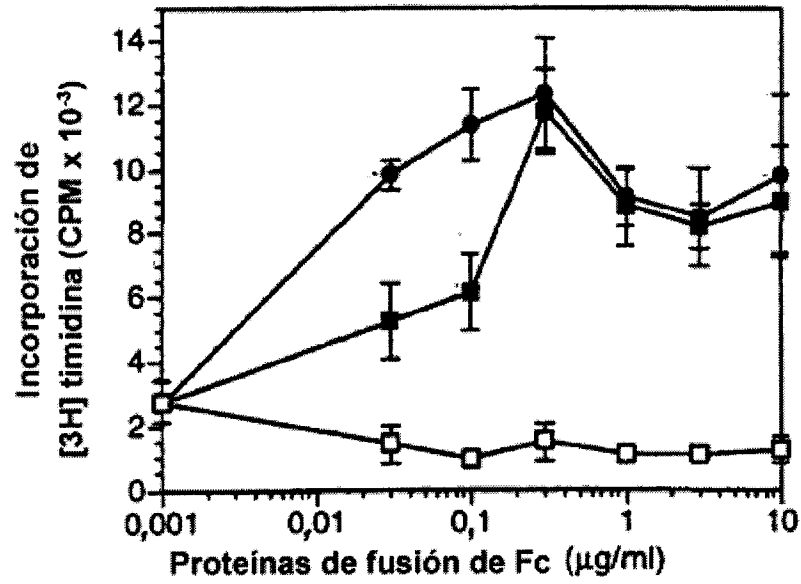


Figura 14

a



b

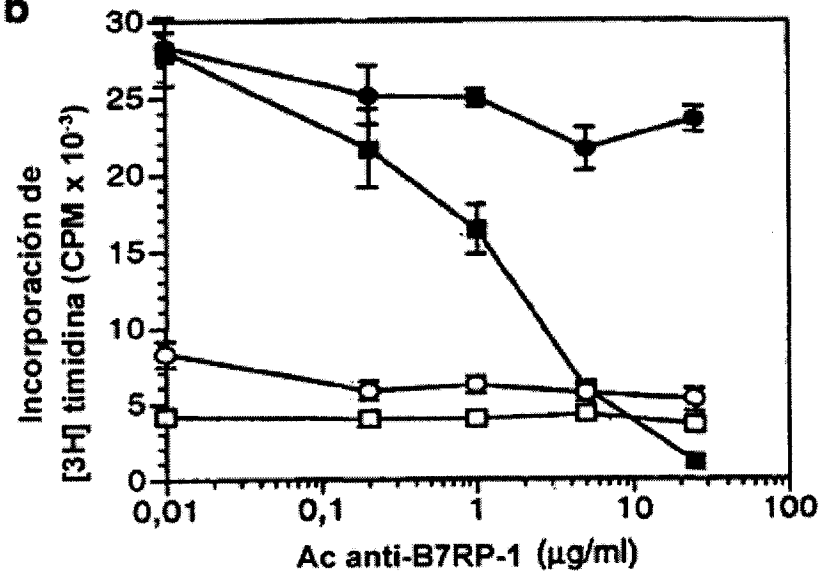
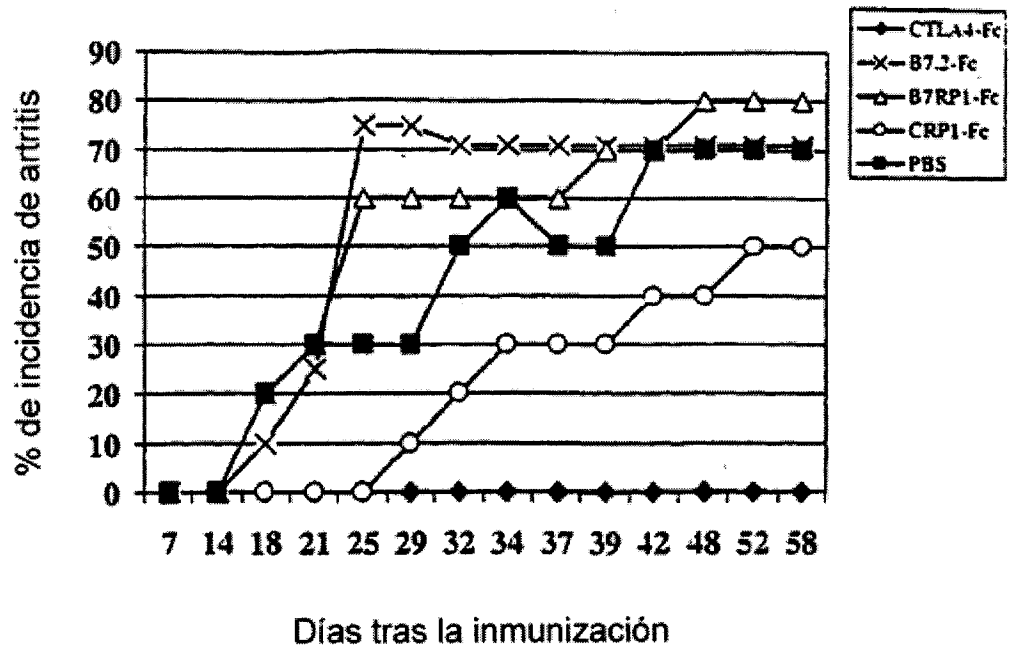


