

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 411**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2000 E 00959394 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 1210428**

54 Título: **PD-1, receptor para la B7-4 y su utilización**

30 Prioridad:

23.08.1999 US 150390 P
10.11.1999 US 164897 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2015

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US y
GENETICS INSTITUTE, LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

WOOD, CLIVE y
FREEMAN, GORDON J.

74 Agente/Representante:

MANRESA VAL, Manuel

ES 2 539 411 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

PD-1, receptor para la B7-4 y su utilización.

5 Financiación pública

El trabajo descrito en la presente memoria recibió el soporte según AI 39671, AI 44690, CA 84500 y AI 41584 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. Por lo tanto, el gobierno de los Estados Unidos puede gozar de ciertos derechos con respecto a la presente invención.

10

Solicitudes relacionadas

La presente reivindica prioridad con respecto a U.S.S.N. 60/150.390 presentada el 23 de agosto de 1999. La presente solicitud también reivindica prioridad con respecto a U.S.S.N. 60/164.897, presentada el 10 de noviembre 1999.

15

Antecedentes de la invención

Para que los linfocitos T respondan a las proteínas extrañas, las células que presentan antígenos (APC) deben proporcionar dos señales a los linfocitos T que se encuentran en reposo (Jenkins, M. and Schwartz, R. (1987) J. Exp. Med. 165:302-319; Mueller, D. L. et al. (1990) J. Immunol. 144:3701-3709). La primera señal, que proporciona especificidad a la respuesta inmunitaria, se transduce mediante el receptor de los linfocitos T (TCR) tras el reconocimiento del péptido antigénico extraño presentado en relación con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal, denominada coestimulación, activa la multiplicación de los linfocitos T y estos se vuelven funcionales (Lenschow et al. (1996) Annu. Rev. Immunol. 14:233). La coestimulación no es específica del antígeno así como tampoco se ve limitada por el MHC y se considera que la proporciona una o más moléculas distintas de la superficie celular expresadas por las APC (Jenkins, M. K. et al. (1988) J. Immunol. 140:3324-3330; Linsley, P. S. et al. (1991) J. Exp. Med. 173:721-730; Gimmi, C. D., et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579; Young, J. W. et al. (1992) J. Clin. Invest. 90:229-237; Koulova, L. et al. (1991) J. Exp. Med. 173:759-762; Reiser, H. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:271-275; van-Seventer, G. A. et al. (1990) J. Immunol. 144:4579-4586; LaSalle, J. M. et al. (1991) J. Immunol. 147:774-80; Dustin, M. I. et al. (1989) J. Exp. Med. 169:503; Armitage, R. J. et al. (1992) Nature 357:80-82; Liu, Y. et al. (1992) J. Exp. Med. 175:437-445).

20

25

30

35

40

Las proteínas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), expresadas en las APC, son moléculas coestimuladoras críticas (Freeman et al. (1991) J. Exp. Med. 174:625; Freeman et al. (1989) J. Immunol. 143:2714; Azuma et al. (1993) Nature 366:76; Freeman et al. (1993) Science 262:909). Parece ser que la B7-2 desempeña una función predominante durante las respuestas inmunitarias primarias mientras que la B7-1, que se regula por aumento posteriormente durante una respuesta inmunitaria, puede resultar importante en la prolongación de las respuestas primarias o secundarias de los linfocitos T coestimulando las respuestas de los linfocitos (Bluestone (1995) Immunity 2:555).

45

50

55

60

Un receptor al que se unen la B7-1 y la B7-2, el CD28, se expresa constitutivamente en los linfocitos T en reposo y aumenta durante la expresión tras su activación. Tras la señalización mediante el receptor del linfocito T, la ligación del CD28 y la transducción de una señal coestimuladora activa la multiplicación de los linfocitos T y la secreción de IL-2 (Linsley, P. S. et al. (1991) J. Exp. Med. 173:721-730; Gimmi, C. D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579; June, C. H. et al. (1990) Immunol. Today. 11:211-6; Harding, F. A. et al. (1992) Nature 356:607-609). Un segundo receptor, denominado CTLA4 (CD152) es homólogo al CD28 pero no se expresa en los linfocitos T en reposo y aparece tras la activación de los linfocitos T (Brunet, J. F. et al. (1987) Nature 328:267-270). Parece ser que el CTLA4 resulta crítico en la regulación negativa de las respuestas de los linfocitos T (Waterhouse et al. (1995) Science 270:985). Se ha descubierto que el bloqueo del CTLA4 elimina las señales inhibitoras, mientras que se ha descubierto que la agregación del CTLA4 proporciona señales inhibitoras que regulan por disminución las respuestas de los linfocitos T (Allison and Krummel (1995) Science 270:932). Las moléculas B7 presentan una afinidad superior hacia el CTLA4 que hacia el CD28 (Linsley, P. S. et al. (1991) J. Exp. Med. 174:561-569) y se ha descubierto que B7-1 y B7-2 se unen a regiones distintas de la molécula CTLA4 y presentan unas cinéticas distintas de unión a CTLA4 (Linsley et al. (1994) Immunity 1:793). Se ha identificado una nueva molécula, ICOS, relacionada con el CD28 y el CTLA4 y parece ser importante en la producción de IL-10 (Hutloff et al. (1999) Nature 397:263; WO 98/38216), al igual que su ligando, que es un nuevo miembro de la familia B7 (Aicher A. et al. (2000) J. Immunol. 164:4689-96; Mages H.W. et al. (2000) Eur. J. Immunol. 30:1040-7; Brodie D. et al. (2000) Curr. Biol. 10:333-6; Ling V. et al. (2000) J. Immunol. 164:1653-7; Yoshinaga S.K. et al. (1999) Nature 402:827-32). Si los linfocitos T se estimulan únicamente mediante el receptor de linfocitos T, sin recibir una señal coestimuladora adicional, se convierten en linfocitos que no responden, anérgicos o mueren, produciéndose una regulación por disminución de la respuesta inmunitaria.

Se ha demostrado la importancia de la vía coestimuladora B7:CD28/CTLA4 *in vitro* y en diversos sistemas de modelo *in vivo*. El bloqueo de dicha vía coestimuladora tiene como resultado el desarrollo de tolerancia al antígeno en sistemas con murinos y seres humanos (Harding, F. A. et al. (1992) *Nature* 356:607-609; Lenschow, D. J. et al. (1992) *Science* 257:789-792; Turka, L. A. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102-11105; Gimmi, C. D. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6586-6590; Boussiotis, V. et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:1753-1763). En cambio, la expresión de B7 mediante las células tumorales murinas negativas a la B7 activa la inmunidad específica en la que intervienen los linfocitos T junto con el rechazo tumoral y una protección de larga duración a la provocación tumoral (Chen, L. et al. (1992) *Cell* 71:1093-1102; Townsend, S. E. and Allison, J. P. (1993) *Science* 259:368-370; Baskar, S. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5687-5690.). Por lo tanto, la manipulación de las vías coestimuladoras ofrece un gran potencial para estimular o suprimir las respuestas inmunitarias en los seres humanos.

La patente US n.º 5.698.520 da a conocer unas composiciones que contienen PD-1 y/o anticuerpos contra PD-1, y la utilización de las mismas para deprimir o acelerar las funciones inmunitarias. Ishida et al (EMBOJournal, vol 11, nu 11, pp 3887 - 3895, 1992) describe cómo los factores proapoptóticos pueden modular la expresión génica del PD-1 en las células.

Resumen de la invención

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de que el PD-1 es un receptor de moléculas B7-4 expresadas en células que presentan antígenos. El PD-1 transmite una señal negativa a los inmunocitos, similar al CTLA4. Las moléculas B7-4 se expresan en la superficie de las células que presentan antígenos y proporcionan una señal coestimuladora a los inmunocitos y pueden transmitir señales reguladoras por disminución a los inmunocitos, en función de la molécula a la que se unen. Por lo tanto, la modulación de PD-1, B7-4, y/o la interacción entre B7-4 y PD-1 tiene como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente memoria proporciona un método para modular una respuesta inmunitaria que comprende poner en contacto una inmunocito con un agente que module la señalización mediante el PD-1 para, de este modo, modular la respuesta inmunitaria.

En una forma de realización, la respuesta inmunitaria se regula por disminución.

En una forma de realización, se selecciona el inmunocito de entre el grupo que comprende: un linfocito T, un linfocito B y un mielocito.

En una forma de realización, se provoca anergia en el inmunocito.

En una forma de realización, el método comprende además poner en contacto el inmunocito con un agente adicional que regula por disminución una respuesta inmunitaria.

En una forma de realización, la respuesta inmunitaria se regula por aumento.

En una forma de realización, se inhibe la señalización mediante el PD-1 utilizando un agente seleccionado de entre el grupo que comprende: una forma no activadora de la B7-4, un anticuerpo que reconoce la B7-4 y una forma soluble de PD-1.

En una forma de realización, la etapa de puesta en contacto se produce *in vivo*. En otra forma de realización, la etapa de puesta en contacto se produce *in vitro*.

En un aspecto adicional, la presente memoria se refiere a un método para modular la interacción de la B7-4 con un receptor inhibitor en un inmunocito que comprende poner en contacto una célula que presenta antígenos y que expresa la B7-4 con un agente seleccionado del grupo que consiste en: una forma de B7-4, una forma de PD-1 o un agente que modula la interacción entre la B7-4 y el PD-1 de tal modo que se modula la interacción del B7-4 con un receptor inhibitor sobre un inmunocito.

En una forma de realización, el método comprende además poner en contacto el inmunocito o la célula que presenta antígenos con un agente adicional que modula una respuesta inmunitaria.

En una forma de realización, la etapa de puesta en contacto se realiza *in vitro*. En otra forma de realización, la etapa de puesta en contacto se realiza *in vivo*.

En una forma de realización, se selecciona el inmunocito de entre el grupo que comprende: un linfocito T, un linfocito B y un mielocito.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para inhibir la activación de un inmunocito mediante un mecanismo no apoptótico que comprende el aumento de la actividad o la expresión del PD-1 en un inmunocito de tal modo que se inhibe la activación de los inmunocitos.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a vacuna que comprende un antígeno y un agente que inhibe la señalización mediante el PD-1 en un inmunocito.

15 En otro aspecto, la presente memoria se refiere a composición que comprende un antígeno y un agente que estimula la señalización mediante el PD-1 en un inmunocito.

20 En un aspecto adicional, la presente memoria se refiere a un método para tratar un paciente que presenta una enfermedad que se beneficiaría de la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria que comprende administrar un fármaco que inhiba la señalización mediante el PD-1 en un inmunocito del paciente de tal modo que se trata dicha enfermedad que se beneficiaría de la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria.

25 En una forma de realización, el fármaco comprende una forma soluble de PD-1 o B7-4.

En una forma de realización, el método comprende además la administración de un segundo fármaco que regula por aumento la respuesta inmunitaria del paciente.

30 En una forma de realización, la enfermedad se selecciona de entre el grupo constituido por: un tumor, una enfermedad neurológica o una enfermedad inmunodepresora.

35 En un aspecto adicional, la presente memoria se refiere a un método para tratar un paciente que presenta una enfermedad que se beneficiaría de la regulación por disminución de una respuesta inmunitaria que comprende administrar un fármaco que estimule la señalización mediante el PD-1 en un inmunocito del paciente de tal modo que se trata dicha enfermedad que se beneficiaría de la regulación por disminución de una respuesta inmunitaria.

40 En una forma de realización, dicho fármaco se selecciona entre el grupo constituido por: un anticuerpo que estimula la señalización mediante el PD-1, un anticuerpo biespecífico y una B7-4 soluble.

45 En una forma de realización, el método comprende además la administración de un segundo fármaco que regula por disminución la respuesta inmunitaria del paciente.

50 En una forma de realización, la enfermedad se selecciona de entre el grupo constituido por: un trasplante, una alergia y un trastorno autoinmunitario.

55 En un aspecto adicional, la presente memoria se refiere a un ensayo basado en células para la identificación sistemática de compuestos que modulan la actividad de la B7-4 o el PD-1 comprendiendo poner en contacto una célula que expresa una molécula diana B7-4 o una molécula diana PD-1 con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de las moléculas diana B7-4 o PD-1.

60 En otro aspecto adicional, la presente memoria se refiere a un ensayo sin células para realizar la detección sistemática de compuestos que modulan la unión de la B7-4 o el PD-1 con una molécula diana que comprende poner en contacto una proteína B7-4 o PD-1 o una región biológicamente activa de las mismas con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a las proteínas B7-4 o PD-1 o región biológicamente activa de las mismas.

Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 representa la secuencia de nucleótidos que codifica una B7-4, B7-4S humana secretada.
 La figura 2 representa la secuencia de nucleótidos que codifica una B7-4, B7-4M humana.
 La figura 3 representa la secuencia de aminoácidos de la B7-4S humana y representa la señal, IgV, IGC y el dominio de la cola hidrófila.
 La figura 4 representa la secuencia de aminoácidos de la B7-4M humana y representa los dominios de la señal, IgV, IGC y los dominios transmembrana y citoplasmático.
 60 La figura 5 representa la secuencia de nucleótidos de la B7-4 murina.
 La figura 6 representa la secuencia de aminoácidos de la B7-4 murina.
 La figura 7 representa la alineación de las secuencias de aminoácidos de las B7-4 humana y murina.

La figura 8 ilustra los resultados del análisis FACS de la unión de CD28lg, CTLA4-Ig y la Ig de control mediante células COS sometidas a transfección con B7-4M.

La figura 9 ilustra los resultados del análisis FACS de la unión de la IgG y la proteína de fusión ICOS-hismurina mediante células COS sometidas a transfección con B7-4M.

5 La figura 10 ilustra los resultados del análisis FACS de la unión de la IgM, BB1 y 133 anticuerpos con células COS sometidas a transfección con B7-4M.

La figura 11 ilustra cómo las células COS sometidas a transfección con B7-4M (292) pueden coestimular la multiplicación de los linfocitos T.

10 La figura 12 ilustra cómo las células COS sometidas a transfección con una B7-4M (292) pueden coestimular la multiplicación de los linfocitos T.

La figura 13 ilustra la unión del PD-1 con células COS sometidas a transfección con B7-4M.

La figura 14 ilustra la capacidad del PD-1 añadido y no Flt4 para competir por la unión del PD-1 con células COS sometidas a transfección con B7-4M.

15 La figura 15 ilustra la capacidad del PD-1 para unirse a células CHO sometidas a transfección con B7-4, tal como se determina mediante citometría de flujo.

La figura 16 ilustra la capacidad del PD-1 para unirse a células CHO sometidas a transfección con B7-4, tal como se determina mediante análisis BIACORE.

La figura 17 ilustra la capacidad de la B7-4M para transmitir una señal negativa a los linfocitos T.

20 La figura 18 ilustra la inhibición de la multiplicación de los linfocitos T y la producción de citocinas en los linfocitos T humanos estimulados en presencia de la B7-4.

La figura 19 ilustra cómo la activación del receptor de los linfocitos T / B7-4 en presencia de la coestimulación con CD28 provoca la inhibición de la multiplicación de los linfocitos T.

La figura 20 ilustra la unión del PD-1 con las células CHO que expresan la B7-4.

La figura 21 ilustra la acción de la B7-4 en la inhibición de las señales del CD28.

25 La figura 22 ilustra la inhibición de la producción de citocinas mediante la vía PD-1:B7-4, determinada mediante una prueba ELISA de las citocinas.

La figura 23 ilustra la inhibición de la producción de citocinas mediante la vía PD-1:B7-4, determinada mediante los niveles del ARNm de las citocinas.

La figura 24 ilustra cómo el mecanismo de acción de la vía PD-1:B7-4 es la detención del ciclo celular.

30 La figura 25 ilustra la capacidad de los anticuerpos contra la B7-4 para inhibir la interacción entre la B7-4 y el PD-1.

La figura 26 ilustra la capacidad de los anticuerpos contra el PD-1 para inhibir la interacción entre la B7-4 y el PD-1.

35 La figura 27 ilustra la capacidad de la B7-4Fc soluble para empeorar la enfermedad en un modelo murino experimental de encefalomiелitis autoinmunitaria.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones. Además de los antígenos de activación de los linfocitos B caracterizados previamente, por ejemplo, B7-1 y B7-2, existen otros antígenos en la superficie de las células presentadoras de antígenos que modulan la coestimulación de los inmunocitos. Por ejemplo, se han aislado polipéptidos B7-4 a partir de queratinocitos y genotecas de ADNc de placenta. Se ha descubierto asimismo que los polipéptidos B7-4 coestimulan o inhiben los linfocitos T. La presente invención identifica el PD-1 como receptor para la B7-4.

45 Los inmunocitos presentan receptores que transmiten señales de activación. Por ejemplo, los linfocitos T presentan receptores de linfocitos T y el complejo CD3, los linfocitos B presentan receptores de linfocitos B y los mielocitos presentan receptores Fc. Además, los inmunocitos presentan receptores que transmiten señales que proporcionan señales coestimuladoras o receptores que transmiten señales que inhiben la señalización en la que intervienen
50 receptores. Por ejemplo, el CD28 transmite una señal coestimuladora a los linfocitos T. Tras la ligación del receptor del linfocito T, la ligación del CD28 produce una señal coestimuladora caracterizada, por ejemplo, por la regulación por aumento de los receptores IL-2Ra, IL-2rβ y IL-2rγ, un aumento de la transcripción del ARN mensajero de IL-2, el aumento de expresión de los genes de las citocinas (entre ellas IL-2, IFN-γ, GM-CSF y TNF-α). La transmisión de una señal coestimuladora permite a la célula progresar en el ciclo celular y, de este modo, aumenta la multiplicación
55 de linfocitos T (Greenfield et al. (1998) Crit. Rev. Immunol. 18:389). La unión de un receptor con un linfocito T que transmite una señal coestimuladora a la célula (por ejemplo, la ligación de un receptor coestimulador que provoca la secreción de citocinas y/o la multiplicación de linfocitos T) mediante una molécula de la familia B7, tal como B7-4, tiene como resultado la coestimulación. Por lo tanto, la inhibición de una interacción entre una molécula de la familia B7, tal como B7-4, y un receptor que transmite una señal coestimuladora a un inmunocito tiene como resultado la
60 regulación por disminución de la respuesta inmunitaria y/o la falta de respuesta específica, denominada anergia de los inmunocitos. Se puede alcanzar la inhibición de esta interacción utilizando, por ejemplo, fragmentos Fab anti-CD28, anticuerpos contra B7-1, B7-2 y/o B7-4, o utilizando una forma soluble de receptor al que se puede unir una molécula que pertenezca a la familia B7 como inhibidor competitivo (por ejemplo, CTLA4Ig).

Se han identificado asimismo en los inmunocitos receptores inhibidores que se unen a moléculas coestimuladoras. La activación del CTLA4, por ejemplo, transmite una señal negativa a un linfocito T. El acoplamiento del CTLA4 inhibe la producción de IL-2 y puede provocar la detención del ciclo celular (Krummel and Allison (1996) J. Exp. Med. 183:2533). Además, los ratones que carecen de CTLA4 desarrollan el denominado síndrome linfoproliferativo (Tivol et al. (1995) Immunity 3:541; Waterhouse et al. (1995) Science 270:985). El bloqueo del CTLA4 con anticuerpos puede eliminar una señal inhibidora, mientras que la agregación del CTLA4 con anticuerpos transmite una señal inhibidora. Por lo tanto, en función del receptor al que se une una molécula coestimuladora (es decir, un receptor coestimulador tal como CD28 o un receptor inhibidor tal como CTLA4), ciertas moléculas B7 pueden activar la coestimulación o la inhibición de los linfocitos T.

El PD-1 es un miembro de la familia de moléculas de las inmunoglobulinas (Ishida et al. (1992) EMBO J. 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704). Se identificó previamente el PD-1 utilizando un procedimiento basado en la clonación por sustracción diseñado para identificar moduladores de la apoptosis. (Ishida et al. (1992) EMBO J. 11:3887-95; Woronicz et al. (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 200:137). Se considera que el PD-1 desempeña una función en la supervivencia de los linfocitos, por ejemplo, durante la selección clónica (Honjo (1992) Science 258:591; Agata et al. (1996) Int. Immunology. 8:765; Nishimura et al. (1996) Int. Immunology 8:773). También estaba implicado el PD-1 como un regulador de las respuestas de los linfocitos B (Nishimura (1998) Int. Immunology 10:1563). A diferencia del CTLA4, que únicamente se encuentra en los linfocitos T, el PD-1 también se encuentra en los linfocitos B y los mielocitos.

Se ha descubierto que el PD-1 se une con la B7-4 coloca el PD-1 en una familia de receptores inhibidores con el CTLA4. Aunque el acoplamiento de un receptor coestimuladora provoca una señal coestimuladora en un inmunocito, el acoplamiento de un receptor inhibidor, por ejemplo, CTLA4 o PD-1 (por ejemplo por reticulación o por agregación), provoca la transmisión de una señal inhibidora en un inmunocito, lo que tiene como resultado la regulación por disminución de las respuestas de los inmunocitos y/o la anergia de los inmunocitos. Aunque la transmisión de una señal inhibidora provoca la regulación por disminución de las respuestas de los inmunocitos (y la regulación por disminución consiguiente en la respuesta inmunitaria en general), la prevención de una señal inhibidora (por ejemplo, utilizando un anticuerpo no activando contra el PD-1) en los inmunocitos provoca la regulación por aumento de las respuestas de los inmunocitos (y la regulación por aumento consiguiente de una respuesta inmunitaria).

Dicho descubrimiento permite que estén disponibles los agentes útiles para modular la actividad y/o la expresión del PD-1; la interacción entre el PD-1 y su(s) ligando(s) natural(es), (por ejemplo, B7-4); y los agentes para modular la respuesta inmunitaria mediante la modulación de la interacción entre el PD-1 y su ligando natural, por ejemplo, B7-4. Los ejemplos de agentes moduladores para utilizar en dichos métodos se describirán más detalladamente a continuación.

Moléculas de ácido nucleico y de polipéptidos de B7-4 y PD-1

En una forma de realización, un agente modulador útil para modular la actividad y/o la expresión del PD-1 es una molécula de ácido nucleico de B7-4 y/o PD-1, preferentemente una molécula de ácido nucleico B7-4 y/o PD-1 humano.