Figura 15

A.



B.

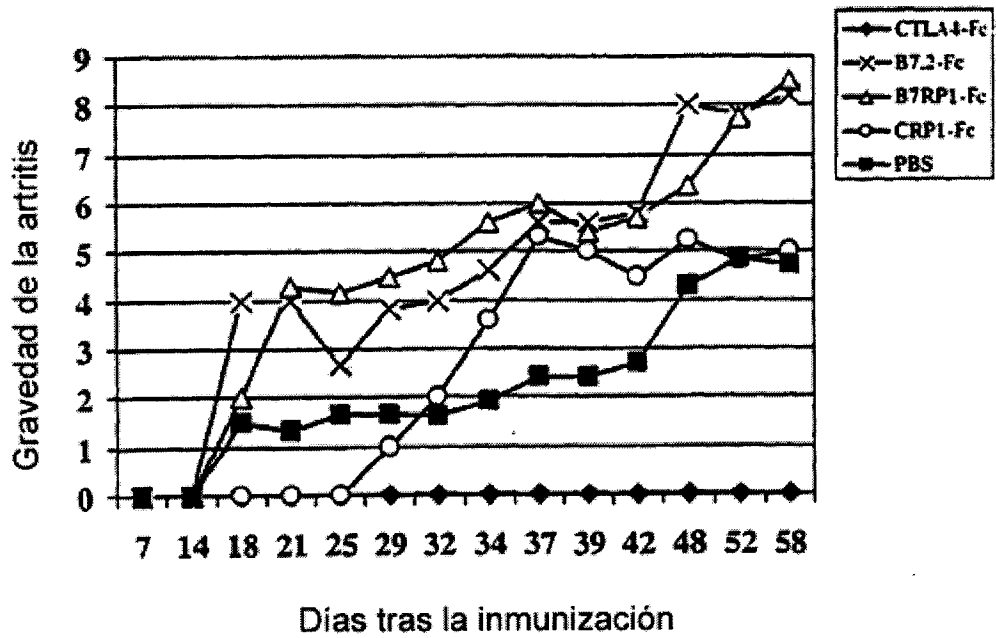


Figura 16

Figura 20

Efecto de B7RP1-Fc sobre el crecimiento tumoral de Meth A en ratones Balb-C

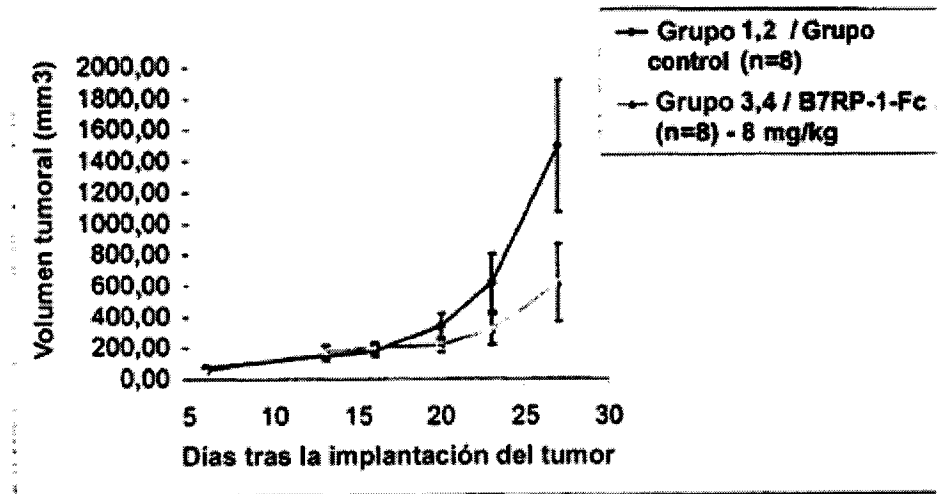


Figura 21A/B.

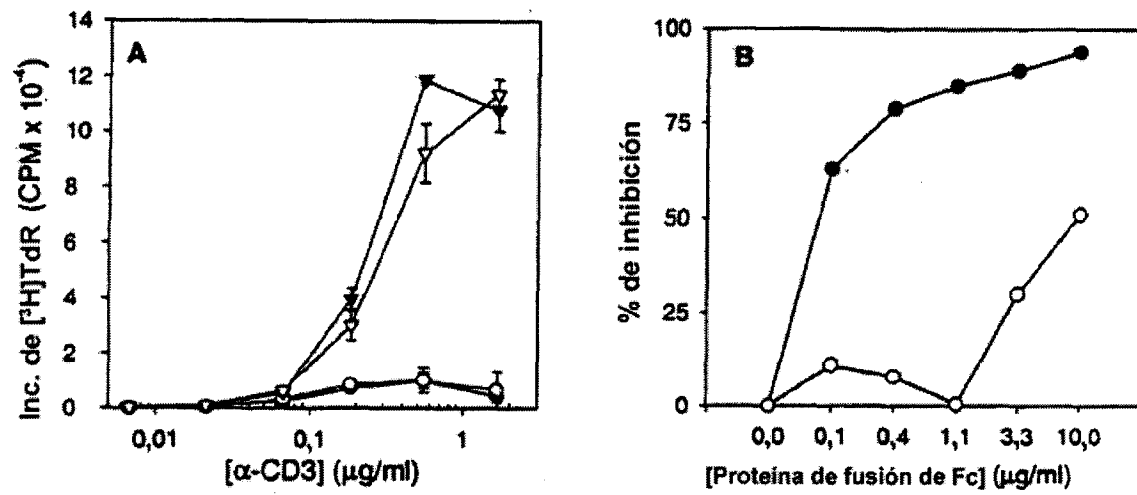


Figura 21C.

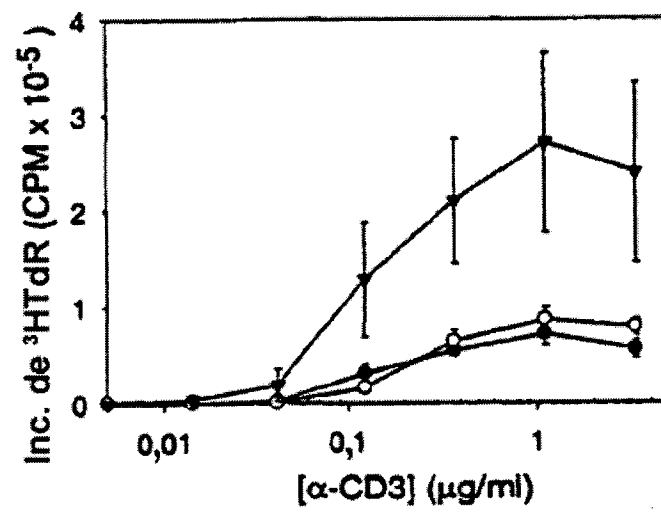
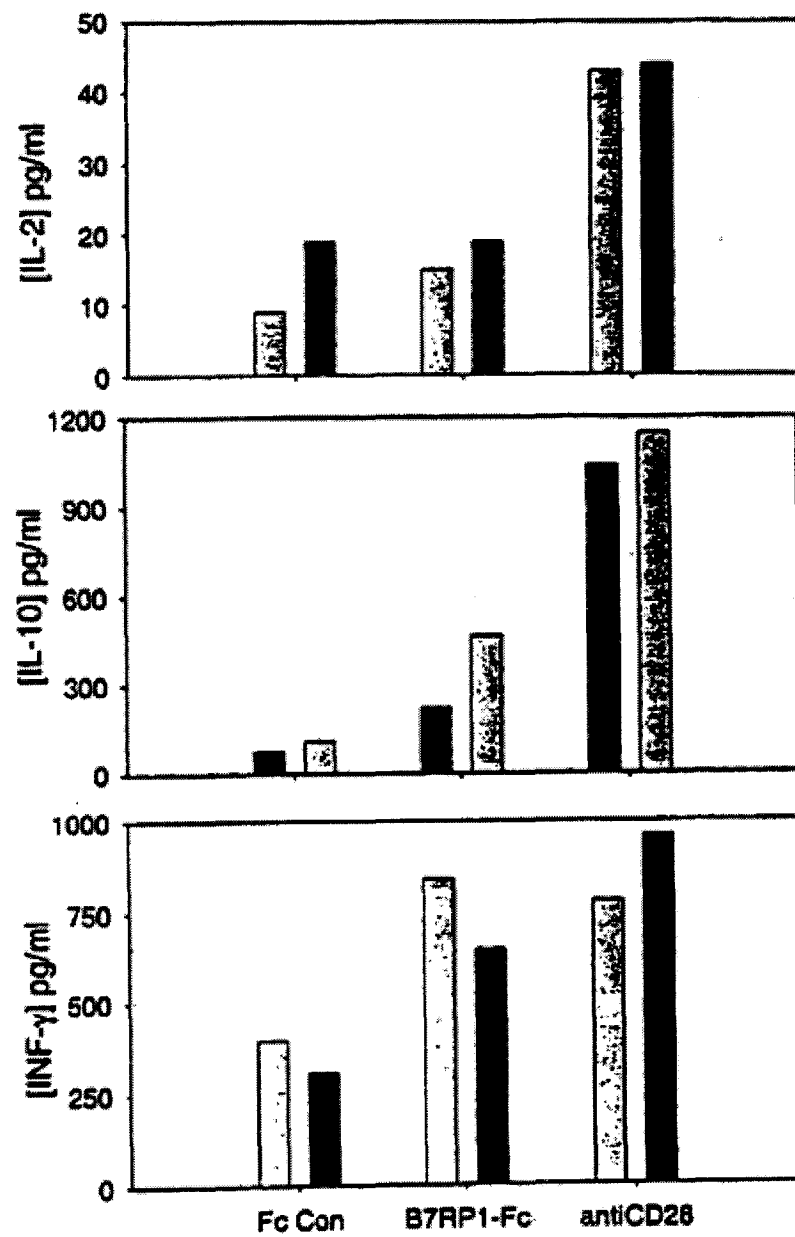