En una forma de realización, las moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención codifican polipéptidos B7-4 o PD-1 eucariotas. La familia de moléculas B7-4 comparte un número de regiones conservadas, entre ellas dominios de señal, dominios IgV y los dominios IgC. Los dominios IgV y los dominios IgC son dominios de los miembros de la superfamilia Ig reconocida en la técnica. Dichos dominios corresponden a unidades estructurales que presentan patrones de plegado distintos denominados pliegues de las Ig. Los pliegues de las Ig se encuentran intercalados entre dos láminas β , comprendiendo cada una unas cadenas β antiparalelas de 5 a 10 aminoácidos con un enlace disulfuro conservado entre las dos láminas en la mayoría, pero no en todos, los dominios. Los dominios IgC de moléculas de Ig, TCR, y MHC comparten los mismos tipos de patrones de secuencia y se denominan el conjunto C1 dentro de la superfamilia de la Ig. Otros dominios IgC pertenecen a otros conjuntos. Los dominios IgV comparten asimismo patrones de secuencia y se denominan dominios del conjunto V. Los dominios IgV son más largos que los dominios C y forman un par adicional de cadenas β .

Se han identificado dos formas de moléculas de B7-4 humana. Una forma es natural, el polipéptido soluble B7-4, es decir, que presenta un dominio hidrófilo corto y ningún dominio transmembrana, y se hace referencia al mismo en la presente memoria como B7-4S (representado en la SEC ID N.º 2). La segunda forma es un polipéptido relacionado con las células, es decir, que presenta un dominio transmembrana y citoplasmático, al que se hace referencia en la presente memoria como B7-4M (representado en la SEC ID N.º 4).

Las proteínas B7-4 comprenden una secuencia de señal, y un dominio IgV y un dominio IgC. La secuencia de señal de la SEC ID N.º 2 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 18. La

5 secuencia de señal de la SEC ID N.º 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 18. El dominio IgV de SEC ID N.º 2 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta aproximadamente el aminoácido 134 y el dominio IgV de la SEC ID N.º 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta aproximadamente el aminoácido 134. El dominio IgC de SEC ID N.º 2 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 135 hasta aproximadamente el aminoácido 227 y el dominio IgV de la SEC ID N.º 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 135 hasta aproximadamente el aminoácido 227. El ejemplo de cola hidrófila de la B7-4 de la SEC ID N.º 2 comprende una cola hidrófila que se muestra desde aproximadamente el aminoácido 228 hasta aproximadamente el aminoácido 245. El ejemplo de polipéptido B7-4 de la SEC ID N.º 4 comprende un dominio transmembrana que se muestra a partir de aproximadamente los aminoácidos 239 hasta aproximadamente el aminoácido 259 de la SEC ID N.º 4 y un dominio citoplasmático que se muestra desde aproximadamente el aminoácido 260 hasta aproximadamente el aminoácido 290 de la SEC ID N.º 4.

15 Se han identificado asimismo moléculas B7-4 murinas. La secuencia de ADNcmurino se presenta en la figura 5 y la secuencia de aminoácidos de la B7-4 murina se presenta en la figura 6. La presente invención se refiere asimismo a dichas moléculas B7-4 murinas

20 Se ha identificado en la presente memoria el PD-1 como receptor que se une a la B7-4. Las moléculas PD-1 son miembros de la superfamilia de genes de las inmunoglobulinas. El PD-1 (Ishida et al. (1992) EMBO J. 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704; patente US n.º 5.698.520) presenta una región extracelular que contiene el dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas, un dominio transmembrana y una región intracelular que comprende un motivo inhibidor basado en la tirosina inmunorreceptor (ITIM). Dichas características definen asimismo una familia más grande de moléculas, denominada receptores inmunoinhibidores, que comprende asimismo gp49B, PIR-B y los receptores inhibitorios citolíticos (KIR) (Vivier and Daeron (1997) Immunol. Today 18:286). A menudo se considera que el motivo tirosilfosforiladoITIM de dichos receptores interactúa con el dominio SH2 que contiene fosfatasas, lo que provoca las señales inhibitorias. Un subconjunto de estos receptores inmunoinhibidores se une a moléculas del MHC, por ejemplo los KIR, y el CTLA4 se unen a B7-1 y B7-2. Se ha propuesto que existe una relación filogenética entre los genes del MHC y de la B7 (Henry et al. (1999) Immunol. Today 20(6):285-8).

30 La secuencia de nucleótidos del PD-1 se muestra en las SEC ID N.º 10 y 11 y la secuencia de aminoácidos del PD-1 se muestra en la SEC ID N.º 12 (véase también Ishida et al. (1992) EMBOJ. 11:3887; Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704; patente US n.º 5.698.520). Se identificó previamente el PD-1 utilizando un procedimiento basado en la clonación por sustracción para seleccionar para proteínas implicadas en la apoptosis. En la presente memoria se identifica el PD-1 como miembro de la familia CD28/CTLA-4 de moléculas basándose en su capacidad para unirse a la B7-4. Del mismo modo que el CTLA4, se activa rápidamente el PD-1 en la superficie de los linfocitos T como respuesta a los anti-CD3 (Agata et al. (1996) Int. Immunol. 8:765). Sin embargo, a diferencia del CTLA4, el PD-1 se activa asimismo en la superficie de los linfocitos B (como respuesta a los anti-IgM). También se expresa el PD-1 en un subconjunto de timocitos y mielocitos (Agata et al. (1996) supra; Nishimura et al. (1996) Int. Immunol. 8:773). La presente invención identifica la B7-4 como ligando del PD-1.

40 Diversos aspectos de la presente invención se describirán más detalladamente en los apartados siguientes:

I. Definiciones

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunocito" comprende células que son de origen hematopoyético y que desempeñan una función en la respuesta inmunitaria. Los inmunocitos comprenden linfocitos, tales como los linfocitos B y los linfocitos T; los linfocitos citolíticos naturales; mielocitos, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos, y granulocitos.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "linfocito T" comprende los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+. El término linfocito T comprende asimismo tanto los linfocitos T auxiliares de tipo 1 y los linfocitos T auxiliares de tipo 2. El término "célula que presenta antígenos" comprende células que presentan antígenos profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans), así como otras células que presentan antígenos (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos).

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "respuesta inmunitaria" comprende las respuestas inmunitarias en las que intervienen linfocitos T y/o linfocitos B que se ven influidas por la modulación de la coestimulación de los linfocitos T. Los ejemplos de respuestas inmunitarias comprenden las respuestas de los linfocitos T, por ejemplo, la producción de citocinas y la citotoxicidad celular. Además, el término respuesta inmunitaria comprende las respuestas inmunitarias que se efectúan indirectamente mediante la activación de los linfocitos T, por ejemplo, la producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de las células que responden a las citocinas, por ejemplo, los macrófagos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "receptor coestimulador" comprende receptores que transmiten una señal coestimuladora a un inmunocito, por ejemplo, CD28. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "receptores inhibidores" comprende receptores que transmiten una señal negativa a un inmunocito (por ejemplo, CTLA4 o PD-1). Se puede producir una señal inhibidora transducida por un receptor inhibidor incluso si un receptor coestimulador (tal como CD28) no se encuentra presente en el inmunocito y, de este modo, no es simplemente una función de competición entre los receptores inhibitorios y los receptores coestimulantes por la unión de moléculas coestimuladoras (Fallarino et al. (1998) J. Exp. Med. 188:205). La transmisión de una señal inhibidora a un inmunocito puede provocar la falta de respuesta o anergia o la muerte celular programada del inmunocito. Preferentemente la transmisión de una señal inhibidora funciona mediante un mecanismo que no implique la apoptosis. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "apoptosis" comprende la muerte celular programada que se puede caracterizar utilizando técnicas que son conocidas en la técnica. La apoptosis se puede caracterizar, por ejemplo, mediante la reducción del volumen celular, la formación de vesículas en la membrana y la condensación de la cromatina que culmina en la fragmentación de la célula. Las células que sufren apoptosis presentan asimismo un patrón característico de escisión del ADN internucleosómico.

En función de la conformación de la molécula B7-4 que se une a un receptor, tanto se puede transmitir una señal (por ejemplo, mediante una forma multivalente de molécula B7-4 que provoque la reticulación del receptor) como se puede inhibir una señal (por ejemplo, mediante una forma monovalente soluble de molécula B7-4), por ejemplo, compitiendo con la activación de formas de moléculas B7-4 para unirse al receptor. Sin embargo, existen casos en los que una molécula soluble puede ser estimuladora. Se pueden demostrar fácilmente los efectos de los diversos agentes moduladores utilizando ensayos rutinarios de identificación sistemática tal como se describe en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "coestimular", haciendo referencia a los inmunocitos activados, comprende la capacidad de una molécula coestimuladora para proporcionar una segunda señal en la que interviene el receptor no activador (una "señal coestimuladora") que provoca la multiplicación o una función efectora. Por ejemplo, una señal coestimuladora puede provocar la secreción de citocinas, por ejemplo, en un linfocito T que ha recibido una señal en la que intervienen receptores de linfocitos T. Los inmunocitos que han recibido una señal en la que interviene un receptor celular, por ejemplo, mediante un receptor activador se denominan en la presente memoria "inmunocitos activados".

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "receptor activador" comprende receptores de inmunocitos que se unen al antígeno, un antígeno que forma un complejo (por ejemplo, en relación con moléculas MHC), o se unen a los anticuerpos. Dichos receptores activadores comprenden receptores de linfocitos T (TCR), receptores de linfocitos B (BCR), receptores de citocinas, receptores LPS, receptores del complemento y receptores Fc.

Por ejemplo, se encuentran presentes receptores de linfocitos T en los linfocitos T y están asociados a moléculas CD3. Los receptores de linfocitos T se estimulan con antígenos con respecto a las moléculas MHC (así como mediante reactivos que activan linfocitos T policlonales). La activación de los linfocitos T con TCR provoca numerosos cambios, por ejemplo, la fosforilación de proteínas, cambios en los lípidos de membrana, flujos de iones, alteraciones en los nucleótidos cíclicos, cambios en la transcripción del ARN, cambios en la síntesis de proteínas y cambios en el volumen celular.

Los receptores de linfocitos B se encuentran presentes en los linfocitos B. Los receptores de antígenos de los linfocitos B son un complejo entre la Ig de membrana (mIg) y otros polipéptidos transmembrana (por ejemplo, Ig α y Ig β). La función de transducción de la señal de la mIg se activa mediante la reticulación de moléculas de receptores por antígenos oligoméricos o multiméricos. Los linfocitos B se pueden activar asimismo mediante anticuerpos antiinmunoglobulina. Tras la activación de los BCR, se producen numerosos cambios en los linfocitos B, entre ellos la fosforilación de la tirosina.

Los receptores Fc se encuentran en muchas células que participan en respuestas inmunitarias. Los receptores Fc (FcR) son receptores de superficie celular para la región Fc de las moléculas de inmunoglobulina (Ig). Entre los FcR humanos que se han identificado hasta el momento se encuentran los que reconocen las IgG (denominados Fc γ R), IgE (Fc ϵ R1), IgA (Fc α) y IgM/A polimerizadas (Fc μ R). Los FcR se encuentran en los siguientes tipos celulares: Fc ϵ R1 (mastocitos), Fc ϵ R.II (muchos leucocitos), Fc α R (neutrófilos) y Fc μ R (epitelio glandular, hepatocitos) (Hogg, N. (1988) Immunol. Today 9:185-86). Los Fc γ R, ampliamente estudiados, resultan fundamentales en las defensas inmunitarias celulares y son responsables de la estimulación de la liberación de mediadores de las inflamaciones y de enzimas hidrolíticas implicadas en la patogenia de la enfermedad autoinmunitaria (Unkeless, J. C. et al. (1988) Annu. Rev. Immunol. 6:251-81). Los Fc γ R proporcionan un vínculo fundamental entre las células efectoras y los linfocitos que secretan Ig, puesto que los Fc γ R de los macrófagos / monocitos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos citolíticos naturales (NK) proporcionan un elemento de reconocimiento específico en el que intervienen las IgG. Los leucocitos humanos presentan por lo menos tres receptores distintos con respecto a las IgG: h Fc γ RI (que

se encuentra en monocitos / macrófagos), hFcγRII (en monocitos, neutrófilos, eosinófilos, trombocitos, células, posiblemente linfocitos B y la estirpe celular K562) y Fcγ III (en linfocitos NK, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos).

5 Con respecto a los linfocitos T, la transmisión de una señal coestimuladora a un linfocito T implica una vía de señalización que no está inhibida por la ciclosporina A. Además, una señal coestimuladora puede provocar la secreción de citocinas (por ejemplo, IL-2 y / o IL-10) en un linfocito T y/o puede prevenir la activación de la falta de respuesta al antígeno, la activación de anergia o la activación de la muerte celular del linfocito T.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inhibidor de señal" se refiere a una señal transmitida a través de un receptor inhibitor (por ejemplo, CTLA4 o PD-1) para una molécula de un inmunocito. Dicha señal antagoniza con una señal a través de un receptor activador (por ejemplo, mediante una molécula TCR, CD3, BCR o Fc) y puede provocar, por ejemplo, la inhibición de segunda generación mensajera; una inhibición de la multiplicación; una inhibición de la función efectora del inmunocito, por ejemplo, la reducción de la fagocitosis, una reducción de la producción de anticuerpos, una reducción de la citotoxicidad celular, la incapacidad del inmunocito para producir mediadores (tales como citocinas (por ejemplo, IL-2) y/o mediadores de respuestas alérgicas); o el desarrollo de anergia.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "falta de respuesta" comprende la refractividad de los inmunocitos a la estimulación, por ejemplo, la estimulación mediante un receptor activador o una citocina. La falta de respuesta se puede producir, por ejemplo, debido a la exposición a inmunodepresores o a la exposición a dosis elevadas de antígeno. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anergia" o "tolerancia" comprende la refractividad para activar la estimulación en la que intervienen receptores. Dicha refractividad es generalmente específica del antígeno y persiste una vez ha cesado la exposición al antígeno responsable de la tolerancia. Por ejemplo, la anergia de los linfocitos T (a diferencia de la falta de respuesta) se caracteriza por la falta de producción de citocinas, por ejemplo, IL-2. La anergia de los linfocitos T se produce cuando los linfocitos T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (una señal en la que intervienen un receptor de los linfocitos T o CD-3) sin una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (incluso si se produce la reexposición en presencia de una molécula coestimuladora) provoca la incapacidad de producir citocinas y, de este modo, la incapacidad de multiplicación. Sin embargo, los linfocitos T anérgicos pueden desarrollar respuestas a antígenos no relacionados y se pueden multiplicar si se cultivan con citocinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, se puede observar asimismo la anergia de los linfocitos T debida a la falta de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T determinada mediante ELISA o con un ensayo de multiplicación utilizando una estirpe celular indicadora. Alternativamente, se puede utilizar un constructo de un gen indicador. Por ejemplo, los linfocitos T anérgicos no pueden iniciar la transcripción genética provocada por la IL-2 mediante un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen de la 5' IL-2 o mediante un multímero de la secuencia AP1 que se puede encontrar en el potenciador (Kang et al. (1992) Science 257:1134).

40 La proteína y las moléculas de ácido nucleico B7-4 comprenden una familia de moléculas que presentan ciertas características estructurales y funcionales conservadas. De un modo similar, la proteína y las moléculas de ácido nucleico PD-1 son miembros de una familia de moléculas que conservan las características estructurales y funcionales. El término "familia", cuando se refiere a la proteína y a las moléculas de ácido nucleico, significa dos o más proteínas o moléculas de ácido nucleico que presentan un dominio estructural o motivo común y presentan una homología suficiente en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos tal como se define en la presente memoria. Dichos miembros de la familia pueden ser naturales o no, y pueden pertenecer a la misma especie o a distintas. Por ejemplo, una familia puede comprender una primera proteína de origen humano, así como otras proteínas distintas de origen humano o alternativamente puede comprender homólogos de origen no humano. Los miembros de una familia pueden presentar asimismo características funcionales comunes. Las moléculas B7-4 descritas en la presente memoria son miembros de la familia de moléculas B7. El término "familia B7" o "moléculas B7" tal como se utiliza en la presente memoria comprende moléculas coestimuladoras que comparten homología en la secuencia con los polipéptidos B7, por ejemplo, con B7-1, B7-2, B7-3 (reconocidos por el anticuerpo BB-1), B7h (Swallow et al. (1999) Immunity 11:423), y/o B7-4. Por ejemplo, la B7-1 y la B7-2 humanas comparten aproximadamente el 26% de identidad en la secuencia de aminoácidos cuando se comparan utilizando el programa BLAST en el NCBI con los parámetros por defecto (matriz Blosum62 con penalizaciones de apertura establecidas en existencia 11 y extensión 1 (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)).

55 Los polipéptidos B7 preferidos pueden proporcionar señales inhibitoras o coestimuladoras a los inmunocitos para provocar o inhibir de este modo las respuestas de los inmunocitos. Por ejemplo, cuando se une a un receptor coestimulador, la B7-4 puede provocar la coestimulación de los inmunocitos o puede inhibir la coestimulación de los inmunocitos, por ejemplo, cuando se encuentra presente en forma soluble. Cuando se unen a un receptor inhibitor, las moléculas B7-4 pueden transmitir una señal inhibitora a un inmunocito. Los miembros de la familia B7 preferidos comprenden B7-1, B7-2, B7-3 (reconocidos por el anticuerpo BB-1), B7h, y B7-4 y fragmentos solubles o derivados de los mismos. En una forma de realización, los miembros de la familia B7 se unen a uno o más receptores de un inmunocito, por ejemplo, CTLA4, CD28, ICOS, PD-1 y/o otros receptores y, en función del receptor, presentan la

capacidad de transmitir una señal inhibitora o una señal coestimuladora a un inmunocito, preferentemente un linfocito T.

5 Las moléculas PD-1 pueden transmitir una señal inhibitora a un inmunocito para inhibir de este modo la función efectora de los inmunocitos o pueden activar la coestimulación (por ejemplo, mediante inhibición competitiva) de los inmunocitos, por ejemplo, cuando se encuentra presente en forma soluble, monomérica. Los miembros preferidos de la familia PD-1 se unen a uno o más receptores, por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-4, y/u otras moléculas de las células que presentan antígenos y comparten identidad en la secuencia con el PD-1.

10 Además, en una forma de realización, las proteínas que son miembros de una familia de proteínas se unen a anticuerpos generados contra una o más proteínas miembro de otra familia. Por ejemplo, el anticuerpo contra 1-BB reconoce las moléculas B7-4.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "actividad" con respecto a un polipéptido B7-4 o PD-1 comprende actividades que son inherentes a la estructura de una proteína B7-4 o PD-1. Con respecto a B7-4, el término "actividad" comprende la capacidad de modular la coestimulación de inmunocitos, por ejemplo, modulando una señal coestimuladora en un inmunocito activado o de modular la inhibición modulando una señal inhibitora en un inmunocito, por ejemplo, acoplado un receptor natural con un inmunocito. Cuando una forma activadora de la molécula B7-4 se une a un receptor coestimulador, se genera una señal coestimuladora en el inmunocito. Cuando una forma activadora de la molécula B7-4 se une a un receptor inhibitor, se genera una señal inhibitora en el inmunocito.

20 La modulación de una señal coestimuladora provoca la modulación de la función efectora de un inmunocito. Por lo tanto, el término "actividad B7-4" comprende la capacidad de un polipéptido B7-4 para unirse a su(s) receptor(es) natural(es), la capacidad de modular las señales coestimuladoras o inhibitoras de los inmunocitos y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

25 Con respecto al PD-1, el término "actividad" comprende la capacidad de un polipéptido de PD-1 para modular una señal inhibitora en un inmunocito activado, por ejemplo, acoplándose a un ligando natural de una célula que presenta antígenos. El PD-1 transmite una señal inhibitora a un inmunocito de un modo similar al CTLA4. La modulación de una señal inhibitora en un inmunocito provoca la modulación de la multiplicación y/o la secreción de citocinas por parte de un inmunocito. El PD-1 puede modular asimismo una señal coestimuladora compitiendo con un receptor coestimulador con respecto a la unión con una molécula B7. Por lo tanto, el término "actividad PD-1" comprende la capacidad de un polipéptido PD-1 para unirse a su(s) ligando(s) natural(es), la capacidad de modular las señales coestimuladoras o inhibitoras de los inmunocitos y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico "natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que presenta una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "homosentido" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADN bicatenario, complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la cadena codificante de un gen. Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico antisentido puede formar puentes de hidrógeno con una molécula de ácido nucleico homosentido.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "región codificante" se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que comprenden codones que se traducen en aminoácidos, mientras que el término "región no codificante" se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo regiones sin traducir 5' y 3').

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede de transportar otra molécula de ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que segmentos se pueden ligar de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Ciertos vectores pueden realizar una reproducción autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamíferos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, de este modo, se reproducen junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de los genes a los que se encuentran unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" o simplemente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se

pueden utilizar indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la presente invención pretende comprender otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus que no se pueden reproducir, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "célula hospedadora" se refiere a una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico de la presente invención, tal como un vector de expresión recombinante de la presente invención. Los términos "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Se debe comprender que dichos términos se refieren no únicamente a la
10 célula particular sino a la descendencia o descendencia potencial de dicha célula. Puesto que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debidas a mutaciones o a factores ambientales, de hecho dicha descendencia puede no ser idéntica a la célula original, pero aun así se encuentran comprendidas dentro del alcance del término tal como se utiliza en la presente memoria.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal transgénico" se refiere a un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que una o más de las células del animal incluye un "transgén". El término "transgén" se refiere a un ADN exógeno que se integra en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, por ejemplo dirigiendo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del animal
20 transgénico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal recombinante homólogo" se refiere a un tipo de animal transgénico no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que se ha alterado un gen endógeno por recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida en
25 una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal, antes del desarrollo del animal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "proteína aislada" se refiere a una proteína que se encuentra sustancialmente sin otras proteínas, material celular y medio de cultivo cuando se aísla a partir de células o se ha producido por técnicas de ADN recombinante, o a partir de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Una proteína "aislada" o "purificada" o una región biológicamente activa de la misma se encuentra sustancialmente sin material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que se obtiene la proteína B7-4 o PD-1, o sustancialmente sin precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente sin material celular" comprende preparaciones de la proteína B7-4 o PD-1 en las que la proteína se separa de componentes celulares de las células de las que se
30 aísla o se produce por recombinación. En una forma de realización, la expresión "sustancialmente sin material celular" comprende preparaciones de la proteína B7-4 o PD-1 que presentan menos de aproximadamente un 30 % (en peso seco) de proteína que no es B7-4 o PD-1 (a la que también se hace referencia en la presente memoria como "proteína contaminante"), más preferentemente menos de aproximadamente un 20 % de proteína que no es B7-4 o PD-1, aún más preferentemente menos de aproximadamente un 10 % de proteína que no es B7-4 o PD-1 y todavía más preferentemente menos de aproximadamente un 5 % de proteína que no es B7-4 o PD-1. Cuando la proteína B7-4 o PD-1 o una región biológicamente activa de la misma se produce por recombinación, se encuentra asimismo preferentemente sustancialmente sin medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, más preferentemente menos de aproximadamente un 10 % y aún más preferentemente
35 menos de aproximadamente un 5 % del volumen de la preparación de proteína.