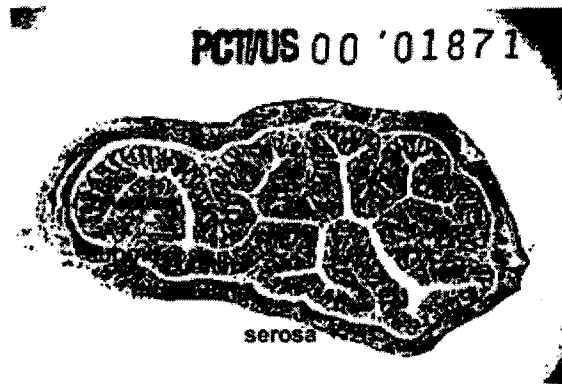
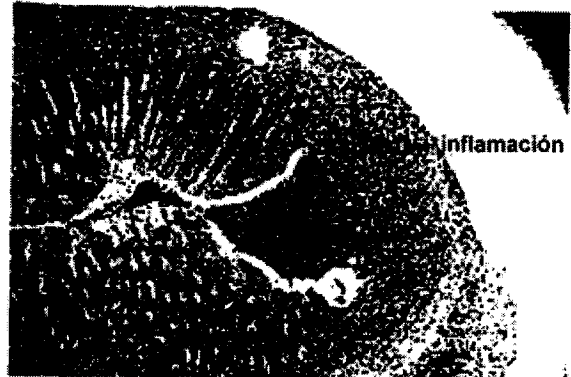