45 La expresión "sustancialmente sin precursores químicos u otros productos químicos" comprende preparaciones de proteína B7-4 o PD-1 en las que la proteína se encuentra separada de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una forma de realización, la expresión "sustancialmente sin precursores químicos u otros productos químicos" comprende preparaciones de proteína B7-4 o PD-1 que presentan menos de aproximadamente un 30 % (en peso seco) de precursores químicos o de productos químicos que no pertenecen a B7-4 o PD-1, más preferentemente menos de aproximadamente un 20 % de precursores químicos o de productos químicos que no pertenecen a B7-4 o PD-1, aún más preferentemente menos de aproximadamente un 10 % de precursores químicos o de productos químicos que no pertenecen a B7-4 o PD-1 químicos, y más preferentemente menos de aproximadamente un 5 % de precursores químicos o de productos
50 químicos que no pertenecen a B7-4 o PD-1.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria comprende asimismo una "región de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "región del anticuerpo"). El término "región de unión al antígeno", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la
60 capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, B7-4). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar con fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar con fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos por el término "región de unión al

antígeno" de un anticuerpo comprenden (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que comprende los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que comprende un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos de recombinación, por un ligador sintético que les permite formarse como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fvmonocatenarias (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Osbourn et al. 1998, Nature Biotechnology 16: 778). Dichos anticuerpos monocatenarios están destinados asimismo a quedar comprendidos dentro del término "región de unión al antígeno" de un anticuerpo. Cualquier secuencia VH y VL de scFv específico se pueden ligar al ADNc o secuencias genómicas de la región constante de la inmunoglobulina humana, a fin de generar vectores de expresión que codifiquen moléculas de IgG completas u otros isotipos. Se pueden utilizar asimismo VH y V1 en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de inmunoglobulinas utilizando química de proteínas o formas tecnología de ADN recombinante. También quedan comprendidos otros anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, provocando de este modo que los dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Además, un anticuerpo o región de unión al antígeno del mismo puede formar parte de unas moléculas de inmunoadherencia mayores, formadas mediante la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o región del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadherencia comprenden la utilización de la región del núcleo de estreptavidina para realizar una molécula scFvtetramérica (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y la utilización de una cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidinacarboxiterminal para realizar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Se pueden preparar regiones de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos enteros utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Además, se pueden obtener anticuerpos, regiones de anticuerpos y moléculas de inmunoadherencia utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, tal como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos o singénicos; o formas modificadas de los mismos, por ejemplo, humanizados, quiméricos, etc. Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente o sustancialmente específicamente a moléculas B7-4. El término "anticuerpos monoclonales" y "composición de anticuerpos monoclonales", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a una población de moléculas de anticuerpos que comprenden únicamente una especie de un sitio de unión al antígeno capaz de realizar una reacción inmunitaria con un epítipo particular de un antígeno, mientras que el término "anticuerpos policlonales" y "composición de anticuerpos policlonales" se refieren a una población de moléculas de anticuerpos que comprenden una pluralidad de especies de sitios de unión al antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpos monoclonales, presenta habitualmente una afinidad de unión única hacia un antígeno particular con el que realiza la reacción inmunitaria.

El término "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende que comprenda los anticuerpos sintetizados por una célula no humana que presenta regiones variables y constantes que se han alterado para que se parezca más a los anticuerpos que sintetizaría una célula humana. Por ejemplo, se altera la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano para incorporar los aminoácidos encontrados en las secuencias de inmunoglobulinas de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden comprender residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR. El término "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza en la presente memoria, comprende asimismo anticuerpos en los que las secuencias CDR obtenidas de la estirpe germinal de otra especie de mamíferos, tales como un ratón, se han incorporado a secuencias estructurales humanas.

Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que se encuentra sustancialmente sin otros anticuerpos que presentan especificidades antigénicas distintas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la B7-4 sustancialmente no presenta anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos que la B7-4). Además, un anticuerpo aislado puede sustancialmente no presentar otro material celular y/o productos químicos.

Existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias de nucleótidos que pueden codificar la proteína, tal como define el código genético (mostrado a continuación). Del mismo modo, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico particular y la secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico, tal como define el código genético.

	CÓDIGO GENÉTICO	
	Alanina (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
	Arginina (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
10	Asparagina (Asn, N)	AAC, AAT
	Ácido aspártico (Asp, D)	GAC, GAT
	Cisteína (Cys, C)	TGC, TGT
	Ácido glutámico (Glu, E)	GAA, GAG
	Glutamina (Gln, Q)	CAA, CAG
15	Glicina (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
	Histidina (His, H)	CAC, CAT
	Isoleucina (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
	Leucina (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
	Lisina (Lys, K)	AAA, AAG
20	Metionina (Met, M)	ATG
	Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
	Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
	Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
	Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
25	Triptófano (Trp, W)	TGG
	Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
	Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
	Señal de finalización (final)	TAA, TAG, TGA

Una característica importante y muy conocida del código genético es su redundancia, por lo que, en el caso de la mayoría de los aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas, se puede utilizar más de un triplete de nucleótidos codificantes (ilustrados anteriormente). Por lo tanto, diversas secuencias distintas de nucleótidos pueden codificar una secuencia de aminoácidos determinada. Dichas secuencias de nucleótidos se consideran funcionalmente equivalentes ya que producen la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (aunque ciertos organismos pueden traducir algunas secuencias más eficientemente que otros). Además, ocasionalmente, se puede encontrar una variante metilada de una purina o pirimidina en una secuencia de nucleótidos determinada. Dichas metilaciones no influyen en la relación de codificación entre el codón de trinucleótido y el aminoácido correspondiente.

En vista de lo anterior, se puede utilizar la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN o ARN que codifica para un polipéptido de la presente invención B7-4 o PD-1 (o cualquier región del mismo) para obtener la secuencia de aminoácidos de B7-4 o PD-1, utilizando el código genético para traducir la molécula de ADN o ARN a una secuencia de aminoácidos. Asimismo, en el caso de cualquier secuencia de aminoácidos B7-4 o PD-1, se pueden deducir las secuencias de nucleótidos correspondientes que pueden codificar la proteína B7-4 o PD-1 a partir del código genético (que, debido a su redundancia, producirá una pluralidad de secuencias de ácido nucleico para cualquier secuencia de aminoácidos determinada). Por lo tanto, debe considerarse que la descripción y/o la presentación en la presente memoria de una secuencia de nucleótidos de B7-4 o PD-1 comprende asimismo la descripción y/o presentación de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. De un modo similar, debe considerarse que la descripción y/o presentación de una secuencia de aminoácidos B7-4 o PD-1 en la presente memoria comprende asimismo la descripción y/o la presentación de todas las posibles secuencias de nucleótidos que pueden codificar la secuencia de aminoácidos.

II. Moléculas aisladas de ácido nucleico

En una forma de realización, agentes moduladores para utilizar en los métodos descritos comprenden moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican las proteínas B7-4 o PD-1 o regiones biológicamente activas de las mismas. Se proporcionan asimismo fragmentos de ácido nucleico suficientes para utilizar como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican B7-4 o PD-1 (por ejemplo, ARNm de B7-4 o PD-1) y fragmentos para utilizar como cebadores de la PCR para la amplificación o mutación de las moléculas de ácido nucleico de B7-4 o PD-1. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "molécula de ácido nucleico" comprende moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que se encuentra separada de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislado" comprende moléculas de ácido nucleico que se encuentran separadas del cromosoma con el que se asocia de un modo natural al ADN genómico. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico "aislada" no presenta secuencias flanqueadoras naturales de la molécula de ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se obtiene la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas formas de realización, la molécula de ácido nucleico aislada B7-4 o PD-1 puede comprender menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos flanqueadoras naturales de la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se obtiene el ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede no presentar sustancialmente otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de recombinación, o puede no presentar sustancialmente precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico "aislada" B7-4 o PD-1 puede estar ligada a otras secuencias de nucleótidos que normalmente no flanquean las secuencias de B7-4 o PD-1 en el ADN genómico (por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de B7-4 o PD-1 pueden estar ligadas a secuencias de vectores). En ciertas formas de realización preferidas, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede asimismo no presentar otro material celular. Sin embargo, no es necesario que la molécula de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 no presente otro material celular para considerarse "aislada" (por ejemplo, una molécula de ADN de B7-4 o PD-1 separado de otro ADN de mamíferos e insertada en una célula bacteriana todavía se consideraría como "aislada").

Una molécula de ácido nucleico de la presente memoria, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que presenta las secuencias de nucleótidos SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 o una región de las mismas, puede aislarse utilizando técnicas de biología molecular estándar y la información de la secuencia que se proporciona en la presente memoria. Por ejemplo, utilizando la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 totales o una región de las mismas, como sonda de hibridación, se pueden aislar las moléculas de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 utilizando técnicas de hibridación y clonación estándar (por ejemplo, tal como se describe en Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Además, se puede aislar una molécula de ácido nucleico que comprende las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 totales o una región de las mismas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores de oligonucleótidos sintéticos diseñados basándose en la secuencia de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, respectivamente.

Se puede amplificar un ácido nucleico de la presente invención utilizando ADNc, ARNm o alternativamente, ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados según técnicas estándar de amplificación por PCR. Se puede clonar el ácido nucleico amplificado de este modo en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de la secuencia de ADN. Además, se pueden preparar los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de nucleótidos de B7-4 o PD-1 mediante técnicas de síntesis estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

En una forma de realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11.

En otra forma de realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, o una región de cualquiera de dichas secuencias de nucleótidos. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, es una suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, respectivamente, de tal modo que se puede hibridar a la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, respectivamente, formando con ello un dúplex estable.

En otra forma de realización preferida adicional, una molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos aproximadamente un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o más homóloga a la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, a toda la longitud de la secuencia de nucleótidos) mostrada en la SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, o una región de cualquiera de dichas secuencias de nucleótidos.

Además, la molécula de ácido nucleico puede comprender únicamente una región de la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.º 1, 3, 10, o 11, por ejemplo un fragmento que se puede utilizar como sonda o cebador o un fragmento que codifica una región biológicamente activa de una proteína B7-4 o PD-1. La secuencia de nucleótidos determinada a partir de la clonación de los genes de B7-4 o PD-1 permite generar sondas y cebadores diseñados

para utilizar en la identificación y/o clonación de otros miembros de la familia de B7-4 o PD-1, así como homólogos de la familia de B7-4 o PD-1 de otras especies. La sonda / cebador comprende normalmente un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido comprende normalmente una región con una secuencia de nucleótidos que se hibrida en unas condiciones estrictas con por lo menos aproximadamente 12 o 15, preferentemente aproximadamente 20 o 25, más preferentemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 75 nucleótidos consecutivo de una secuencia homosen sentido de las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, o de una variante alélica de origen natural o mutante de las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11. En un ejemplo de forma de realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que presenta por lo menos 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 u 800 nucleótidos de longitud y se hibrida en unas condiciones estrictas de hibridación con una molécula de ácido nucleico de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11.

En una forma de realización adicional, una segunda molécula de ácido nucleico comprende por lo menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos contiguos de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11.

En una forma de realización, una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, para utilizar como una sonda, no comprende la región de la SEC ID N.º 1 desde aproximadamente los nucleótidos 815 hasta aproximadamente 850 de la SEC ID N.º 1 o aproximadamente los nucleótidos 320 hasta 856 de la SEC ID N.º 1. En otra forma de realización, una molécula de ácido nucleico no comprende la región de la SEC ID N.º 3 a partir de aproximadamente los nucleótidos 314 hasta aproximadamente 734, o desde aproximadamente los nucleótidos 835 hasta aproximadamente 860, o desde aproximadamente los nucleótidos 1085 hasta aproximadamente 1104 o desde aproximadamente los nucleótidos 1286 hasta aproximadamente 1536 de la SEC ID N.º 3.

En una forma de realización, una molécula de ácido nucleico comprende por lo menos aproximadamente 500 nucleótidos contiguos de SEC ID N.º 1 o SEC ID N.º 3. En una forma de realización preferida, una molécula de ácido nucleico comprende por lo menos aproximadamente 600, por lo menos aproximadamente 700, por lo menos aproximadamente 800, por lo menos aproximadamente 900 o por lo menos aproximadamente 950 nucleótidos contiguos de SEC ID N.º 1 o aproximadamente 1000 nucleótidos contiguos de SEC ID N.º 3. En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico comprende por lo menos aproximadamente 1500 o 1550 nucleótidos de SEC ID N.º 3.

Preferentemente, una molécula de ácido nucleico aislada comprende por lo menos una parte de la región codificante de la SEC ID N.º 1 (mostrada en los nucleótidos 59 a 793) o de la SEC ID N.º 3 (mostrada en los nucleótidos 53 a 922). En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico de B7-4 comprende desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 319 de la SEC ID N.º 1. En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico de B7-4 comprende desde aproximadamente el nucleótido 855 hasta aproximadamente el nucleótido 968 de la SEC ID N.º 1. En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico de B7-4 comprende desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 314 de la SEC ID N.º 3. En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico de B7-4 comprende desde aproximadamente el nucleótido 955 hasta aproximadamente el nucleótido 1285 de la SEC ID N.º 3. En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico de B7-4 comprende desde aproximadamente el nucleótido 1535 hasta aproximadamente el nucleótido 1552 de la SEC ID N.º 3.

En unas formas de realización adicionales, una molécula de ácido nucleico presenta por lo menos un 70 % de identidad, más preferentemente un 80 % de identidad e incluso más preferentemente un 90 % de identidad con una molécula de ácido nucleico que comprende: por lo menos aproximadamente 500, por lo menos aproximadamente 600, por lo menos aproximadamente 700, por lo menos aproximadamente 800, por lo menos aproximadamente 900 o por lo menos aproximadamente 1000 nucleótidos contiguos de SEC ID N.º 1 o SEC ID N.º 3.

Se pueden utilizar sondas basadas en las secuencias de nucleótidos de B7-4 o PD-1 para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas proteínas o proteínas homólogas. En las formas de realización preferidas, la sonda comprende además un grupo marcador unido a la misma, por ejemplo, el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas se pueden utilizar como parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan incorrectamente una proteína B7-4 o PD-1, por ejemplo determinando un nivel de un ácido nucleico que codifica B7-4 o PD-1 en una muestra de células de un paciente por ejemplo, detectando los niveles de ARNm de B7-4 o PD-1 o determinando si un gen de B7-4 o PD-1 genómico ha mutado o se ha suprimido.

Un fragmento de ácido nucleico que codifica una "región biológicamente activa de una proteína B7-4 o PD-1" se puede preparar aislando una región de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 que codifica un polipéptido que presenta actividad biológica B7-4 o PD-1 (las actividades biológicas de las proteínas B7-4 o PD-1 se describen en la presente memoria), expresando la región codificada de la proteína B7-4 o PD-1 (por ejemplo, mediante expresión recombinante in vitro) y analizando la actividad de la región codificada de la proteína B7-4 o PD-1.

Las moléculas de ácido nucleico que difieren de las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 debido a la degeneración del código genético y, por lo tanto, codifican la misma proteína B7-4 o PD-1 que la codificada por las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, se encuentran comprendidas por la presente invención. Por consiguiente, en una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico aislada presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N.º 2, 4 o 12. En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico aislada presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína B7-4 o PD-1.

Además de las secuencias de nucleótidos de B7-4 o PD-1 mostradas en la SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 los expertos en la materia deberían apreciar que, dentro de una población (por ejemplo, la población humana), pueden existir polimorfismos de la secuencia de ADN que provocan cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas B7-4 o PD-1. Se puede producir dicho polimorfismo genético en los genes de B7-4 o PD-1 entre individuos de una población debido a la variación alélica natural. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica una proteína B7-4 o PD-1, preferentemente una proteína de mamífero B7-4 o PD-1, y pueden comprender además secuencias reguladoras no codificantes e intrones. Dichas variaciones alélicas naturales comprenden proteínas B7-4 o PD-1 funcionales y no funcionales, y pueden provocar normalmente entre un 1 % y un 5 % de la varianza en la secuencia de nucleótidos de un gen B7-4 o PD-1. Se pretende que dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en los genes de B7-4 o PD-1 que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de una proteína B7-4 o PD-1 queden comprendidas por el alcance de la presente invención.

Además, se pretende que las moléculas de ácido nucleico que codifican otros miembros de la familia de B7-4 o PD-1 y, por lo tanto, que presentan una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de la familia de B7-4 o PD-1 de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 queden comprendidas por el alcance de la presente invención. Por ejemplo, se puede identificar otro ADNc de B7-4 o PD-1 basándose en la secuencia de nucleótidos de las B7-4 o PD-1 humanas. Además, se pretende que las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas B7-4 o PD-1 de distintas especies y, por lo tanto, presentan una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencias B7-4 o PD-1 de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 queden comprendidas por el alcance de la presente invención. Por ejemplo, se pueden identificar un ADNc B7-4 o PD-1 de ratón basándose en la secuencia de nucleótidos de una molécula de B7-4 o PD-1 humana.

Las moléculas de ácido nucleico que corresponden a variantes alélicas naturales y homólogos de los ADNc de B7-4 o PD-1 ADNc de la presente invención se pueden aislar basándose en su homología con los ácidos nucleico de B7-4 o PD-1 descritos en la presente memoria utilizando los ADNc descritos en la presente memoria, o una región de los mismos, como sonda de hibridación según técnicas estándar de hibridación. Por ejemplo, se puede aislar un ADN de B7-4 o PD-1 de una genoteca de ADN genómico humano utilizando la totalidad o una parte de las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 como sonda de hibridación y técnicas de hibridación estándar (por ejemplo, tal como se describen en Sambrook, J., et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Además, se puede aislar una molécula de ácido nucleico que comprende todo o una región de un gen de B7-4 o PD-1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores de oligonucleótidos diseñados basándose en la secuencia de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11. Por ejemplo, se puede aislar el ARNm a partir de células (por ejemplo, mediante el procedimiento de extracción con tiocianato de Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) y se puede preparar ADNc utilizando la transcriptasa inversa (por ejemplo, la transcriptasa inversa de Moloney MLV, disponible en GibcoBRL, Bethesda, MD, o transcriptasa inversa AMV, disponible en SeikagakuAmerica, Inc., St. Petersburg, FL). Se pueden diseñar cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación por PCR basándose en la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11. Se puede amplificar una molécula de ácido nucleico de la presente invención utilizando ADNc o, alternativamente, ADN genómico, como una plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados según las técnicas estándar de amplificación por PCR. Se puede clonar el ácido nucleico amplificado de este modo en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de la secuencia de ADN. Además, se pueden preparar oligonucleótidos correspondientes a una secuencia de nucleótidos B7-4 o PD-1 mediante técnicas de síntesis estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico aislada presenta por lo menos 15, 20, 25, 30 o más nucleótidos de longitud y se hibrida en condiciones estrictas con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11. En una forma de realización adicional, la molécula de ácido nucleico presenta por lo menos 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 nucleótidos de longitud. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hibrida en unas condiciones estrictas" pretende describir unas condiciones de hibridación y lavado en las que las secuencias de nucleótidos por lo menos un 30 %, un 40 %, un 50 % o un 60 % homólogas entre sí permanecen normalmente hibridadas entre sí. Preferentemente, las condiciones son de tal modo que las secuencias por lo menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente por lo menos aproximadamente un 80 %, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente un 85 % o un 90 % homólogas entre sí permanecen normalmente hibridadas entre sí. Los

expertos en la materia conocen dichas condiciones estrictas y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido no limitativo de condiciones de hibridación estrictas comprende la hibridación en 6X cloruro sódico / citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1% SDS a 50-65 °C. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico aislada que se hibrida en unas condiciones estrictas con la secuencia de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 corresponde a una molécula de ácido nucleico natural.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico "natural" se refiere a una molécula de ARN o ADN que presenta una secuencia de nucleótidos que se produce en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural). Además de las secuencias de nucleótidos de B7-4 o PD-1 mostradas en las SEC ID N.º 1, 3, 10 y 11, los expertos en la materia deben apreciar en una población pueden existir polimorfismos en la secuencia de ADN que provoquen cambios menores en las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos de una B7-4 o PD-1. Se puede producir dicho polimorfismo genético en un gen de B7-4 o PD-1 entre individuos de una población debido a la variación alélica natural. Dichas variaciones alélicas naturales pueden provocar normalmente entre un 1 % y un 2 % de la varianza en la secuencia de nucleótidos del gen. Dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en una B7-4 o PD-1 que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional de un polipéptido B7-4 o PD-1 se encuentran comprendidas por el alcance de la presente invención.

Además de las variantes alélicas naturales de las secuencias de B7-4 o PD-1 que pueden existir en la población, los expertos en la materia apreciarán además que se pueden introducir cambios menores por mutación en las secuencias de nucleótidos, por ejemplo, de la SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11, lo que produce cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, sin alterar la actividad funcional de una proteína B7-4 o PD-1. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de nucleótidos que provocan sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos "no esenciales" en la secuencia de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11. Un aminoácido "no esencial" es un aminoácido que se puede alterar a partir de la secuencia natural de una molécula de ácido nucleico de B7-4 (por ejemplo, la secuencia de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11) sin alterar la actividad funcional de una molécula B7-4 o PD-1. Preferentemente, los residuos del dominio extracelular de B7-4 o PD-1 que se ha descubierto que son necesarios para la unión de B7-4 a un receptor o PD-1 con respecto a un ligando natural (por ejemplo, identificado realizando una identificación sistemática por mutagénesis con respecto a la alanina u otro ensayo de identificación sistemática reconocido) no se alteran. En el caso de las moléculas de B7-4, los ejemplos de aminoácidos que no son esenciales y, por lo tanto, susceptibles de sustitución, el experto ordinario en la materia los puede identificar realizando una alineación de aminoácidos de miembros de la familia B7 (o de miembros de la familia B7-4) y determinar qué aminoácidos no se conservan. Dichos aminoácidos, puesto que no se han conservado, son más susceptibles de sustitución.

Por consiguiente, otro aspecto de la descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas B7-4 o PD-1 que contienen cambios en aminoácidos que no son esenciales para la actividad de la B7-4 o el PD-1. Dichas proteínas B7-4 o PD-1 difieren en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2, 4 o 12 aunque conservan una actividad inherente de la B7-4 o, en el caso del PD-1, conservan la capacidad de unirse a la B7-4. Se puede crear una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante no natural de una proteína B7-4 o PD-1 introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 de tal modo que se introducen en la proteína codificada una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir las mutaciones en las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 mediante técnicas estándar, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediante PCR. Preferentemente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos se realizan en uno o más aminoácidos no esenciales. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que el aminoácido se sustituye con un aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Las familias de aminoácidos que presentan cadenas laterales similares se han definido en la técnica, comprendiendo aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en β (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un aminoácido no esencial de una B7-4 o PD-1 se sustituye preferentemente con otro aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

Alternativamente, en otra forma de realización, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente en la totalidad o parte de una secuencia de codificación de B7-4 o PD-1, por ejemplo por mutagénesis de saturación, y se pueden seleccionar los mutantes resultantes con respecto a su capacidad de unirse al ADN y/o activar la transcripción, para identificar aquellos mutantes que conservan la actividad funcional. Tras la mutagénesis, la proteína mutante codificada B7-4 o PD-1 se puede expresar por recombinación en una célula hospedadora y se puede determinar la actividad funcional de la proteína mutante utilizando los ensayos disponibles en la técnica para analizar la actividad de la B7-4 o del PD-1.

Por consiguiente, otro aspecto de la descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas B7-4 o PD-1 que contienen cambios en aminoácidos que no son esenciales para su actividad.

- 5 Otro aspecto adicional de la descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las proteínas de fusión B7-4 o PD-1. Dichas moléculas de ácido nucleico, que comprenden por lo menos una primera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, polipéptido o péptido de B7-4 o PD-1 ligado operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, polipéptido o péptido no B7-4 ni PD-1, se pueden preparar mediante técnicas estándar de ADN recombinante.
- 10 En una forma de realización preferida, se puede analizar una proteína mutante B7-4 con respecto a la capacidad de: 1) coestimular (o inhibir la coestimulación de, por ejemplo, en forma soluble) la multiplicación y/o la función efectora de los linfocitos activados; 2) unirse a una familia anti-B7 o anticuerpo anti-B7-4; y/o 3) unirse a un/unos receptor(es) natural(es) de B7-4 (por ejemplo, PD-1).
- 15 En una forma de realización preferida, se puede analizar una proteína mutante PD-1 con respecto a la capacidad de: 1) inhibir la coestimulación de (por ejemplo, en forma soluble) la multiplicación y/o la función efectora de los linfocitos activados; 2) unirse a un anticuerpo anti-PD-1; y/o 3) unirse a un/unos receptor(es) natural(es) de PD-1 (por ejemplo, B7-4).
- 20 Además de las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas B7-4 o PD-1 descritas anteriormente, las moléculas de ácido nucleico aisladas que son antisentido con respecto a las mismas se pueden utilizar como agentes de modulación. Una ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "homosentido" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADN bicatenaria o complementaria a una secuencia de ARNm. Por consiguiente, un ácido nucleico antisentido puede formar puentes de hidrógeno con un ácido nucleico homosentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una cadena codificante de B7-4 o PD-1, o únicamente a una parte de la misma. En una forma de realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con respecto a una "región codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica B7-4 o PD-1. El término "región codificante" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en aminoácidos. En una forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con respecto a una "región no codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica B7-4 o PD-1. El término "región no codificante" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traducen en aminoácidos (es decir, a las que se hace referencia también como regiones no traducidas 5' y 3').
- 35 Dadas las secuencias de cadena codificante que codifican B7-4 o PD-1 descritas en la presente memoria, se pueden diseñar los ácidos nucleicos antisentido de la presente invención según las reglas de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región codificante entera del ARNm de B7-4 o PD-1, pero más preferentemente es un oligonucleótido que es antisentido con respecto a únicamente una parte de la región codificante o no codificante del ARNm de B7-4 o PD-1. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción del ARNm de B7-4 o PD-1. Un oligonucleótido antisentido puede presentar, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Se puede construir un ácido nucleico antisentido de la presente invención utilizando reacciones de síntesis química y de ligación enzimática mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede sintetizar químicamente una molécula de ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) utilizando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de distintos modos diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y homosentido, por ejemplo, se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar el ácido nucleico antisentido comprenden 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5- (carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, β -D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, β -D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, se puede producir biológicamente el ácido nucleico antisentido utilizando un vector de expresión en el que un ácido nucleico se ha subclonado en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado presente de una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés, que se describirá posteriormente en el apartado siguiente)
- 60

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la presente memoria se administran normalmente a un paciente o se generan *in situ* de tal modo que se hibridan con, o se unen a, ARNm celular y/o ADN genómico que codifica una proteína B7-4 o PD-1 para inhibir de este modo la expresión de la proteína, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o la traducción. Se puede producir la hibridación mediante complementariedad de nucleótidos convencional para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a un dúplex de ADN, mediante interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una vía de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la presente invención comprende inyección directa en un sitio de tejido. Alternativamente, se pueden modificar las moléculas de ácido nucleico antisentido para dirigirse a células seleccionadas y a continuación administrarse por vía sistémica. Por ejemplo, para la administración sistémica, se pueden modificar las moléculas antisentido de tal modo que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, ligando las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores de superficie celular o antígenos. Las moléculas de ácido nucleico antisentido se pueden entregar asimismo a las células utilizando los vectores descritos en la presente memoria. Para alcanzar unas concentraciones intracelulares suficientes de moléculas antisentido, se prefieren los constructos de vectores en los que se dispone molécula de ácido nucleico antisentido bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

En una forma de realización adicional, la molécula de ácido nucleico antisentido es una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, a diferencia de las unidades β habituales, las cadenas discurren paralelas entre sí (Gaultier et al. (1987) *NucleicAcids. Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede comprender asimismo un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al. (1987) *NucleicAcids Res.* 15:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et al. (1987) *FEBSLett.* 215:327-330).

En otra forma de realización adicional, una molécula de ácido nucleico antisentido es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que pueden escindir una molécula de ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, para el que disponen de una región complementaria. De este modo, se pueden utilizar ribozimas (por ejemplo, ribozimas en cabeza de martillo (descritas en Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm de B7-4 o PD-1 para inhibir de este modo la traducción del ARNm B7-4 o PD-1. Se puede diseñar una ribozima que presente especificidad hacia un ácido nucleico codificante de B7-4 o PD-1 basándose en la secuencia de nucleótidos de un ADNc de B7-4 o PD-1 descrito en la presente memoria (es decir, SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11). Por ejemplo, se puede construir un derivado de un ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo sea complementaria a la secuencia de nucleótidos que se debe escindir en un ARNm que codifica B7-4 o PD-1. Véase, por ejemplo, Cech et al. patente US n.º. 4.987.071; y Cech et al. patente US n.º 5.116.742. Alternativamente, se pueden utilizar ARNm de B7-4 o PD-1 para seleccionar un ARN catalítico que presente una actividad ribonucleasa específica de un grupo de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo, Bartel, D. and Szostak, J. W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternativamente, se puede inhibir la expresión de los genes de B7-4 o PD-1 mediante direccionamiento de secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de la B7-4 o del PD-1 (por ejemplo, el promotor y/o potenciadores de B7-4 o PD-1) para formar estructuras de triple hélice que impiden la transcripción del gen de la B7-4 o del PD-1 en las células diana. Véase, de un modo general, Helene, C. (1991) *AnticancerDrug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher, L. J. (1992) *Bioessays* 14(12):807-15.

En otra forma de realización adicional, se pueden modificar las moléculas de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 de la presente memoria en la región de la base, la región del glúcido o en la cadena de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, se puede modificar la cadena principal de desoxirribosa fosfato de las moléculas de ácido nucleico para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup, B. and Nielsen, P. E. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4(1):5-23). Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "ácidos nucleicos peptídicos" o "PNA" se refieren a moléculas que imitan el ácido nucleico, por ejemplo, que imitan el ADN, en las que la cadena principal de desoxirribosa fosfato se sustituye por una cadena principal pseudopeptídica y se mantienen únicamente las cuatro bases nitrogenadas naturales. Se ha demostrado que la cadena principal vertebral neutra de los PNA permite la hibridación específica a ADN y ARN en unas condiciones de baja fuerza iónica. Se pueden sintetizar oligómeros de PNA utilizando protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida estándar tal como se describe en Hyrup and Nielsen (1996) *supra* and Perry-O'Keefe et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670-675.

Se pueden utilizar PNA de moléculas de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, se pueden utilizar los PNA como agentes antisentido o antígenos para la modulación específica de la secuencia de la expresión génica, por ejemplo, provocando la transcripción o la detención de la traducción o inhibiendo la replicación. Se pueden utilizar asimismo PNA de moléculas de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 en el análisis de mutaciones de pares de bases individuales en un gen, (por ejemplo, el mediante bloqueo de la PCR por PNA); como "enzimas de restricción artificiales" cuando se utilizan junto con otras enzimas, (por ejemplo,

nucleasas S1 (Hyrup and Nielsen (1996) supra)); o como sondas o cebadores para la secuenciación o hibridación del ADN (Hyrup B. and Nielsen (1996) supra; Perry-O'Keefe et al. (1996) supra).

5 En otra forma de realización, se pueden modificar los PNA de B7-4 o PD-1 (por ejemplo, para mejorar su estabilidad o captación celular), uniendo grupos lipófilos u otros grupos auxiliares a los PNA, formando quimeras PNA-ADN, o utilizando liposomas u otras técnicas de administración de fármacos conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden generar quimeras de PNA-ADN de moléculas de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 que pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y ADN. Dichas quimeras permiten que las enzimas de reconocimiento del ADN (por ejemplo, ARNasa H y ADN polimerasas) interactúen con la parte de ADN mientras que la parte de PNA
10 proporcionaría alta afinidad de unión y especificidad. Las quimeras PNA-ADN se pueden ligar utilizando ligadores de longitudes apropiadas seleccionados basándose en apilamiento de bases, número de enlaces entre las bases nitrogenadas y la orientación (Hyrup B. and Nielsen (1996) supra). Se puede realizar la síntesis de quimeras PNA-ADN tal como se describe en Hyrup B. and Nielsen (1996) supra and Finn P. J. et al. (1996) NucleicAcids Res. 24(17):3357-63. Por ejemplo, se puede sintetizar una cadena de ADN sobre un soporte sólido utilizando química de acoplamiento de fosoramidita estándar. Se pueden utilizar análogos de nucleósidos modificados (por ejemplo, 5'-(4-metoxitritil)-amino-5'-desoxitiminafosoramidita) como un enlazadores entre el PNA y el extremo 5' del ADN (Mag, M. et al. (1989) NucleicAcid Res. 17:5973-88). A continuación se acoplan sucesivamente los monómeros de PNA para producir una molécula quimérica con un segmento de PNA 5' y un segmento de ADN 3' (Finn P. J. et al. (1996) supra). Alternativamente, se pueden sintetizar moléculas quiméricas con un segmento de ADN 5' y un segmento de PNA 3' (Peterser, K. H. et al. (1975) BioorganicMed. Chem. Lett. 5:1119-11124).

En otras formas de realización, el oligonucleótido puede comprender otros grupos añadidos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigir los receptores de células hospedadoras *in vivo*), o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. AcadSci. USA 86:6553-6556; Lemaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; PCT publicación n.º WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, PCT publicación n.º WO89/10134). Además, se pueden modificar oligonucleótidos con agentes de escisión activados por la hibridación (véase, por ejemplo, Krol et al. (1988) Biotechniques 6:958-976) o agentes intercalantes. (Véase, por ejemplo, Zon (1988) Pharm. Res. 5:539-549). Para ello, se puede conjugar el oligonucleótido con otra molécula, (por ejemplo, un péptido, un agente de reticulación activado por hibridación, un agente transportador, o un agente de escisión activado por hibridación).

III. Proteínas B7-4 o PD-1 aisladas y anticuerpos anti-B7-4 o PD-1

Además, se pueden utilizar proteínas B7-4 o PD-1 aisladas y regiones biológicamente activas de las mismas, así como anticuerpos anti-B7-4 o PD-1 como agentes de modulación. En una forma de realización, se pueden aislar las proteínas B7-4 o PD-1 a partir de fuentes celulares o tisulares mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas de purificación de proteínas estándar. En una forma de realización adicional, las proteínas B7-4 o PD-1 se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Alternativamente a la expresión recombinante, se puede sintetizar químicamente una proteína o polipéptido de B7-4 o PD-1 utilizando técnicas de síntesis de péptidos estándar.

Un aspecto adicional de la descripción se refiere a las proteínas B7-4 o PD-1 aisladas. Preferentemente las proteínas B7-4 o PD-1 comprenden la secuencia de aminoácidos codificada por las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11. En otra forma de realización preferida, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2, 4 o 12. En unas formas de realización adicionales, la proteína presenta por lo menos un 50 %, por lo menos un 60 % de identidad de aminoácidos, más preferentemente una identidad de aminoácidos del 70 %, más preferentemente del 80 % y todavía más preferentemente un 90 % o un 95 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N.º 2, 4 o 12.

50 En unas formas de realización adicionales, la presente invención proporciona regiones aisladas de una proteína B7-4 o PD-1. Por ejemplo, las proteínas B7-4 comprenden una secuencia de señal, y un dominio IgV y un dominio IgC. La secuencia de señal de la SEC ID N.º 2 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 18. La secuencia de señal de la SEC ID N.º 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 18. El dominio IgV de SEC ID N.º 2 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta aproximadamente el aminoácido 134 y el dominio IgV de la SEC ID N.º 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta aproximadamente el aminoácido 134. El dominio IgC de SEC ID N.º 2 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 135 hasta aproximadamente el aminoácido 227 y el dominio IgV de la SEC ID N.º 4 se muestra desde aproximadamente el aminoácido 135 hasta aproximadamente el aminoácido 227. El ejemplo de cola hidrófila de la molécula B7-4 de la SEC ID N.º 2 comprende una cola hidrófila que se muestra desde aproximadamente el aminoácido 228 hasta aproximadamente el aminoácido 245. El ejemplo de polipéptido B7-4 de la SEC ID N.º 4 comprende un dominio transmembrana que se muestra a partir de aproximadamente el aminoácido 239 hasta aproximadamente el aminoácido 259 de la SEC ID N.º 4 y un se muestra dominio citoplasmático desde aproximadamente el aminoácido 260 hasta aproximadamente el aminoácido 290 de la SEC ID

N.º 4. El polipéptido de PD-1 presenta de 288 aminoácidos de longitud y su estructura de dominio resulta conocida en la técnica (Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704). La forma madura prevista de la proteína contiene aproximadamente 268 aminoácidos y comprende un dominio extracelular (147 aminoácidos), un dominio transmembrana (27 aminoácidos), una región transmembrana (27 aminoácidos) y un dominio citoplasmático (94 aminoácidos). En el dominio extracelular se encuentran cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (patente US n.º 5.698.520). Los aminoácidos 68 entre dos residuos de cisteína (Cys 54 y Cys 123) se parecen a un dominio de inmunoglobulina con enlaces disulfuro de las secuencias V-set (patente US n.º 5.698.520).

La presente invención se refiere además a formas solubles de las proteínas B7-4 o PD-1. Dichas formas pueden ser naturales, por ejemplo, tal como se muestra en la SEC ID N.º 2, u obtenidas por ingeniería genética y pueden comprender, por ejemplo, un dominio extracelular de una proteína B7-4 o PD-1. Los ejemplos de dominios extracelulares de B7-4 comprenden aproximadamente los aminoácidos 19-238 de la SEC ID N.º 4. Los ejemplos de dominios extracelulares de PD-1 comprenden aproximadamente los aminoácidos 21-288 de la SEC ID N.º 12.

En una forma de realización, el dominio extracelular de un polipéptido de B7-4 comprende la forma madura de un polipéptido de B7-4, por ejemplo, los dominios IgV y IgC, pero no los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido B7-4 (por ejemplo, desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta el aminoácido 238 de la SEC ID N.º 4) o desde aproximadamente el aminoácido 19 hasta el aminoácido 245 de la SEC. ID. NO: 2.

En una forma de realización, el dominio extracelular de un polipéptido de PD-1 comprende la forma madura de un polipéptido de PD-1, por ejemplo, los dominios de la superfamilia de la inmunoglobulina (por ejemplo, secuencias V-set), pero no los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido PD-1 (por ejemplo, desde aproximadamente el aminoácido 21 hasta el 288 de la SEC ID N.º 12).

Las regiones biológicamente activas de una proteína B7-4 o PD-1 comprenden péptidos con unas secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a, u obtenidas de, la secuencia de aminoácidos de la proteína B7-4 o PD-1, que comprenden menos aminoácidos que las proteínas B7-4 o PD-1 de longitud completa y presentan por lo menos una actividad de una proteína B7-4 o PD-1, preferentemente la capacidad de unirse a un ligando natural. Normalmente, las regiones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con por lo menos una actividad de la proteína B7-4 o PD-1. Una región biológicamente activa de una proteína B7-4 o PD-1 puede ser un polipéptido que, por ejemplo, presente por lo menos 10, 25, 50, 100, 150, 200 o más aminoácidos de longitud.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, se alinean las secuencias para realizar una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima y se pueden ignorar las secuencias no homólogas para realizar la comparación). En una forma de realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para realizar la comparación es de por lo menos un 30 %, preferentemente por lo menos un 40 %, más preferentemente por lo menos un 50 %, todavía más preferentemente por lo menos un 60 % e incluso más preferentemente por lo menos un 70 %, un 80 % o un 90 % de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación se comparan los aminoácidos de las posiciones correspondientes y cuando una posición de una secuencia se encuentra ocupada por el mismo aminoácido que la posición correspondiente de la otra secuencia, las moléculas son idénticas en dicha posición. Por lo tanto, el porcentaje de identidad entre dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las dos secuencias (es decir, % de identidad = n.º de posiciones idénticas / n.º total de posiciones x 100). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Tal como se utiliza en la presente memoria, la "identidad" de un aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la "homología" de un aminoácido o ácido nucleico.

Se puede realizar la comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias utilizando un algoritmo matemático. En una forma de realización preferida, se determina el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa GAP del paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En una forma de realización preferida adicional, se determina el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa GAP del paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Además, se pueden utilizar las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Se pueden realizar las búsquedas de nucleótidos con BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener

secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 de la presente invención. Se pueden realizar las búsquedas de proteínas con BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de B7-4 o PD-1 de la presente invención. Para obtener alineaciones con huecos para realizar comparaciones, se puede utilizar Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden emplear los parámetros por defecto de los programas correspondientes (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Por ejemplo, se analizaron las secuencias de nucleótidos de la presente invención utilizando la matriz Blastn 1-3 por defecto con penalizaciones por hueco fijadas en: existencia 11 y extensión 1. Por ejemplo, se analizaron las secuencias de aminoácidos de la presente invención utilizando los ajustes siguientes: matriz Blosum 62 con penalizaciones por hueco fijadas en existencia 11 y extensión 1. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

La presente invención proporciona asimismo proteínas quiméricas o de fusión de B7-4 o PD-1. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" de B7-4 o PD-1 comprende un polipéptido de B7-4 o PD-1 unido operativamente a un polipéptido que no pertenece a B7-4 o PD-1. Un "polipéptido de B7-4 o PD-1" se refiere a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido de B7-4 o PD-1, mientras que un "polipéptido que no pertenece a B7-4 o PD-1" se refiere a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga a la proteína de B7-4 o PD-1, por ejemplo, una proteína que es distinta de la proteína de B7-4 o PD-1 y que se obtiene del mismo o de un organismo distinto. En una proteína de fusión de B7-4 o PD-1, el polipéptido de B7-4 o PD-1 puede corresponder a toda o a una parte de una proteína de B7-4 o PD-1. En una forma de realización preferida, una proteína de fusión de B7-4 o PD-1 comprende por lo menos una región biológicamente activa de una proteína de B7-4 o PD-1, por ejemplo, un dominio extracelular de una proteína de B7-4 o PD-1. En la proteína de fusión, el término "unido operativamente" pretende indicar que el polipéptido de B7-4 o PD-1 y el polipéptido que no pertenece a B7-4 o PD-1 se fusionan en trama entre sí. El polipéptido que no pertenece a B7-4 o PD-1 puede fusionarse con el extremo aminoterminal o carboxiterminal del polipéptido de B7-4 o PD-1.

Por ejemplo, en una forma de realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-B7-4 o GST-PD-1 en la que las secuencias de B7-4 o PD-1 se fusionan en el extremo carboxiterminal de las secuencias de GST. En una forma de realización adicional, la proteína de fusión es una proteína de fusión de B7-4 o PD-1-HA en la que se inserta la secuencia de nucleótidos de B7-4 o PD-1 en un vector tal como el vector pCEP4-HA (Herrscher, R. F. et al. (1995) *Genes Dev.* 9:3067-3082) de tal modo que las secuencias de B7-4 o PD-1 se fusionan en trama a una etiqueta de un epítipo de la hemaglutinina de la gripe. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de una proteína recombinante B7-4 o PD-1.