Figura 21D





A. Ratón control n.º 53F: Colon prox. 40X



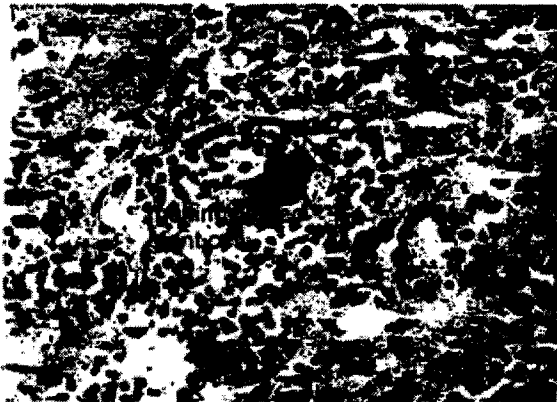
B. Ratón n.º 111F: Colon prox. 40X



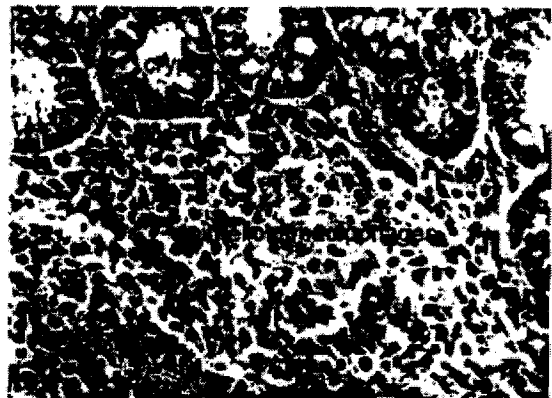
C. Ratón n.º 111F: Colon prox. 20X



D. Ratón n.º 111F: primer plano de mucosa 100X



E. Ratón n.º 112F: Célula gigante, submucosa



F. Ratón n.º 112F: macrófagos epitelioides

Figura 17

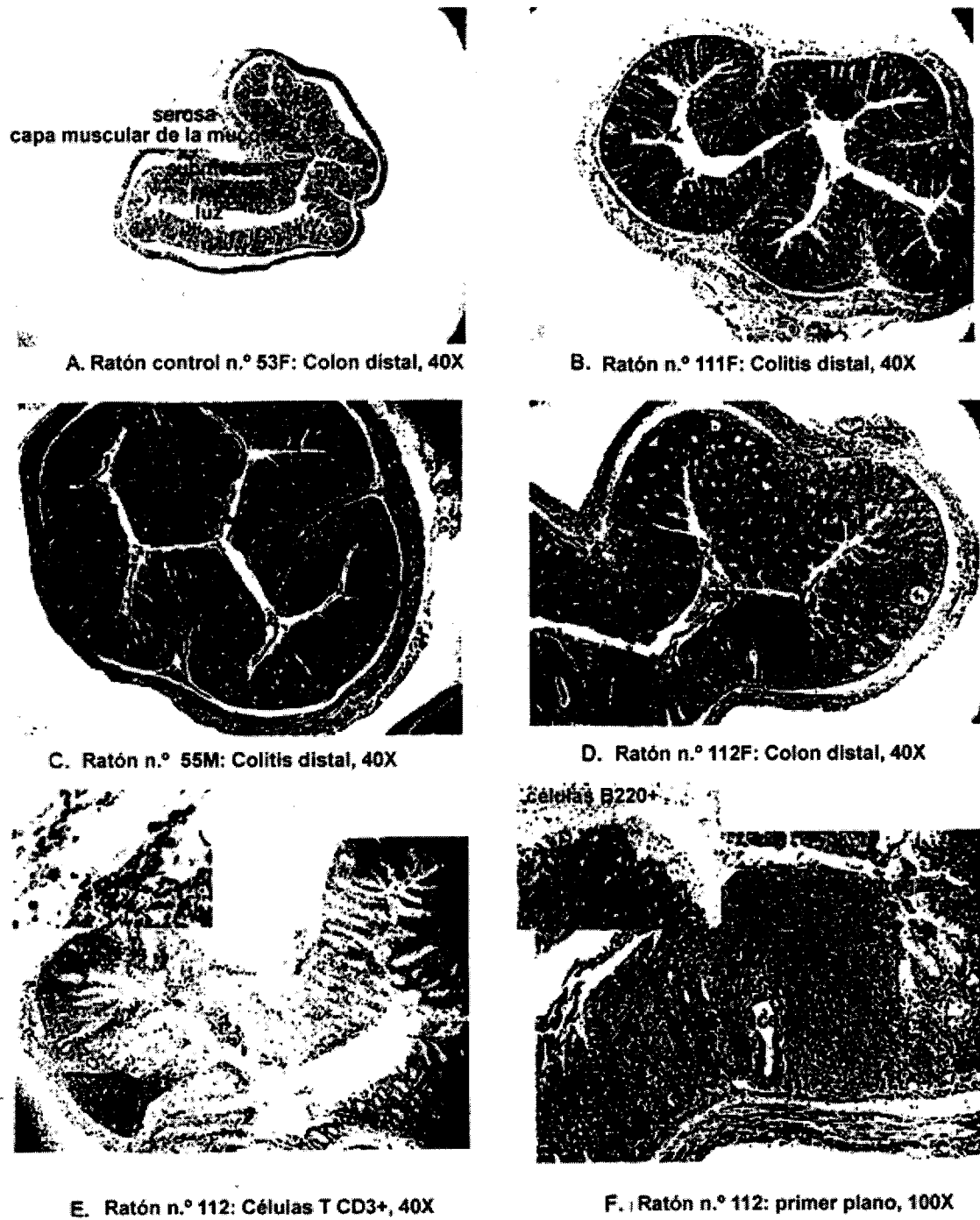