Se puede producir una proteína de fusión B7-4 o PD-1 mediante la expresión recombinante de una secuencia de nucleótidos que codifica un primer péptido que presenta actividad de B74 y una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo péptido que corresponde a una región que altera la solubilidad, afinidad, estabilidad o valencia del primer péptido, por ejemplo, una región constante de inmunoglobulina. Preferentemente, el primer péptido comprende una región del polipéptido B7-4 (por ejemplo, una región de los aminoácidos 1 a 238 o 19 a 238 (tras la escisión de la secuencia señal) de la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 4 que resulta suficiente para modular la coestimulación o la inhibición de los linfocitos activados). En una forma de realización preferida adicional, el primer péptido comprende una región de un polipéptido de PD-1 (por ejemplo, una región de los aminoácidos 1 a 288 (o 21 a 288 tras la escisión del péptido señal) de la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 12 que resulta suficiente para modular la coestimulación o la inhibición de los linfocitos activados). El segundo péptido puede comprender una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio C γ 1 humano o un dominio C γ 4 (por ejemplo, la bisagra, las regiones CH2 y CH3 de la IgC γ 1 humana o la IgC γ 4 humana, véase, por ejemplo, Capon et al. patente US n.º 5.116.964; 5.580.756; 5.844.095 y similares). Una proteína de fusión resultante puede haber alterado la solubilidad, afinidad de unión, estabilidad y/o valencia de B7-4 o PD-1 (es decir, el número de sitios de unión disponibles por molécula) y puede aumentar la eficiencia de purificación de la proteína. Las proteínas y péptidos de fusión producidos mediante técnicas recombinantes pueden secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y un medio que contiene la proteína o péptido. Alternativamente, la proteína o péptido se pueden conservar citoplasmáticamente, cultivar y lisar las células, y aislar la proteína. Un cultivo celular comprende normalmente células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los métodos aptos de cultivo celular resultan muy conocidos en la técnica. Se pueden aislar proteínas y péptidos a partir de medios de cultivo celular, células hospedadoras o ambos utilizando métodos conocidos en la técnica para purificar proteínas y péptidos. Se conocen en la técnica métodos para someter a transfección células hospedadoras y purificar proteínas y péptidos.

Se prefiere en particular que las proteínas de fusión de Ig de B7-4 o PD-1 comprendan la parte del dominio extracelular o un dominio de tipo región variable de una B7-4 o PD-1 humana acoplada a una región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, la región Fc). La región constante de la inmunoglobulina puede comprender modificaciones genéticas que reducen o eliminan la actividad efectora inherente a la estructura de inmunoglobulina. Por ejemplo, el ADN que codifica la región extracelular de un polipéptido B7-4 o PD-1 se puede unir al ADN que

codifica las regiones bisagra CH2 y CH3 de la IgG γ 1 y/o la IgG γ 4 humanas modificadas mediante mutagénesis dirigida, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 97/28267.

Preferentemente, una proteína de fusión B7-4 o PD-1 de la presente invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan entre sí en trama según las técnicas convencionales, por ejemplo utilizando extremos romos o en bisel para la ligación, digestión con enzimas de restricción a fin de proporcionar unos extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según proceda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión no pretendida y ligación enzimática. En otra forma de realización, se puede sintetizar el gen de fusión mediante técnicas convencionales que comprenden sintetizadores de ADN automáticos. Alternativamente, se puede realizar la amplificación por PCR de fragmentos de genes utilizando cebadores de anclaje que originan salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Además, se encuentran disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican una región de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST o una etiqueta de epítipo HA). Se puede clonar un ácido nucleico que codifica la B7-4 o el PD-1 en un vector de expresión tal de modo que la región de fusión se enlace en trama a la proteína B7-4 o PD-1.

En otra forma de realización, la proteína de fusión es una proteína B7-4 o PD-1 que comprende una secuencia señal heteróloga en su extremo aminoterminal. En ciertas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras de mamífero), se puede aumentar la expresión y/o secreción de B7-4 o PD-1 utilizando una secuencia señal heteróloga.

Se pueden incorporar las proteínas de fusión de B7-4 o PD-1 de la presente invención a composiciones farmacéuticas y administrarse a un paciente *in vivo*. La utilización de proteínas de fusión de B7-4 o PD-1 resulta útil terapéuticamente en el tratamiento de trastornos inmunitarios, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias o para inhibir el rechazo de trasplantes. Además, se pueden utilizar las proteínas de fusión de B7-4 o PD-1 de la presente invención como antígenos para producir anticuerpos anti-B7-4 o PD-1 en un paciente, para purificar B7-4 o PD-1 y en ensayos de detección sistemática para identificar moléculas que inhiben la interacción de la B7-4 con un receptor de la B7-4, por ejemplo, PD-1.

Preferentemente, una proteína quimérica o de fusión B7-4 o PD-1 de la presente invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan entre sí en trama según las técnicas convencionales, por ejemplo utilizando extremos romos o en bisel para la ligación, digestión con enzimas de restricción a fin de proporcionar unos extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según proceda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión no pretendida y ligación enzimática. En otra forma de realización, se puede sintetizar el gen de fusión mediante técnicas convencionales que comprenden sintetizadores de ADN automáticos. Alternativamente, se puede realizar la amplificación por PCR de fragmentos de genes utilizando cebadores de anclaje que originan salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Además, se encuentran disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican una región de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Se puede clonar un ácido nucleico que codifica la B7-4 o el PD-1 en un vector de expresión tal de modo que la región de fusión se enlace en trama a la proteína B7-4 o PD-1.

La presente invención se refiere asimismo a variantes de las proteínas B7-4 o PD-1 que funcionan como agonistas (miméticos) de B7-4 o PD-1 o como antagonistas de B7-4 o PD-1. Se pueden generar variantes de las proteínas B7-4 o PD-1 por mutagénesis, por ejemplo, una mutación puntual discreta o el recorte de una proteína B7-4 o PD-1. Un agonista de las proteínas B7-4 o PD-1 puede conservar sustancialmente las mismas, o un subconjunto, actividades biológicas de la forma natural de una proteína B7-4 o PD-1. Un antagonista de una proteína B7-4 o PD-1 puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural de la proteína B7-4 o PD-1, por ejemplo, modulando competitivamente una actividad celular de una proteína B7-4 o PD-1. De este modo, se pueden provocar efectos biológicos específicos mediante el tratamiento con una variante de función limitada. En una forma de realización, el tratamiento de un paciente con una variante que presenta un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína tiene menos efectos secundarios en el paciente con respecto al tratamiento con la forma natural de la proteína B7-4 o PD-1.

En una forma de realización, se pueden identificar variantes de una proteína B7-4 o PD-1 que actúan como agonistas (miméticos) de B7-4 o PD-1 o como antagonistas de B7-4 o PD-1 realizando la detección sistemática de genotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de recorte, de una proteína B7-4 o PD-1 con respecto a la actividad agonista o antagonista de la proteína B7-4 o PD-1. En una forma de realización, una biblioteca heterogénea de variantes de B7-4 o PD-1 se genera por mutagénesis combinatoria en el nivel del ácido nucleico y se codifica mediante una genoteca heterogénea. Se puede producir una genoteca heterogénea de variantes de B7-4

o PD-1, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de tal modo que se puede expresar un conjunto degenerado de secuencias potenciales de B7-4 o PD-1 como polipéptidos individuales o, alternativamente, como conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación en fagos) que contiene el conjunto de secuencias de B7-4 o PD-1 en el mismo. Existen diversos que se pueden utilizar para producir genotecas de variantes potenciales de B7-4 o PD-1 a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Se puede realizar la síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador de ADN automático y el gen sintético se liga a continuación en un vector de expresión apropiado. La utilización de un conjunto degenerado de genes permite proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto pretendido de secuencias potenciales B7-4 o PD-1. En la técnica se conocen métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (véase, por ejemplo, Narang, S. A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev.*; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Además, se pueden utilizar genotecas de fragmentos de una secuencia de codificación de las proteínas B7-4 o PD-1 para generar una población heterogénea de fragmentos de B7-4 o PD-1 para realizar la detección sistemática y la posterior selección de variantes de una proteína B7-4 o PD-1. En una forma de realización, se puede generar una genoteca de fragmentos de secuencia codificante tratando un fragmento de PCR bicatenario de una secuencia codificante de B7-4 o PD-1 con una nucleasa en unas condiciones en las que se producen mellas solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el DNA para formar un DNA bicatenario que puede comprender pares homocodificantes / anticodificantes de distintos productos con mella, eliminando las partes monocatenarias de los dúplex vueltos a formar mediante el tratamiento con nucleasa S1 y ligando la genoteca de fragmentos resultante a un vector de expresión. Mediante este método se puede obtener una genoteca de expresión que codifica fragmentos aminoterminales, carboxiterminales e internos de diversos tamaños de la proteína B7-4 o PD-1.

Se conocen en la técnica diversos métodos para realizar la detección sistemática de productos génicos de genotecas combinatorias realizadas por mutaciones puntuales o recortes, y para la detección sistemática de genotecas de ADNc para productos génicos que presenten una propiedad seleccionada. Se pueden adaptar dichos métodos para realizar una detección sistemática de las genotecas generadas mediante la mutagénesis combinatoria de las proteínas B7-4 o PD-1. Los métodos más utilizados, que son aptos para un análisis de alto rendimiento, para realizar la selección de grandes genotecas comprenden normalmente clonación de la genoteca en vectores de expresión duplicables, la transformación de células apropiadas con la genoteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en unas condiciones en las que la detección de una actividad pretendida facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recursiva (REM), una nueva técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales de las genotecas, se puede utilizar junto con los ensayos de detección sistemática para identificar las variantes de B7-4 o PD-1 (Arkin and Youvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delagrave et al. (1993) *Protein Eng.* 6(3):327-331).

En una forma de realización, se pueden explotar los ensayos basados en células para analizar una genoteca heterogénea de B7-4 o PD-1. Por ejemplo, se puede someter a transfección una genoteca de vectores de expresión en una estirpe celular que sintetiza y secreta normalmente B7-4 o PD-1. A continuación se cultivan las células sometidas a transfección de tal modo que se puedan detectar la B7-4 o el PD-1 y un mutante particular de la B7-4 o el PD-1 secretados y el efecto de la expresión del mutante en la actividad de B7-4 o PD-1 en sobrenadantes de células, por ejemplo, mediante cualquiera de diversos ensayos funcionales. A continuación se puede recuperar el ADN del plásmido a partir de las células que obtienen una cierta puntuación para la inhibición, o, alternativamente, la potenciación de la actividad de B7-4 o PD-1, y continuar caracterizando los clones individuales.

Además de los polipéptidos de B7-4 o PD-1 que consisten únicamente en aminoácidos de origen natural, se proporcionan asimismo miméticos peptídicos de B7-4 o PD-1. Se utilizan normalmente los análogos peptídicos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido plantilla. Dichos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos" (Fauchere, J. (1986) *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber and Freidinger (1985) *TINS* p. 392; y Evans et al. (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229) y normalmente se desarrollan con la ayuda de la modelización molecular informática. Se pueden utilizar miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o preventivo equivalente. Generalmente, los miméticos peptídicos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que presenta actividad biológica o farmacológica), tales como la B7-4 o el PD-1 humanos, pero presentan uno o más de los enlaces peptídicos sustituidos opcionalmente por un enlace seleccionado de entre el grupo constituido por: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, mediante métodos conocidos en la técnica y que se describen más detalladamente en las referencias siguientes: Spatola, A. F. in "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins" Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., *Vega Data* (March 1983), Vol. 1, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications" (revisión general); Morley, J. S. (1980) *Trends Pharm. Sci.* pp. 463-468 (revisión general); Hudson, D. et al. (1979) *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$, CH_2CH_2-); Spatola, A. F. et al. (1986) *Life Sci.* 38:1243-1249 ($-\text{CH}_2\text{S}-$); Hann, M. M. (1982) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 307-314 ($-\text{CH}-\text{CH}-$, cis y trans);

Almquist, R. G. et al. (190) J. Med Chem. 23:1392-1398 (-COCH₂-); Jennings-White, C. et al. (1982) Tetrahedron Lett. 23:2533 (-COCH₂-); Szelke, M. et al. Solicitud europea EP 45665 (1982) CA: 97:39405 (1982)(-CH(OH)CH₂-); Holladay, M. W. et al. (1983) Tetrahedron Lett. (1983) 24:4401-4404 (-C(OH)CH₂-); y Hruby, V. J. (1982) Life (-CH₂-S-). Un enlace no péptido particularmente preferido es -CH₂NH-. Dichos miméticos peptídicos pueden presentar ventajas significativas con respecto a formas de realización de polipéptidos, entre ellas por ejemplo: una producción más económica, mayor estabilidad química, unas propiedades farmacológicas mejoradas (vida media, absorción, potencia, eficacia, etc.), una especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), una capacidad antigénica reducida y otros. El etiquetado de los miméticos peptídicos implica normalmente el enlace covalente de una o más etiquetas, directamente o mediante un espaciador (por ejemplo, un grupo amida), a la(s) posición/ones que no interfiere(n) en el mimético peptídico prevista(s) por los datos de estructura-actividad cuantitativos y/o modelado molecular. Dichas posiciones que no interfieren son generalmente posiciones que no forman contactos directos con la(s) macromolécula(s) a la(s) que el mimético peptídico se une para producir el efecto terapéutico. La variación (por ejemplo, el etiquetado) de los miméticos peptídicos no debe interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica pretendida del péptido mimético.

Se puede utilizar la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de B7-4 o PD-1 con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, se pueden generar péptidos limitados que comprenden una secuencia de aminoácidos de B7-4 o PD-1 o una variación de la secuencia sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo and Gierasch (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:387); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclen el péptido.

Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos de B7-4 o PD-1 identificados en la presente permitirán a los expertos en la materia producir polipéptidos que correspondan a las secuencias peptídicas de B7-4 o PD-1 y variantes de la secuencia de los mismos. Se pueden producir dichos polipéptidos en células hospedadoras procariontas o eucariontas mediante la expresión de polinucleótidos que codifican una secuencia peptídica de B7-4 o PD-1, frecuentemente como parte de un polipéptido mayor. Alternativamente, se pueden sintetizar dichos péptidos mediante métodos químicos. Los métodos de expresión de proteínas heterólogas en hospedadores recombinantes, la síntesis química de polipéptidos y la traducción *in vitro* resultan conocidos en la técnica y se describen asimismo en Maniatis et al.; Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91:501; Chaiken I. M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11: 255; Kaiser et al. (1989) Science 243:187; Merrifield, B. (1986) Science 232:342; Kent, S. B. H. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:957; and Offord, R. E. (1980) Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing).

Los péptidos se pueden producir normalmente mediante síntesis química directa y utilizarlos, por ejemplo, como agonistas o antagonistas en una interacción B7-4/PD-1. Los péptidos se pueden producir como péptidos modificados, con restos no peptídicos unidos mediante enlace covalente a la parte aminoterminal y/o carboxiterminal. En ciertas formas de realización preferidas, tanto el extremo carboxiterminal como el extremo aminoterminal, o ambos, se han modificado químicamente. Las modificaciones más comunes de los grupos amino y carboxilo terminales son la acetilación y la amidación, respectivamente. Las modificaciones aminoterminales tales como la acilación (por ejemplo, la acetilación) o la alquilación (por ejemplo, metilación) y las modificaciones carboxiterminales tales como la amidación, así como otras modificaciones terminales, entre ellas la ciclación, se pueden incorporar a diversas formas de realización de la presente invención. Ciertas modificaciones aminoterminales y/o carboxiterminales y/o extensiones peptídicas a la secuencia núcleo pueden proporcionar propiedades físicas, químicas, bioquímicas y farmacológicas ventajosas, tales como: una estabilidad mejorada, una mayor potencia y/o eficacia, resistencia a las proteasas séricas, propiedades farmacocinéticas pretendidas y otros. Se pueden utilizar péptidos terapéuticamente para tratar enfermedades, por ejemplo, alterando la coestimulación en un paciente.

Una proteína B7-4 o PD-1 aislado, o una región o fragmento de la misma (o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido), se puede utilizar como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a B7-4 o PD-1 utilizando técnicas estándar en la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se puede utilizar una proteína B7-4 o PD-1 de longitud completa o, alternativamente, la presente invención proporciona fragmentos peptídicos antigénicos de B7-4 o PD-1 para utilizar como inmunógenos. El péptido antigénico de B7-4 o PD-1 presenta por lo menos 8 aminoácidos y comprende un epítipo de B7-4 o PD-1 de tal modo que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunitario específico con B7-4 o PD-1. Preferentemente, el péptido antigénico comprende por lo menos 10 aminoácidos, más preferentemente por lo menos 15 aminoácidos, incluso más preferentemente por lo menos 20 aminoácidos y aún más preferentemente por lo menos 30 aminoácidos.

Alternativamente, se puede utilizar como inmunógeno un fragmento de péptido antigénico de un polipéptido B7-4 o PD-1. Un fragmento de péptido antigénico de un polipéptido B7-4 o PD-1 comprende normalmente por lo menos 8 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID N.º 2, 4 o 12 y presenta un epítipo de un

polipéptido B7-4 o PD-1 de tal modo que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunitario con una molécula B7-4 o PD-1. Los epítomos preferidos comprendidos por el péptido antigénico son regiones de B7-4 o PD-1 que se encuentran en la superficie de la proteína, por ejemplo, en regiones hidrófilas. En una forma de realización, un anticuerpo se une sustancialmente específicamente a una molécula B7-4 o PD-1. En otra forma de realización, un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido B7-4 o PD-1.

Preferentemente, el péptido antigénico comprende por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, más preferentemente por lo menos aproximadamente 15 aminoácidos, incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos y aún más preferentemente por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos. Los epítomos preferidos comprendidos por el péptido antigénico son regiones de un polipéptido B7-4 o PD-1 que se encuentran en la superficie de la proteína, por ejemplo, en regiones hidrófilas, y que son únicas para un polipéptido B7-4 o PD-1. En una forma de realización, dichos epítomos pueden ser específicos de proteínas B7-4 o PD-1 de una especie, tales como ratón o un ser humano (es decir, se utiliza como inmunógeno un péptido antigénico que se extiende por una región de un polipéptido B7-4 o PD-1 que no se conserva entre especies; se pueden determinar dichos residuos no conservados utilizando un alineamiento tal como el proporcionado en la presente memoria). Se puede realizar un análisis de la hidrofobicidad estándar de la proteína B7-4 o PD-1 para identificar las regiones hidrófilas.

Se utiliza normalmente inmunógeno de B7-4 o PD-1 para preparar anticuerpos inmunizando un paciente apto, (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. La inmunización de un paciente apto con una preparación inmunógena de B7-4 o PD-1 provoca una respuesta de anticuerpos policlonales anti-B7-4 o PD-1. La preparación puede comprender además un potenciador, tal como potenciador de Freund completo o incompleto, o inmunoestimulador similar. La inmunización de un paciente apto con una preparación inmunógena de B7-4 o PD-1 provoca una respuesta de anticuerpos policlonales anti-B7-4 o PD-1.

En una forma de realización adicional, se pueden administrar vacunas de ácidos nucleicos mediante diversos procedimientos, por ejemplo, por inyección (por ejemplo, intramuscular, intradérmica o la inyección biolística de partículas de oro recubiertas con ADN en la epidermis con una pistola génica que utiliza un acelerador de partículas o gas comprimido para inyectar las partículas en la piel (Haynes et al. 1996. J. Biotechnol. 44:37)). Alternativamente, se pueden administrar vacunas de ácidos nucleicos mediante procedimientos no invasivos. Por ejemplo, se puede dirigir al sistema respiratorio el ADN puro o formulado con lípidos o dirigirse hacia otro lugar, por ejemplo, con parches Peyers para la administración oral de ADN (Schubbert. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:961). Se pueden utilizar microorganismos atenuados para la administración en superficies mucosas. (Sizemore et al. 1995. Science. 270:29)

Se pueden preparar anticuerpos policlonales anti-B7-4 o PD-1 tal como se ha descrito anteriormente inmunizando un paciente apto con un inmunógeno B7-4 o PD-1. Se puede realizar el seguimiento con el tiempo del valor de anticuerpos anti-B7-4 o PD-1 en el paciente inmunizado mediante técnicas estándar, tales como con una prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) utilizando un polipéptido inmovilizados de B7-4 o PD-1. Si se pretende de este modo, las moléculas de anticuerpos dirigidos contra un polipéptido B7-4 o PD-1 se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y se continúan purificándolas mediante técnicas muy conocidas, tales como la cromatografía de la proteína A para obtener la fracción IgG. En el instante apropiado tras la inmunización, por ejemplo, cuando los valores de los anticuerpos anti-B7-4 o PD-1 son más elevados, se pueden obtener células productoras de anticuerpos del paciente y utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridomas descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) (Nature 256:495-497) (véase asimismo Brown et al. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2927-31; and Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75), la técnica más reciente de hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72), la técnica de hibridomas de EBV (Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) o técnicas de triomas. Resulta muy conocida la tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales (véase, en general, Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387-402; Geffer, M. L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36). En pocas palabras, una estirpe celular inmortal (normalmente un mieloma) se fusiona con linfocitos (normalmente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno B7-4 o PD-1, tal como se ha descrito anteriormente, y se examinan los sobrenadantes del cultivo de las células de hibridoma resultantes para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se una a un polipéptido B7-4 o PD-1, preferentemente específicamente.

Se puede aplicar cualquiera de los diversos protocolos muy conocidos utilizados para fusionar linfocitos y estirpes celulares inmortalizadas para generar un anticuerpo monoclonal anti-B7-4 o PD-1 (véase, por ejemplo, Galfre, G. et al. (1977) Nature 266:55052; Geffer et al. (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; Kenneth (1980) *supra*). Además, el experto ordinario en la materia apreciará que existen muchas variaciones de dichos métodos que resultarían también útiles. Normalmente, la estirpe celular inmortal (por ejemplo, una estirpe celular de mieloma) procede de la

misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, se pueden realizar hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunógena de la presente invención con una estirpe celular inmortalizada de ratón. Las estirpes celulares inmortales preferidas son las estirpes celulares de mieloma de ratón que son sensibles a un medio de cultivo que contenga hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Se puede utilizar cualquiera número de estirpes celulares de mieloma como asociada a la fusión según técnicas estándar, por ejemplo, las estirpes de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Dichas estirpes de mieloma están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. Normalmente, las células de mieloma de ratón sensibles al HAT se fusionan con esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol ("PEG"). Se seleccionan a continuación las células de hibridoma obtenidas a partir de la fusión utilizando medio HAT, que mata las células de mieloma sin fusionar y fusionadas improductivamente (los esplenocitos sin fusionar mueren después de varios días ya que no se transforman). Se detectan las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la presente invención realizando la identificación sistemática de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma con respecto a los anticuerpos que se unen a una molécula B7-4 o PD-1, por ejemplo, utilizando una prueba ELISA estándar.

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar un anticuerpo monoclonal anti-B7-4 o PD-1 y aislarlo mediante detección sistemática en una genoteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una genoteca de presentación de fagos de anticuerpos) con una o B7-4 PD-1 para de este modo aislar los miembros de la genoteca de inmunoglobulinas que se unen a un polipéptido B7-4 o PD-1. Los kits para generar y explorar genotecas de presentación de fagos se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, n.º de catálogo 27-9400-01; y el Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit, n.º de catálogo 240612). Además, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente aptos para utilizar en la generación y detección sistemática de genotecas de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, en Ladner et al. patente US n.º 5.223.409; Kang et al. Publicación internacional n.º WO 92/18619; Dower et al. Publicación internacional n.º WO 91/17271; Winter et al. Publicación internacional n.º WO 92/20791; Markland et al. Publicación internacional n.º WO 92/15679; Breitling et al. Publicación internacional n.º WO 93/01288; McCafferty et al. Publicación internacional n.º WO 92/01047; Garrard et al. Publicación internacional n.º WO 92/09690; Ladner et al. Publicación internacional n.º WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Biotechnology* (NY) 9:1369-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Biotechnology* (NY) 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554.

Además, los anticuerpos recombinantes anti-B7-4 o PD-1, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden ambas regiones humanas y no humanas, que se pueden realizar utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, están comprendidos por el alcance de la presente invención. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando los métodos descritos en Robinson et al. Publicación internacional de patente PCT/US86/02269; Akira et al. Solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, M. Solicitud de patente europea 171.496; Morrison et al. Solicitud de patente europea 173.494; Neuberger et al. Solicitud PCT WO 86/01533; Cabilly et al. Patente US n.º 4.816.567; Cabilly et al. Solicitud de patente europea 125.023 ; Better et al. (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:214-218; Nishimura et al. (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi et al.; Winter Patente US n.º 5.225.539 ; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; and Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Además, se pueden realizar anticuerpos humanizados según protocolos estándar tales como los descritos en la patente US n.º 5.565.332. En otra forma de realización, se pueden producir cadenas de anticuerpos o miembros de pares de unión específicos por recombinación entre los vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una fusión de una cadena polipeptídica de un miembro de un par de unión específico y un componente de un paquete de visualización génica duplicable y los vectores que contienen moléculas de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica de un único miembro del par de unión utilizando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en las patentes US n.º 5.565.332, 5.871.907 o 5.733.743. Resulta conocida también la utilización de anticuerpos intracelulares para inhibir la función de la proteína en una célula (véase, por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2638-2646; Biocca, S. et al. (1990) *EMBOJ.* 9:101-108; Werge, T. M. et al. (1990) *FEBS Lett.* 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7427-7428; Marasco, W. A. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893; Biocca, S. et al. (1994) *Biotechnology* (NY) 12:396-399; Chen, S-Y. et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5:595-601; Duan, L et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5075-5079; Chen, S-Y. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5932-5936; Beerli, R. R. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:23931-23936; Beerli, R. R. et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:666-672; Mhashikar, A.

M. et al. (1995) EMBO J. 14:1542-1551; Richardson, J. H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; Publicación PCT n.º WO 94/02610 por Marasco et al. ; y Publicación PCT n.º WO 95/03832 por Duan et al.).

5 En una forma de realización, un anticuerpo para utilizar en la presente invención es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico presenta sitios de unión para dos antígenos distintos dentro de una sola molécula de anticuerpo. El enlace con el antígeno puede ser simultáneo o secuencial. Los triomas y los hibridomas híbridos constituyen dos ejemplos de estirpes celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos producidos por un hibridoma híbrido o un trioma se describen en la patente US n.º 4.474.893. Se han construido anticuerpos biespecíficos por medios químicos (Staerz et al. (1985) Nature 314:628, y Perez et al. (1985) Nature 316:354) y tecnología de hibridomas (Staerz and Bevan (1986) Proc., y Staerz and Bevan (1986) Immunol. Today 7:241). En la patente US n.º 5.959.084 se describen también anticuerpos biespecíficos. En la patente US n.º 5.798.229. se describen fragmentos de anticuerpos biespecíficos.

15 Se pueden generar asimismo agentes biespecíficos realizando heterohibridomas fusionando hibridomas u otras células que forman anticuerpos distintos, seguido por la identificación de clones que producen y uniendo entre sí de ambos anticuerpos. Se pueden generar asimismo mediante conjugación química o genética de cadenas de inmunoglobulina completas o regiones de las mismas tales como las secuencias Fab y Fv. El componente de anticuerpo se puede unir con PD-1 o B7-4.

20 Se puede utilizar un anticuerpo anti-B7-4 o PD-1 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) para aislar un polipéptido B7-4 o PD-1 mediante técnicas estándar, tales como la cromatografía de afinidad o la inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-B7-4 o PD-1 pueden facilitar la purificación de los polipéptidos naturales B7-4 o PD-1 a partir de células y de polipéptidos de B7-4 o PD-1 producidos por recombinación expresados en células hospedadoras. Además, se puede utilizar un anticuerpo un anti-B7-4 o PD-1 para detectar una proteína B7-4 o PD-1 (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular). Se puede facilitar la detección acoplado (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo con una sustancia detectable. Por consiguiente, en una forma de realización, se marca un anticuerpo anti-B7-4 o PD-1 de la presente invención con una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables comprenden diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de sustancias detectables comprenden diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas aptas comprenden peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos aptos comprenden estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes aptos comprenden umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente comprende luminol; y los ejemplos de materiales radiactivos aptos comprenden ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , y ^3H .

35 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a anticuerpos anti-B7-4 o PD-1 que se pueden obtener mediante un procedimiento que comprende:

- 40 (a) inmunizar un animal con un inmunógeno o proteína B7-4 o PD-1, o una región inmunógena de la misma única con respecto a un polipéptido B7-4 o PD-1; y
(b) aislar del animal anticuerpos que se unen específicamente a una proteína B7-4 o PD-1.

45 IV. Vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de la familia de B7-4 o PD-1 (o una región de la misma) pueden estar contenidas en vectores, preferentemente vectores de expresión. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que segmentos se pueden ligar de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Ciertos vectores pueden realizar una reproducción autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamíferos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, de este modo, se reproducen junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de los genes a los que se encuentran unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la presente invención pretende comprender otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus que no se pueden reproducir, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender una molécula de ácido nucleico de la presente invención en una forma apta para la expresión, por ejemplo, la expresión constitutiva o inducible, de una molécula de B7-4 o PD-1 en la(s) célula(s) indicadora(s) del ácido nucleico en un célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes comprenden una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras a utilizar para la expresión, ligada operativamente con la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector de expresión recombinante, "ligada operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está ligada a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de tal modo que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando se introduce el vector en la célula hospedadora). El término "secuencia reguladora" comprende promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7. Las secuencias reguladoras comprenden aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula hospedadora y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células hospedadoras (por ejemplo, las secuencias reguladoras específicas del tejido). Los expertos en la materia podrán apreciar que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se debe transformar, el nivel de expresión pretendido de la proteína y similares. Se pueden introducir los vectores de expresión de la presente invención en células hospedadoras para producir de este modo proteínas o péptidos, entre ellas proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos tal como se describe en la presente memoria (por ejemplo, proteínas de la familia de B7-4 o PD-1, formas mutantes de proteínas de B7-4 o PD-1, proteínas de fusión y similares).

Se pueden diseñar los vectores de expresión recombinantes de la presente invención para que expresen las proteínas B7-4 o PD-1 en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, se pueden expresar las proteínas B7-4 o PD-1 en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamíferos. Las células hospedadoras aptas se describen con mayor detalle en Goeddel (1990) *supra*. Alternativamente, se puede transcribir y traducir *in vitro* el vector de expresión recombinante, utilizando por ejemplo secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariontas se realiza más a menudo en *E. coli* con vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de no fusión. Los vectores de fusión añaden un cierto número de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, habitualmente en el extremo aminoterminal de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión sirven normalmente para tres propósitos: 1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la región de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la región de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento análogas, comprenden el Factor Xa, la trombina y la enteropeptidasa. Los vectores de expresión de fusión habituales comprenden pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de enlace E con la maltosa o la proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante diana.

Se pueden utilizar proteínas de fusión purificadas en ensayos de actividad de B7-4 o PD-1 (por ejemplo, ensayos directos o ensayos competitivos que se describirán en detalle a continuación), o para generar anticuerpos específicos para las proteínas B7-4 o PD-1, por ejemplo.

Ejemplos de vectores de expresión de no fusión inducibles aptos de *E. coli* comprenden pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11d (Studier et al. (1990) *Methods Enzymol.* 185:60-89). La expresión del gen diana del vector pTrc se basa en la transcripción de la ARN polimerasa del hospedador de un promotor de fusión híbrido *trp-lac*. La expresión del gen diana del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión híbrido *trp-lac* de T7 en la que interviene una ARN polimerasa vírica coexpresada (T7 *gn1*). Se proporciona dicha polimerasa vírica mediante las cepas hospedadoras BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) de un profago residente que comprende un gen T7 *gn1* bajo el control de la transcripción del promotor *lacUV 5*.

Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S. (1990) *Methods Enzymol.* 185:119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se debe insertar en un vector de expresión de tal modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Se puede realizar dicha alteración de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención mediante técnicas de síntesis de ADN convencionales.

En otra forma de realización, el vector de expresión de B7-4 o PD-1 es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* comprenden pYepSec1 (Baldari, et al. (1987) EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).

Alternativamente, se puede expresar un polipéptido B7-4 o PD-1 en células de insectos utilizando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insectos cultivadas (por ejemplo, células Sf9) comprenden la serie pAc (Smith et al. (1983) Mol.) y la serie pVL (Lucklow, V. A. and Summers, M. D. (1989) Virology 170:31-39).

En otra forma de realización adicional, un ácido nucleico de la presente invención se expresa en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero comprenden pMex-Neol, pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) and pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Cuando se utilizan en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan a menudo mediante elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores utilizados comúnmente se obtienen a partir de poliomas, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión aptos tanto para células procariotas como eucariotas, véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

En otra forma de realización, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido resultan conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido aptos comprenden el promotor de la albúmina (específico del hígado; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), promotores específicos del sistema linfático (Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), en particular promotores de receptores de linfocitos T (Winoto and Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de los neurofilamentos; Byrne and Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund et al. (1985) Science 230:912-916), y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo, promotor del suero de la leche; patente US n.º 4.873.316 y publicación de solicitud europea n.º 264.166). Quedan comprendidos asimismo los promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo los promotores homeóticos murinos (Kessel and Gruss (1990) Science 249:374-379) y el promotor de la α -fetoproteína (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

Además, los sistemas reguladores inducibles para utilizar en células de mamífero resultan conocidos en la técnica, por ejemplo los sistemas en los que la expresión génica está regulada por iones de metales pesados (véase por ejemplo, Mayo et al. (1982) Cell 29:99-108; Brinster et al. (1982) Nature 296:39-42; Searle et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:1480-1489), choque térmico (véase por ejemplo, Nouer et al. (1991) in Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, FL, p. 167-220), hormonas (véase por ejemplo, Lee et al. (1981) Nature 294:228-232; Hynes et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2038-2042; Klock et al. (1987) Nature 329:734-736; Israel and Kaufman (1989) Nucl. Acids Res. 17:2589-2604; y publicación PCT n.º WO 93/23431), moléculas relacionadas con el FK506 (véase por ejemplo, y publicación PCT n.º WO 94/18317) o tetraciclinas (Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268:1766-1769; y publicación PCT n.º WO 94/29442; and y publicación PCT n.º WO 96/01313). Por consiguiente, en otra forma de realización, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante en el que un ADN B7-4 o PD-1 se une operativamente a un promotor eucariota inducible, permitiendo de este modo la expresión inducible de una proteína B7-4 o PD-1 en células eucariotas.

La divulgación proporciona además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la presente invención clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN se une operativamente a una secuencia reguladora de tal modo que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido con respecto al ARNm de B7-4 o PD-1. Se pueden seleccionar secuencias reguladoras unidas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido de tal modo que dirigen la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en diversos tipos de células, por ejemplo promotores y/o potenciadores víricos, o se pueden seleccionar secuencias reguladoras de tal modo que dirigen una expresión constitutiva, específica del tejido o específica del tipo de célula del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido se puede encontrar en forma de plásmido recombinante, fagómido o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, cuya actividad se puede determinar por el tipo de célula en la que se introduce el vector. Para un análisis sobre la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido véase Weintraub, H. et al. (1986) "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis" Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1).

La presente invención se refiere asimismo a células hospedadoras en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la presente invención. Los términos "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se utilizan indistintamente en la presente memoria. Se debe comprender que dichos términos se refieren no únicamente a la célula particular sino a la descendencia o descendencia potencial de dicha célula. Puesto que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debidas a mutaciones o a factores ambientales, de hecho dicha descendencia puede no ser idéntica a la célula original, pero aun así se encuentran comprendidas dentro del alcance del término tal como se utiliza en la presente memoria.

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, se pueden expresar una proteínas B7-4 o PD-1 en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos, levadura o células de mamíferos (tales como las células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras aptas.

Se puede introducir el ADN del vector en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "transformación" y "transfección" se refieren a diversos procedimientos reconocidos en la técnica para introducir un ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, entre ellos la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección en la que interviene DEAE-dextrano, la lipofección, o la electroporación. Los métodos aptos para someter a transformación o transfección células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio.

Para una transfección estable de células de mamífero, se conoce que, en función del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, únicamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Para identificar y seleccionar estas integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos comprenden aquellos que proporcionan resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Se puede introducir en una célula hospedadora el ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable en el mismo vector que el que codifica una proteína B7-4 o PD-1 o se puede introducir en un vector separado. Se pueden identificar las células sometidas a transfección de un modo estable con el ácido nucleico introducido mediante una selección con fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobreviven, mientras que las otras células mueren).

Se puede utilizar una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, para producir (es decir, expresar) una proteína B7-4 o PD-1. Por consiguiente, la presente invención proporciona además métodos para producir una proteína B7-4 o PD-1 utilizando las células hospedadoras de la presente invención. En una forma de realización, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la presente invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica una proteína B7-4 o PD-1) en un medio apto, de tal modo que se produce una proteína B7-4 o PD-1. En otra forma de realización, el método comprende además aislar una proteína B7-4 o PD-1 del medio o de la célula hospedadora.

Se pueden utilizar asimismo ciertas células hospedadoras para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, en una forma de realización, una célula hospedadora es un ovocito fertilizado o una célula germinal embrionaria en la que se han introducido secuencias codificantes de PD-1 o B7-4. Se pueden utilizar dichas células hospedadoras para crear animales transgénicos no humanos en los que se han introducido secuencias exógenas de B7-4 o PD-1 en su genoma o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado secuencias endógenas de B7-4 o PD-1. Dichos animales resultan útiles para estudiar la función y/o la actividad de un polipéptido de B7-4 o PD-1 y para identificar y/o analizar moduladores de la actividad de B7-4 o PD-1. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal transgénico" es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un roedor tal como una rata o un ratón, en el que una o más de las células del animal comprende un "transgén". Otros ejemplos de animales transgénicos comprenden primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios y similares. Un transgén es un ADN exógeno que se integra en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, dirigiendo de este modo la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del animal transgénico. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "animal recombinante homólogo" es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que se ha alterado un gen endógeno de B7-4 o PD-1 por recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida en una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal, antes del desarrollo del animal.

Se puede crear un animal transgénico introduciendo una molécula de ácido nucleico que codifica B7-4 o PD-1 en el pronúcleo macho de un ovocito fertilizado, por ejemplo, mediante microinyección, infección retroviral, y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal adoptivo hembra en pseudogestación. Se puede introducir la secuencia del ADNc de B7-4 o PD-1 de la SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 como transgén en el genoma de un animal no humano.

Alternativamente, se puede utilizar como transgén un homólogo no humano de un gen humano de B7-4 o PD-1, tal como un gen B7-4 o PD-1 de ratón o de rata. Alternativamente, se puede aislar y utilizar como transgén un gen homólogo B7-4 o PD-1, tal como otro miembro de la familia de B7-4 o PD-1, basándose en la hibridación con las secuencias de ADNc de la familia de B7-4 o PD-1 de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 (que se describen más detalladamente en el apartado I anterior). Se pueden incorporar asimismo al transgén secuencias de intrones y las señales de poliadenilación para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Se puede(n) ligar operativamente a un transgén de B7-4 o PD-1 secuencia(s) reguladora(s) específica(s) del tejido para dirigir la expresión de una proteína B7-4 o PD-1 a unas células particulares. Los métodos para generar animales transgénicos mediante la manipulación de embriones y microinyección, en particular animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes US n.º 4.736.866 y 4.870.009, ambas a nombre de Leder et al., la patente US n.º 4.873.191 a nombre de Wagner et al. y en Hogan, B. *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Se utilizan unos métodos similares en la producción de otros animales transgénicos. Se puede identificar un animal transgénico basándose en la presencia de un transgén B7-4 o PD-1 en su genoma y/o en la expresión del ARNm de B7-4 o PD-1 en tejidos o células de los animales. A continuación se puede utilizar un animal transgénico para criar animales adicionales que presenten el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan un transgén que codifica una proteína B7-4 o PD-1, se pueden continuar criando para obtener otros animales transgénicos que llevan presenten otros transgenes.

Para crear un animal recombinante homólogo, se prepara un vector que contiene por lo menos una región de un gen de B7-4 o PD-1 en la que se ha introducido una delección, adición o sustitución para alterar de este modo, por ejemplo, interrumpir funcionalmente, el gen B7-4 o PD-1. El gen B7-4 o PD-1 puede ser un gen humano (por ejemplo, las SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11) pero, más preferentemente, es un homólogo no humano de un gen humano de B7-4 o PD-1 (por ejemplo, un ADNc aislado mediante una hibridación estricta con la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11). Por ejemplo, se pueden utilizar un gen de ratón de B7-4 o PD-1 para construir un vector de recombinación homóloga apto a fin de alterar un gen endógeno de B7-4 o PD-1 del genoma del ratón. En una forma de realización preferida, el vector se diseña de tal modo que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno de B7-4 o PD-1 se interrumpe funcionalmente (es decir, ya no codifica una proteína funcional; también se hace referencia al mismo como un vector "inactivado"). Alternativamente, se puede diseñar el vector de tal modo que, tras la recombinación homóloga, el gen endógeno de B7-4 o PD-1 esté mutado o alterado de algún otro modo pero codifique todavía una proteína funcional (por ejemplo, la región reguladora en dirección 5' se puede alterar para modificar de este modo la expresión de la proteína endógena B7-4 o PD-1). En el vector de recombinación homóloga, la porción alterada del gen B7-4 o PD-1 se encuentra flanqueada en sus extremos 5' y 3' por una secuencia de ácido nucleico adicional del gen B7-4 o PD-1 para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen exógeno de B7-4 o PD-1 transportado por el vector y un gen endógeno de B7-4 o PD-1 en una célula germinal embrionaria. La secuencia de ácido nucleico flanqueadora adicional de B7-4 o PD-1 presenta longitud suficiente para la recombinación homóloga satisfactoria con el gen endógeno. Normalmente, se encuentran varias kilobases de ADN flanqueador (tanto en el extremo 5' como en el 3') en el vector (véase, por ejemplo, Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503 para una descripción de vectores de recombinación homólogos). El vector se introduce en una estirpe de células germinales embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan células en las que el gen introducido de B7-4 o PD-1 se ha recombinado homológamente con el gen endógeno de B7-4 o PD-1 (véase, por ejemplo, Li, E. et al. (1992) *Cell* 69:915). Se inyectan las células seleccionadas en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón) para formar quimeras de agregación (véase, por ejemplo, Bradley, A. in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, E. J., ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). A continuación se puede implantar un embrión quimérico en un animal adoptivo hembra en pseudogestación apto y el embrión nace a término. Se puede utilizar la progenie que presenta el ADN recombinado homológamente en sus células germinales para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado homológamente por transmisión de la estirpe germinal del transgén. Los métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos se describen más detalladamente en Bradley, A. (1991) *Curr. Opin. Biotechnol.* 2:823-829 y en las publicaciones internacionales PCT n.º: WO 90/11354 a nombre de Le Mouellec et al.; WO 91/01140 a nombre de Smithies et al.; WO 92/0968 a nombre de Zijlstra et al; y WO 93/04169 a nombre de Berns et al.

Además de lo anterior, los expertos en la materia apreciarán que se pueden aplicar otros métodos conocidos en la técnica para realizar la recombinación homóloga según la presente invención. Se conocen en la técnica sistemas de integración específica del sitio asistidos por enzimas y se pueden aplicar para integrar una molécula de ADN en una ubicación predeterminada en una segunda molécula de ADN diana. Los ejemplos de dichos sistemas de integración asistida por enzimas comprenden el sistema dirigido de recombinasa Cre-lox (por ejemplo, tal como se describe en Baubonis, W. and Sauer, B. (1993) *Nucl. Acids Res.* 21:2025-2029; y Fukushige, S. and Sauer, B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7905-7909) y en el sistema dirigido de recombinasa FLP-FRT (por ejemplo, tal como se describe en Dang, D. T. and Perrimon, N. (1992) *Dev. Genet.* 13:367-375; y Fiering, S. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8469-8473). Se pueden utilizar asimismo sistemas de recombinación homóloga inducibles regulados mediante tetraciclina, tales como los descritos en la publicación PCT n.º WO 94/29442 y la publicación PCT n.º WO 96/01313.