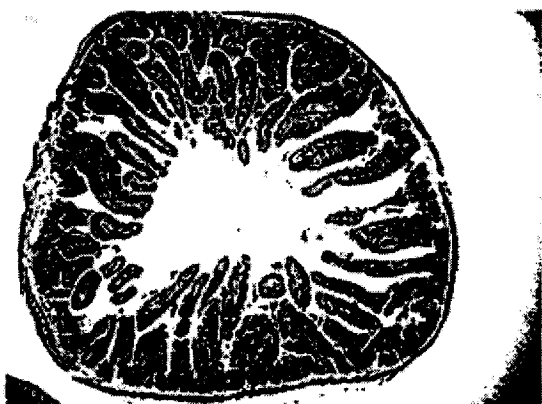
Figura 18



A. Ratón control n.º 53F: duodeno, 40X



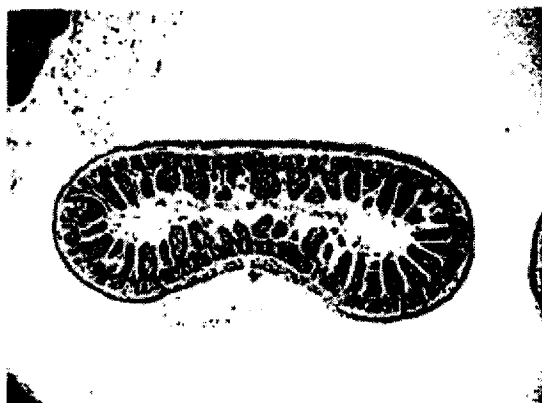
B. Ratón n.º 51F: duodeno, 40X



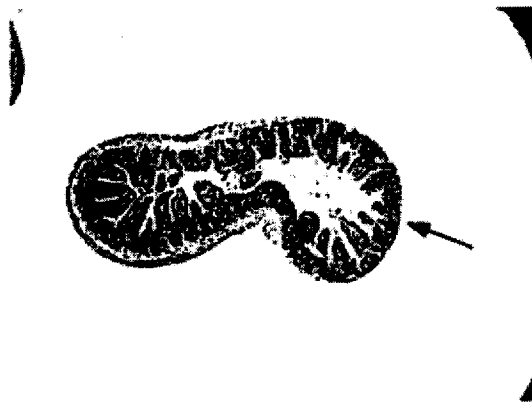
C. Ratón control n.º 53F: yeyuno, 40X



D. Ratón n.º 51F: hiperplasia del yeyuno, 40X



E. Ratón control n.º 53F: íleo, 40X



F. Ratón n.º 231M: Atrofia del íleo, 40x

Figura 19