Por ejemplo, en otra forma de realización, se pueden producir animales transgénicos no humanos que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de dicho sistema es el sistema de recombinasa *cre/loxP* del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema de recombinasa *cre/loxP*, véase, por ejemplo, Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al. (1991) Science 251:1351-1355. Si se utiliza un sistema de recombinasa *cre/loxP* para regular la expresión del transgén, se requieren animales que contengan transgenes que codifiquen tanto la recombinasa Cre como una proteína seleccionada. Se pueden obtener dichos animales mediante la construcción de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, apareando dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que codifica una proteína seleccionada y el otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa.

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos en la presente memoria también se pueden producir según los métodos descritos en Wilmut, I. et al. (1997) Nature 385:810-813 y en las publicaciones internacionales PCT n.º WO 97/07668 y WO 97/07669. En pocas palabras, se puede aislar una célula, por ejemplo, una célula somática, del animal transgénico y provocar que salga del ciclo de crecimiento y entre en la fase G₀. A continuación se puede fusionar la célula inactiva, por ejemplo, utilizando impulsos eléctricos, con un ovocito enucleado de un animal de la misma especie de la que se aísla la célula inactiva. A continuación se cultiva el ovocito reconstruido de tal modo que se desarrolla a mórula o blastocisto y tras ello se transfiere a un animal adoptivo hembra en pseudogestación. La descendencia nacida de dicho animal adoptivo hembra será un clon del animal del que se aisló la célula, por ejemplo, la célula somática.

V. Composiciones farmacéuticas

Los moduladores de B7-4 o PD-1 (por ejemplo, inhibidores o estimuladores de B7-4 o PD-1, entre ellos las moléculas de ácidos nucleicos, las proteínas, los anticuerpos de B7-4 o PD-1 descritos anteriormente, o compuestos identificados como moduladores de la actividad y/o la expresión de B7-4 o PD-1 o moduladores de la interacción entre B7-4 y PD-1) se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas aptas para administrar. Dichas composiciones comprenden normalmente la molécula de ácido nucleico, proteína o anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende comprender cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibacterianos y antifúngicos, isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Resulta muy conocida en la técnica la utilización de dichos medios y sustancias como principios farmacéuticamente activos. Excepto en la medida en que cualquier medio o sustancia convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su utilización en las composiciones. Se pueden incorporar asimismo en las composiciones principios activos complementarios.

Una composición farmacéutica de la presente invención se formula para que sea compatible con la vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración comprenden la parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden comprender los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyecciones, disolución salina, aceites fijos, macrogoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; quelantes tales como el ácido edético; disoluciones amortiguadoras del pH tales como acetatos, citratos o fosfatos y sustancias para ajustar la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis realizados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas aptas para uso inyectable comprenden disoluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para realizar soluciones o dispersiones inyectables estériles sin preparación. En el caso de la administración intravenosa, los vehículos aptos comprenden una disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o disolución salina amortiguadora de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que se pueda inyectar con facilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar ante la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y macrogol líquido, y similares), y mezclas aptas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, utilizando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y utilizando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede realizar mediante diversos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, se prefiere incorporar en la composición isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico. Se puede provocar la absorción prolongada de las

composiciones inyectables incorporando en la composición un retardante de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando el principio activo (por ejemplo, una proteína B7-4 o PD-1 o anticuerpo anti-B7-4 o PD-1) en la cantidad requerida en un disolvente apto con uno o una combinación de los ingredientes indicados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los indicados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional pretendido de una solución estéril filtrada previamente del mismo.

15 Las composiciones orales comprenden generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. En el caso de la administración terapéutica oral, el principio activo se puede incorporar con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales se pueden preparar asimismo utilizando un vehículo fluido para su utilización como un enjuague bucal, y el principio en el vehículo fluido se aplica por vía oral, y se agita y se expulsa o se traga. Se pueden incorporar aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o aditivos como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden comprender cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como la celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

25 En el caso de la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de pulverización por aerosol desde el envase o dispensador presurizado que contiene un propelente apto, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

30 La administración sistémica se puede realizar también por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes aptos para la barrera que se debe atravesar. Dichos penetrantes resultan generalmente conocidos en la técnica y comprenden, por ejemplo, en el caso de la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Se puede realizar la administración transmucosa utilizando pulverizadores nasales o supositorios. En el caso de la administración transdérmica, los principios activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas, tal como es de conocimiento general en la técnica.

40 Los compuestos se pueden preparar asimismo en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales de supositorios tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

45 En una forma de realización, se preparan sustancias moduladoras con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, entre ellos implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales se pueden obtener asimismo comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Se pueden utilizar asimismo suspensiones liposómicas (entre ellas los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la patente US n.º 4.522.811.

55 Resulta especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma dosis unitaria para facilitar su administración y uniformidad de dosificación. La formulación en dosis unitaria tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas aptas como dosificaciones unitarias para el paciente que se debe tratar; cada unidad comprende una cantidad predeterminada del principio activo calculada para producir el efecto terapéutico pretendido junto con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las dosis unitarias de la presente invención viene estipulada por, y depende directamente de, las características únicas del principio activo y el efecto terapéutico particular que se pretende conseguir, y las limitaciones inherentes a la técnica para preparar dicho principio activo para el tratamiento de los pacientes.

60 Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales para determinar, por ejemplo, la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La

proporción de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren los compuestos que presentan unos índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden utilizar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado a fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Se pueden utilizar los datos obtenidos de los ensayos en cultivos celulares y los estudios realizados con animales para formular un intervalo de dosificación de uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que comprenden la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo en función de la forma farmacéutica y la vía de administración utilizadas. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la presente invención, se puede estimar inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos en cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos con animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante en plasma que comprenda la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que alcanza una inhibición media máxima de los síntomas) según se determina en los cultivos celulares. Se puede utilizar dicha información para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden incorporar en vectores y utilizarse como vectores de genoterapia. Se pueden administrar vectores de genoterapia a un paciente mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la patente US 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de genoterapia puede comprender el vector de genoterapia en un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que esté incorporado el vehículo de inserción de genes. Alternativamente, cuando el vector de inserción de genes completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células que producen el sistema de inserción de genes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden disponer en un envase, paquete o dispensador junto con las instrucciones para su administración.

VI. Usos y procedimientos de la presente invención

Las sustancias moduladoras de B7-4 y/o PD-1, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico, proteínas, homólogos de proteínas y anticuerpos descritos en la presente memoria, se pueden utilizar en uno o más de los siguientes métodos: a) métodos de tratamiento, por ejemplo, mediante la modulación por aumento o por disminución de la respuesta inmunitaria; b) ensayos de detección sistemática; c) medicina predictiva (por ejemplo, ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, seguimiento de ensayos clínicos y farmacogenética). Se pueden utilizar moléculas aisladas de ácido nucleico, por ejemplo, para expresar las proteínas B7-4 o PD-1 (por ejemplo, mediante un vector de expresión recombinante en una célula hospedadora en aplicaciones de genoterapia), para detectar el ARNm B7-4 o PD-1 (por ejemplo, en una muestra biológica) o una alteración genética en un gen B7-4 o PD-1, y para modular la actividad de B7-4 o PD-1, tal como se describirá posteriormente. Se pueden utilizar las proteínas B7-4 o PD-1 para tratar trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de los inhibidores de B7-4 o PD-1. Además, se pueden utilizar las proteínas B7-4 o PD-1 para la detección de ligandos naturales de B7-4 o PD-1, para seleccionar fármacos o compuestos que modulan la actividad de B7-4 o PD-1, así como para el tratamiento de trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de las proteínas B7-4 o PD-1 o una producción de las formas de proteína de B7-4 o PD-1 que ha disminuido o actividad anómala en comparación con las proteínas B7-4 o PD-1 naturales. Además, se pueden utilizar los anticuerpos anti-B7-4 o PD-1 de la presente invención para detectar y aislar las proteínas B7-4 o PD-1, regular la biodisponibilidad de las proteínas B7-4 o PD-1, y modular la actividad de B7-4 o PD-1, por ejemplo, mediante la modulación de la interacción de B7-4 y PD-1.

A. Métodos de tratamiento:

La presente invención proporciona métodos tanto preventivos como terapéuticos de tratamiento de un paciente con riesgo (o susceptible) de padecer un trastorno o que presenta un trastorno relacionado con una expresión o actividad anómala de la B7-4 o del PD-1.

1. Métodos preventivos

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir en un paciente, una enfermedad o trastorno relacionado con una expresión o actividad anómala de la B7-4 o del PD-1, administrando al paciente un polipéptido B7-4 o PD-1 o una sustancia que module la expresión del polipéptido B7-4 o PD-1 o por lo menos una actividad de B7-4 o PD-1. Se pueden identificar los pacientes con riesgo de padecer una enfermedad provocada por,

o que contribuye en la misma, una expresión o actividad anómala de B7-4 o PD-1 mediante, por ejemplo, cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico tal como se describen en la presente memoria. Se puede realizar la administración de una sustancia preventiva antes de que se manifiesten de los síntomas característicos de una anomalía en la B7-4 o el PD-1, de tal modo que se evita una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrasa su evolución. En función del tipo de anomalía o trastorno en la B7-4 o el PD-1, se puede utilizar, por ejemplo, un polipéptido B7-4 o PD-1, un agonista de B7-4 o PD-1, o un antagonista de B7-4 o PD-1 para tratar el problema. Se puede determinar la sustancia apropiada basándose en las indicaciones clínicas y se puede identificar, por ejemplo, utilizando los ensayos de identificación sistemática descritos en la presente memoria.

10 2.Métodos terapéuticos

Un aspecto adicional de la presente memoria se refiere a métodos de modulación de la expresión o actividad de la B7-4 o del PD-1 con fines terapéuticos. Se ha demostrado que la B7-4 inhibe la coestimulación y multiplicación de inmunocitos activados y que transmite una señal inhibidora a los inmunocitos mediante el PD-1. Por consiguiente, se pueden modular la actividad y/o la expresión de B7-4 o PD-1, así como la interacción entre B7-4 y PD-1 a fin de modular la respuesta inmunitaria. Se debe comprender que, en las formas de realización en las que B7-4 se une a un receptor coestimulador, la regulación por aumento la actividad de B7-4 provoca la regulación por aumento de respuestas inmunitarias, mientras que la regulación por disminución de la actividad de B7-4 provoca la regulación por disminución de la respuesta inmunitaria. En las formas de realización en las que B7-4 se une a los receptores inhibidores, la regulación por aumento de la actividad B7-4 provoca la regulación por disminución de la respuesta inmunitaria, mientras que la regulación por disminución de la actividad de B7-4 provoca la regulación por aumento de la respuesta inmunitaria. En una forma de realización preferida, la B7-4 se une a los receptores inhibidores. En una forma de realización particularmente preferida, la B7-4 se une al PD-1.

25 Los métodos de modulación de la presente invención implican poner en contacto una célula con un modulador de una B7-4 o un polipéptido PD-1, por ejemplo, una sustancia que modula la expresión o la actividad de B7-4 y/o PD-1, o una sustancia que modula la interacción de B7-4 y PD-1.

30 Una sustancia que modula la actividad de la proteína B7-4 o PD-1 es una sustancia tal como se describe en la presente memoria, tal como un ácido nucleico o una molécula de proteína, una molécula diana natural de una proteína B7-4 o PD-1 (por ejemplo, PD-1 en el caso de B7-4 o B7-4 en el caso de PD-1), un anticuerpo contra B7-4 o PD-1, un agonista o antagonista de B7-4 o PD-1, un mimético peptídico de un agonista o antagonista de B7-4 o PD-1, u otra molécula pequeña.

35 Una sustancia que modula la expresión de B7-4 o PD-1 es, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antisentido de, un oligonucleótido tríplex, o una ribozima o un vector recombinante para la expresión de una proteína B7-4 o PD-1. Por ejemplo, se puede sintetizar un oligonucleótido complementario al área alrededor de un sitio de iniciación de la traducción del polipéptido B7-4 o PD-1. Se pueden añadir uno o más oligonucleótidos antisentido a los medios celulares, normalmente a 200 µg/ml, o administrarlos a un paciente para evitar la síntesis de un polipéptido B7-4 o PD-1. Las células captan el oligonucleótido antisentido y se hibrida a un ARNm de B7-4 o PD-1 para prevenir la traducción. Alternativamente, se puede utilizar un oligonucleótido que se une al ADN bicatenario para formar un constructo tríplex para evitar que se desenrolle el ADN y la transcripción. Como resultado de cualquiera de los dos, se bloquea la síntesis de un polipéptido B7-4 o PD-1. Cuando se modula la expresión de PD-1, preferentemente, dicha modulación se produce con un medio que no sea la inactivación del gen de PD-1.

45 Las sustancias que modulan la expresión, debido a que controlan la cantidad de PD-1 o B7-4 en una célula, modulan asimismo la cantidad total de PD-1 o la actividad de B7-4 en una célula.

50 En una forma de realización, una sustancia que estimula un inhibidor o la actividad de B7-4 o una actividad inhibidora de PD-1 es un agonista de B7-4 o PD-1. Los ejemplos de dichas sustancias comprenden una proteína que activa B7-4 o PD-1 y una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de B7-4 o PD-1 que se ha introducido en la célula.

55 En una forma de realización adicional, la sustancia inhibe la actividad coestimuladora o inhibidora de B7-4 o la actividad inhibidora de PD-1 y es un antagonista de B7-4 o PD-1. Los ejemplos de dichas sustancias comprenden moléculas de ácido nucleico antisentido de B7-4 o PD-1, anticuerpos anti-B7-4 o PD-1, formas solubles no activadoras de moléculas B7-4 o PD-1, e inhibidores de B7-4 o PD-1.

60 Dichas sustancias moduladoras se pueden administrar *in vitro* (por ejemplo, poniendo en contacto la célula con la sustancia) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrando la sustancia a un paciente). De por sí, la presente invención proporciona unos métodos de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la modulación de una proteína B7-4 o PD-1, por ejemplo, un trastorno que se beneficiaría de una modulación por aumento o disminución de la respuesta inmunitaria, o que se caracteriza por la expresión o la

actividad anómala de una proteína o molécula de ácido nucleico de B7-4 o PD-1. En una forma de realización, el método implica administrar una sustancia (por ejemplo, una sustancia identificada mediante un ensayo de identificación sistemática descrito en la presente memoria), o una combinación de sustancias que modula (por ejemplo, regula por aumento o por disminución) la expresión o actividad de B7-4 o PD-1. En una forma de realización adicional, el método implica administrar una proteína o molécula de ácido nucleico de B7-4 o PD-1 como tratamiento para compensar la expresión o actividad reducida o anómala de B7-4 o PD-1.

Se pretende la estimulación de la actividad de B7-4 o PD-1 en situaciones en las que se regulan por disminución anormalmente B7-4 o PD-1 y/o en los que la actividad aumentada de B7-4 o PD-1 es probable que tenga un efecto beneficioso. Del mismo modo, se pretende la inhibición de la actividad de B7-4 o PD-1 en situaciones en las que se regulan por aumento anormalmente B7-4 o PD-1 y/o en los que la disminución de la actividad de B7-4 o PD-1 es probable que tenga un efecto beneficioso. Los expertos en la materia deberían reconocer que en las formas de realización en las B7-4 se une a un coestimulador, la estimulación de B7-4 y la estimulación de PD-1 tienen efectos opuestos en la coestimulación de los inmunocitos y, por lo tanto, en la respuesta inmunitaria. En tal caso, cuando se pretende estimular la actividad de una molécula, se pretende reducir la actividad de la otra molécula.

Los ejemplos de sustancias para utilizar en la modulación por disminución de la B7-4 (antagonistas de B7-4) comprenden (por ejemplo): moléculas antisentido, anticuerpos que reconocen B7-4, compuestos que bloquean la interacción entre B7-4 y uno de sus receptores naturales en un inmunocito (por ejemplo, moléculas solubles monovalentes de B7-4 y formas solubles de ligandos de B7-4 o compuestos identificados en los ensayos de identificación sistemática en el paciente). Los ejemplos de sustancias para utilizar en la modulación por disminución del PD-1 (antagonistas de PD-1) comprenden (por ejemplo): moléculas antisentido, anticuerpos que se unen a PD-1, pero no transducen una señal inhibitoria al inmunocito ("anticuerpos no activadores") y las formas solubles de PD-1.

Los ejemplos de sustancias para utilizar en la modulación por aumento de B7-4 (agonistas de B7-4) comprenden (por ejemplo): moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos B7-4, formas multivalentes de B7-4, compuestos que aumentan la expresión de B7-4 y las células que expresan B7-4, etc. Los ejemplos de sustancias para utilizar en la modulación por aumento de PD-1 (agonistas de PD-1) comprenden (por ejemplo): anticuerpos que transmiten una señal inhibitoria mediante el PD-1, compuestos que mejoran la expresión de PD-1, moléculas de ácido nucleico que codifican PD-1 y formas de B7-4 que transducen una señal mediante el PD-1.

3.Regulación por disminución de la respuesta inmunitaria mediante la modulación de B7-4 o PD-1

Existen numerosas formas de realización de la presente invención para regular por aumento de la función inhibitoria o regular por disminución la función coestimuladora de un polipéptido B7-4 para, de este modo, regular por disminución la respuesta inmunitaria. La regulación por disminución se puede producir en forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria ya en progreso o puede implicar la prevención de la inducción de una respuesta inmunitaria.

Se pueden inhibir las funciones de los inmunocitos activados regulando por disminución las respuestas de los inmunocitos o produciendo anergia específica en los inmunocitos, o de ambos modos.

Por ejemplo, se puede utilizar los anticuerpos anti-B7-4 o polipéptidos de B7-4 (por ejemplo, las formas solubles monoméricas de un polipéptido B7-4 tal como B7-4-Ig), y/o anticuerpos anti-B7-4 que bloquean la interacción de la B7-4 con un receptor coestimulador para inhibir una señal coestimuladora y, por lo tanto, modular por disminución la respuesta inmunitaria.

Además, en las formas de realización en las que la B7-4 se une a un receptor inhibitor, se pueden utilizar formas de B7-4 que se unen al receptor inhibitor, por ejemplo, una B7-4 multivalente en una superficie celular, para modular por disminución la respuesta inmunitaria.

Del mismo modo, se puede estimular asimismo la vía de PD-1 utilizando una sustancia para, de este modo, modular por disminución la respuesta inmunitaria. La inhibición de la interacción de B7-4 con un receptor estimulador en un inmunocito (por ejemplo, utilizando una forma soluble de PD-1 y/o CTLA4) o la activación del PD-1 (por ejemplo, utilizando un anticuerpo de activación que reticule el PD-1) puede proporcionar señales negativas a los inmunocitos.

En una forma de realización, un anticuerpo de activación utilizado para estimular la actividad de PD-1 es un anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, un anticuerpo de este tipo puede comprender un sitio de unión de PD-1 y otro sitio de unión que se dirige a un receptor de la superficie celular de un inmunocito, por ejemplo, de un linfocito T, un linfocito B o un mielocito. En una forma de realización, dicho anticuerpo, además de comprender un sitio de unión de PD-1 puede comprender además un sitio de unión que se una a una molécula que se encuentre en la proximidad de un receptor activador o inhibitor, por ejemplo, un receptor antigénico de linfocitos B, un receptor antigénico de linfocitos T o un receptor Fc para dirigir la molécula hacia una población celular específica. Por ejemplo, se podría

5 utilizar un antígeno CD3, una cadena receptora de linfocitos T, LFA-1, CD2, CTLA-4, inmunoglobulina, receptores de linfocitos B, Ig α , Ig β , CD22 o un receptor Fc. Dichos anticuerpos (u otras sustancias biespecíficas) son reconocidos en la técnica y se pueden producir, por ejemplo, tal como se describe en la presente memoria. La selección de dicho segundo antígeno para el anticuerpo biespecífico proporciona flexibilidad en la selección de la población celular a la que se debe dirigir la inhibición.

10 En otra forma de realización, la coligación del PD-1 y un activador o inhibidor del receptor en una célula pueden mejorar la generación de una señal negativa mediante el PD-1. Se puede alcanzar dicha coligación, por ejemplo, utilizando una sustancia biespecífica, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico tal como se describe en la presente memoria, que presente especificidad tanto hacia el PD-1 como hacia una molécula asociada a un receptor. En una forma de realización adicional, la utilización de una forma multivalente de una sustancia que transmite una señal negativa mediante el PD-1 se puede utilizar para mejorar la transmisión de una señal negativa mediante el PD-1, por ejemplo, una sustancia presente en una perla o en una superficie. En forma de realización adicional, dicha sustancia multivalente puede comprender dos especificidades para alcanzar la coligación del PD-1 y un receptor o una molécula asociada al receptor (por ejemplo, una perla que comprenda anti-CD3 y B7-4).

15 Las sustancias que bloquean o inhiben la interacción de B7-4 con un receptor coestimulador (por ejemplo, formas solubles de B7-4 o anticuerpos bloqueadores de B7-4), así como sustancias que activan una señal inhibidora en la que interviene B7-4 o agonistas del PD-1 que activan el PD-1 (por ejemplo, anticuerpos activadores del PD-1 o moléculas pequeñas activadoras del PD-1) se pueden identificar por su capacidad para inhibir la multiplicación de los inmunocitos y/o la función efectora o para provocar anergia cuando se añaden a un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, pueden cultivarse las células en presencia de una sustancia que estimule la transducción de señales mediante un receptor de activación. Diversas publicaciones reconocen que se puede utilizar la activación de células para medir, por ejemplo, la multiplicación celular o la función efectora (por ejemplo, producción de anticuerpos, producción de citocinas, fagocitosis) en presencia de la sustancia activadora. Se puede determinar fácilmente la capacidad de una sustancia de ensayo para bloquear dicha activación mediante la medición de la capacidad de la sustancia para provocar la disminución de la multiplicación o la función efectora se está midiendo.

20 En una forma de realización de la presente invención, se provoca tolerancia contra antígenos específicos mediante la administración conjunta de un antígeno con un agonista del PD-1. Por ejemplo, se puede provocar tolerancia a proteínas específicas. En una forma de realización, se puede inhibir la respuesta inmunitaria a alérgenos o proteínas extrañas para los que no se pretende una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los pacientes que reciben Factor VIII con frecuencia generan anticuerpos contra dicho factor de la coagulación. La administración conjunta de una sustancia que bloquea una señal coestimuladora en la que interviene la B7-4 o una sustancia que estimula una señal inhibidora en la que interviene el PD-1 junto con el factor VIII recombinante (o físicamente ligada al Factor VIII, por ejemplo, por reticulación) puede provocar la modulación por disminución.

25 En una forma de realización, se pueden utilizar las proteínas de fusión que comprenden un primer péptido B7-4 fusionado a un segundo péptido que presenta la actividad de otro antígeno de linfocitos B (por ejemplo, B7-1 o B7-2), para bloquear la interacción de B7-4 con un receptor coestimulador en un inmunocito para modular por disminución las respuestas inmunitarias. Alternativamente, dos péptidos separados (por ejemplo, un polipéptido B7-4 con B7-2 y/o B7-1) o una combinación de anticuerpos bloqueadores (por ejemplo, anticuerpos contra un polipéptido B7-4 con anti-B7-2 y/o anticuerpos monoclonales anti-B7-1) se pueden combinar en una composición única o administrarse por separado (simultánea o secuencialmente) para regular por disminución las respuestas inmunitarias en las que intervienen inmunocitos en un paciente. Además, se puede utilizar una cantidad terapéuticamente activa de uno o más péptidos que presentan actividad del polipéptido B7-4, con actividad de B7-1 y/o B7-1 junto con otros reactivos de modulación por disminución para influir en las respuestas inmunitarias. Los ejemplos de otros reactivos inmunomoduladores comprenden anticuerpos que bloquean una señal coestimuladora (por ejemplo, contra CD28, ICOS), anticuerpos que activan una señal inhibidora mediante CTLA4 y/o anticuerpos contra otros marcadores de inmunocitos (por ejemplo, contra CD40, contra el ligando de CD40 o contra citocinas), proteínas de fusión (por ejemplo, CTLA4-Fc, PD-1-Fc) y fármacos inmunodepresores, (por ejemplo, rapamicina, ciclosporina A o FK506).

30 Los péptidos B7-4 y/o PD-1 también pueden resultar útiles en la construcción de fármacos que bloqueen la función del inmunocito mediante la destrucción celular. Por ejemplo, se pueden unir regiones de un polipéptido B7-4 o PD-1 a una toxina para que una sustancia citotóxica pueda provocar la destrucción de las células a las que se une.

35 Para realizar sustancias citotóxicas, los polipéptidos de la presente invención pueden estar unidos, u operativamente unidos, a las toxinas utilizando técnicas que resultan conocidas en la técnica, por ejemplo, reticulación o mediante técnicas de ADN recombinante. La preparación de inmunotoxinas es, en general, muy conocida en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes US n.º 4.340.535 y EP 44167). Se conoce que se pueden utilizar satisfactoriamente muchos tipos de ligadores que contienen enlaces disulfuro para conjugar la fracción de toxina con un polipéptido. En una forma de realización, se prefieren ligadores que contengan un enlace disulfuro que esté "trabado"

estéricamente, debido a su mayor estabilidad *in vivo*, evitando de este modo la liberación de la parte de la toxina antes de la unión con el sitio de acción.

Se conocen diversas toxinas que se pueden conjugar con los polipéptidos o anticuerpos de la presente invención. Los ejemplos comprenden: toxinas útiles obtenidas a partir de vegetales, hongos o incluso bacterias, que, a título de ejemplo, comprenden diversas toxinas de cadena A, en particular la cadena A de ricina, las de la inactivación de ribosomas tales como saporina o gelonina, α -sarcina, aspergilina, restrictocina, ribonucleasas tales como ribonucleasa placentaria, sustancias angiogénicas, la toxina de la difteria y la exotoxina de *Pseudomonas*, etc. Un parte de toxina preferida para utilizar con la presente invención es la cadena de la toxina A que se haya tratado para modificar o eliminar residuos de carbohidratos, una cadena A desglucosilada. (Patente US n.º 5.776.427).

La venoclisis de una o una combinación de dichas sustancias citotóxicas, (por ejemplo, ricina B7-4 (sola o junto con ricina B7-2 o ricina B7-1) en un paciente puede provocar la muerte de los inmunocitos, en particular debido a que los inmunocitos activados expresan unas cantidades superiores de ligandos B7-4. Por ejemplo, puesto que se induce PD-1 en la superficie de los linfocitos activados, se puede utilizar un anticuerpo contra PD-1 para dirigir la disminución de estas células específicas mediante mecanismos dependientes de Fc-R o cortando mediante la conjugación de un fármaco citotóxico (por ejemplo, ricina, saporina o caliqueamicina) con el anticuerpo. En una forma de realización, la toxina del anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico. Dichos anticuerpos biespecíficos resultan útiles para dirigirse a una población celular específica, por ejemplo, utilizando un marcador que se encuentra únicamente en un determinado tipo celular, por ejemplo, una molécula de TCR, BCR o FcR.

Resulta útil la regulación por disminución o prevenir funciones coestimuladoras del polipéptido B7-4 o activar una B7-4 o una función inhibidora de PD-1 (por ejemplo, mediante la estimulación de la función de señalización negativa de PD-1) para modular por disminución la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en situaciones de trasplante de tejidos, la piel y órganos, en rechazos inversos (GVHD) o en enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso sistémico y la esclerosis múltiple. Por ejemplo, el bloqueo de la función celular inmunitaria provoca una destrucción tisular reducida en el trasplante de tejidos. Normalmente, en trasplantes de tejidos, se inicia el rechazo del trasplante mediante su reconocimiento como extraño por parte de los inmunocitos, seguido por una reacción inmunitaria que destruye el trasplante. La administración de una molécula que inhiba o bloquee la interacción de una molécula de B7 con un(os) receptor(es) coestimulador(es) en los inmunocitos (tales como una forma soluble monómera de un polipéptido B7-4 o PD-1) sola o junto con otra sustancia de modulación por disminución antes o en el momento del trasplante puede inhibir la generación de una señal coestimuladora. Además, la inhibición de las señales coestimuladoras de B7-4 o la activación de una señal inhibidora de B7-4 o PD-1 pueden resultar asimismo suficientes para anergizar los inmunocitos, provocando con ello tolerancia en un paciente. La inducción de tolerancia a largo plazo bloqueando una señal coestimuladora en la que interviene la B7-4 puede evitar la necesidad de la administración repetida de dichos reactivos bloqueadores.

Para alcanzar una inmunodepresión o tolerancia suficiente en un paciente, se puede pretender asimismo bloquear la función coestimuladora de otras moléculas. Por ejemplo, se puede pretender bloquear la función de B7-1 y B7-4, B7-2 y B7-4, o B7-1 y B7-2 y B7-4 administrando una forma soluble de una combinación de péptidos que presenta la actividad de cada uno de dichos antígenos o anticuerpos bloqueadores contra dichos antígenos (por separado o juntos en una única composición) antes de o en el instante del trasplante. Alternativamente, se puede pretender estimular la actividad inhibidora de B7-4 o PD-1 e inhibir la actividad coestimuladora de B7-1 y/o B7-2. Otras sustancias de modulación por disminución que se pueden utilizar en relación con los métodos de modulación por disminución de la presente invención comprenden, por ejemplo, sustancias que transmiten una señal inhibidora mediante CTLA4, formas solubles de CTLA4, anticuerpos que activan una señal inhibidora mediante CTLA4, anticuerpos bloqueadores contra otros marcadores de inmunocitos o formas solubles de otros pares de ligandos receptores (por ejemplo, las sustancias que interrumpen la interacción entre los ligandos de CD40 y CD40 (por ejemplo, anticuerpos antiligando CD40)), los anticuerpos contra citocinas o fármacos inmunodepresores. En otra forma de realización, se puede administrar una combinación de por lo menos dos anticuerpos distintos de B7-4 para alcanzar la actividad óptima de bloqueo.

Por ejemplo, el bloqueo de la coestimulación del polipéptido B7-4 o la activación de una función inhibidora de B7-4 o PD-1 resulta asimismo útil en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de una activación inapropiada de los inmunocitos que son reactivos contra el propio tejido y que activan la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de dichas enfermedades. La prevención de la activación de los inmunocitos autorreactivos puede reducir o eliminar síntomas de la enfermedad. La administración de reactivos que bloquean la coestimulación de los inmunocitos por interrumpiendo las interacciones receptor:ligando de las moléculas B7 con los receptores coestimuladoras resulta útil para inhibir la activación de los inmunocitos y prevenir la producción de autoanticuerpos o citocinas que pueden estar implicados en el proceso de la enfermedad. Además, las sustancias que activan una función inhibidora de B7-4 o PD-1 pueden provocar una tolerancia específica al antígeno de los inmunocitos autorreactivos, lo que podría provocar la mitigación a largo plazo de la enfermedad. Se puede determinar la eficacia de los reactivos en la prevención o la

mitigación de trastornos autoinmunitarios utilizando diversos modelos con animales muy caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Los ejemplos comprenden la encefalitis autoinmunitaria experimental murina, el lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o ratones híbridos NZB, la artritis colágena autoinmunitaria murina, la diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB, y la miastenia experimental murina grave (véase Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856).

La inhibición de la activación de los inmunocitos resulta útil terapéuticamente en el tratamiento de las alergias y las reacciones alérgicas, por ejemplo, inhibiendo la producción de IgE. Se puede administrar a un paciente alérgico una sustancia que active una función inhibidora de B7-4 o PD-1 para inhibir las respuestas alérgicas en las que intervienen inmunocitos en el paciente. La activación de un polipéptido PD-1 puede resultar asimismo útil en el tratamiento de las alergias. La inhibición de coestimulación de B7-4 de los inmunocitos o la estimulación de una vía inhibidora de B7-4 o PD-1 puede venir acompañada por la exposición al alérgeno junto con las moléculas MHC apropiadas. Las reacciones alérgicas pueden ser de naturaleza sistémica o local, en función de la ruta de entrada del alérgeno y la pauta de precipitación de la IgE en los mastocitos o basófilos. De este modo, la inhibición de las respuestas alérgicas locales o sistémicas en las que intervienen inmunocitos administrando una forma inhibidora de una sustancia que inhibe la interacción de la B7-4 con un receptor coestimulador o una sustancia que activa una función inhibidora de B7-4 o PD-1.

La inhibición de la activación de inmunocitos mediante el bloqueo de la actividad coestimuladora de B7-4 o la estimulación de la actividad inhibidora de PD-1 puede resultar terapéuticamente importante en infecciones víricas de los inmunocitos. Por ejemplo, en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se estimula la multiplicación vírica mediante la activación de los inmunocitos. El bloqueo de la interacción B7-4 / receptor coestimulador o la estimulación de la función inhibidora de B7-4 o PD-1 puede provocar la inhibición de la multiplicación vírica y, por lo tanto, mejorar la evolución del SIDA. La regulación por disminución de una respuesta inmunitaria estimulando la actividad de B7-4 o la interacción de B7-4 con su(s) ligando(s) natural(es), por ejemplo, PD-1, puede resultar asimismo útil para estimular el mantenimiento de la gestación. La B7-4 presenta normalmente una expresión elevada en los trofoblastos de la placenta, la capa de células que constituye la superficie de contacto entre la madre y el feto, y pueden desempeñar un papel en la prevención del rechazo materno del feto. Las mujeres con riesgo de aborto espontáneo (por ejemplo, las identificadas mediante la detección sistemática de la actividad de la B7-4, tal como se describe en el apartado "Pruebas de pronóstico", las que han tenido previamente algún aborto espontáneo o las que han tenido dificultades para concebir) a causa del rechazo inmunitario del embrión o del feto se pueden tratar con sustancias que estimulan la actividad de la B7-4 o su interacción con su(s) ligando(s) natural(es), por ejemplo, PD-1

La regulación por disminución de una respuesta inmunitaria mediante la estimulación de la actividad de la B7-4 o la interacción de la B7-4 con su(s) ligando(s) natural(es), por ejemplo, PD-1, puede resultar asimismo útil en el tratamiento de un ataque autoinmunitario de los tejidos autógenos. Por ejemplo, la B7-4 está normalmente muy expresada en el corazón y protege el corazón ante un ataque autoinmunitario. Ello se pone de manifiesto por el hecho de que los ratones con genes desactivados Balb/c PD-1 presentan un ataque autoinmunitario masivo de corazón con trombosis. Por lo tanto, se puede mejorar en las enfermedades provocadas o agravadas por ataques autoinmunitarios (por ejemplo, en este caso, cardiopatías, infarto de miocardio o aterosclerosis) aumentando la actividad de B7-4 o el enlace de B7-4 con su ligando natural, por ejemplo, el PD-1. Por lo tanto, queda comprendido por el alcance de la presente invención modular las enfermedades agravadas por ataques autoinmunitarios, tal como los trastornos autoinmunitarios (así como trastornos tales como las cardiopatías, el infarto de miocardio y la aterosclerosis) estimulando la actividad de B7-4 o la interacción de B7-4 con B7-4.

4.Regulación por aumento de las respuestas inmunitarias

La regulación por aumento de la actividad coestimuladora de B7-4 o inhibir una actividad inhibidora de PD-1 o B7-4 como medio de regular por aumento las respuestas inmunitarias resulta asimismo útil en los tratamientos. La regulación por aumento de las respuestas inmunitarias puede comprender potenciar una respuesta inmunitaria existente o producir una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, potenciar una respuesta inmunitaria estimulando la actividad coestimuladora de B7-4 o B7-4 o inhibiendo la actividad inhibidora de PD-1 resulta útil en casos de infecciones microbianas, por ejemplo, bacterias, virus o parásitos. Por ejemplo, en una forma de realización, sería beneficiosa una forma de B7-4 que activase una señal coestimuladora en un inmunocito (por ejemplo, un péptido B7-4 en una forma multivalente (por ejemplo, una forma multivalente soluble o una forma expresada en la superficie celular) o una sustancia que inhibiese la interacción de B7-4 con un receptor inhibidor o una sustancia que inhibe la transducción de una señal inhibidora mediante PD-1, por ejemplo, un anticuerpo no activador contra PD-1, resulta terapéuticamente útil en situaciones en las que la regulación por aumento de anticuerpos y respuestas en las que intervienen células, provocando una depuración más rápida o exhaustiva de virus. Estas comprenderían enfermedades víricas de la piel tales como el herpes zóster, en cuyo caso se puede administrar dicha sustancia por vía tópica a la piel. Además, se pueden aliviar enfermedades víricas sistémicas tales como la gripe, el resfriado común y la encefalitis administrando sistémicamente dichas sustancias.

En ciertos casos, se puede pretender administrar además otras sustancias que regulen por aumento las respuestas inmunitarias, por ejemplo, formas de otros miembros de la familia B7 que transducen señales mediante receptores coestimuladores, para aumentar más la respuesta inmunitaria.

Alternativamente, se pueden mejorar las respuestas inmunitarias en un paciente infectado extrayendo inmunocitos del paciente, poniendo en contacto los inmunocitos *in vitro* con una forma de B7-4 que active una señal coestimuladora en un inmunocito o una sustancia que inhiba la interacción de B7-4 con un receptor inhibitor, o una sustancia que inhiba la transducción de una señal inhibitora mediante el PD-1, y volviendo a introducir los inmunocitos estimulados *in vitro* en el paciente. En otra forma de realización, un método para mejorar la respuesta inmunitaria comprende aislar las células infectadas de un paciente, por ejemplo, células infectadas por virus, someterlas a transfección con una molécula de ácido nucleico que codifique una forma de B7-4 que se une a un receptor coestimulador de tal modo que las células expresan toda o una parte de la molécula B7-4 en su superficie, y volver a introducir las células sometidas a transfección en el paciente. Las células sometidas a transfección son capaces de suministrar una señal coestimuladora, y de ese modo activar, a los inmunocitos *in vivo*.

Se pueden utilizar preventivamente formas de B7-4 que activan una señal coestimuladora en un inmunocito o una sustancia que inhibe la interacción de B7-4 con un receptor inhibitor, o una sustancia que inhibe la transducción de una señal inhibitora mediante el PD-1 en vacunas contra diversos polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos procedentes de patógenos. Se puede provocar la inmunidad contra un patógeno, por ejemplo, un virus, mediante la vacunación con una proteína vírica junto con una forma de B7-4 que activa una señal coestimuladora en un inmunocito, o una sustancia que inhibe la interacción de B7-4 con un receptor inhibitor, o una sustancia que inhibe la transducción de una señal inhibitora mediante PD-1 en un aditivo apto. Alternativamente, se puede utilizar un vector que comprende genes que codifican tanto un antígeno de un patógeno como una forma de B7-4 que se une a los receptores coestimuladores en la vacunación. Se pueden administrar vacunas de ácidos nucleicos mediante diversos medios, por ejemplo, por inyección (por ejemplo, intramuscular, intradérmica o inyección biolística de partículas de oro recubiertas de ADN en la epidermis con una pistola génica que utiliza un acelerador de partículas o un gas comprimido para inyectar las partículas en la piel (Haynes et al. 1996. J. Biotechnol. 44:37)). Alternativamente, se pueden administrar vacunas de ácidos nucleicos mediante procedimientos no invasivos. Por ejemplo, se puede dirigir al sistema respiratorio el ADN puro o formulado con lípidos o dirigirse hacia otro lugar, por ejemplo, con parches Peyers para la administración oral de ADN (Schubbert. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:961). Se pueden utilizar microorganismos atenuados para la administración en superficies mucosas. (Sizemore et al. 1995. Science. 270:29)

En una forma de realización, se puede administrar una forma de un polipéptido B7-4 que transmite una señal coestimuladora con proteínas MHC de clase I, por ejemplo, mediante una célula sometida a transfección que coexpresa un polipéptido B7-4 y una proteína de cadena α MHC de clase I y microglobulina β_2 para provocar la activación de los linfocitos T y proporcionar inmunidad ante la infección. Por ejemplo, los patógenos para los que las vacunas resultan útiles comprenden la hepatitis B, la hepatitis C, el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus, el VIH-1, el VIH-2, la tuberculosis, la malaria y la esquistosomosis.

En otra aplicación, la regulación por aumento o la potenciación de una función coestimuladora de B7-4 resulta útil para provocar inmunidad tumoral. Se pueden administrar células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma) sometidas a transfección con una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno B7-4 a un paciente para superar la tolerancia específica del tumor en el paciente. Si se pretende de este modo, se puede someter a transfección la célula tumoral para que exprese una combinación de polipéptidos B7 (por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-4). Por ejemplo, se pueden someter a transfección *ex vivo* células tumorales procedentes de un paciente con un vector de expresión que dirige la expresión de un polipéptido B7-4 solo, o junto con un péptido que presenta actividad B7-1 y/o actividad B7-2. Las células tumorales sometidas a transfección se devuelven al paciente para provocar la expresión de los péptidos en la superficie de la célula sometida a transfección. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas de genoterapia para dirigirse a una célula tumoral para su transfección *in vivo*.

Además, las células tumorales que carecen de moléculas MHC de clase I o MHC de clase II, o que no expresan cantidades suficientes de moléculas de MHC de clase I o MHC de clase II, se pueden someter a transfección con un ácido nucleico que codifique toda o una parte de (por ejemplo, una parte cortada de un dominio citoplasmático) de una proteína de cadena α MHC de clase I y una proteína de microglobulina β_2 o una proteína de cadena α MHC de clase II y una proteína de cadena P MHC de clase II para expresar de este modo las proteínas MHC de clase I o MHC de clase II en la superficie celular. La expresión de la MHC de clase I o clase II apropiadas junto con un péptido que presente la actividad de un antígeno de linfocitos B (por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-4) provoca una respuesta inmunitaria en la que intervienen linfocitos T contra la célula tumoral sometida a transfección. Opcionalmente, un gen que codifica un constructo antisentido que bloquea la expresión de una proteína MHC de clase II asociada, tal como la cadena invariante, se puede someter asimismo a cotransfección con un ADN que

codifica un polipéptido B7-4 para activar la presentación de antígenos asociados a tumores y provocar la inmunidad específica del tumor. Se ha demostrado que la expresión de la B7-1 por parte de las células tumorales murinas negativas B7 provoca la inmunidad específica en la que intervienen linfocitos T junto con el rechazo del tumor y prolonga la protección ante la exposición al tumor en ratones (Chen, L., et al. (1992) Cell 71, 1093-1102; Townsend, S. E. and Allison, J. P. (1993) Science 259, 368-370; Baskar, S., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 5687-5690). De este modo, la provocación de una respuesta inmunitaria en la que intervienen inmunocitos en un paciente humano puede resultar suficiente para superar la tolerancia específica del tumor en el paciente.

En otra forma de realización, se puede estimular la respuesta inmunitaria con la transmisión de una señal mediante un receptor coestimulador que se une a la B7-4 o con la inhibición de la señalización mediante un receptor inhibitor que se une a la B7-4, por ejemplo, el PD-1, de tal modo que se supera la tolerancia preexistente. Por ejemplo, se pueden provocar respuestas inmunitarias contra antígenos contra los que un paciente puede no montar una respuesta inmunitaria significativa, por ejemplo, contra un antígeno autógeno, tal como antígenos específicos de un tumor, administrando una sustancia que inhiba la actividad inhibitora del PD-1 o la capacidad de la B7-4 de unirse a un ligando inhibitor. Por ejemplo, en una forma de realización, se pueden utilizar PD-1 soluble o B7-4 soluble (por ejemplo, PD-1Fc o B7-4 Fc) para mejorar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, contra una célula tumoral. En una forma de realización, un antígeno autógeno, tal como un antígeno específico de un tumor se puede administrar junto con una sustancia que inhiba la actividad inhibitora del PD-1 o la capacidad de la B7-4 de unirse a un ligando inhibitor. En una forma de realización adicional, se puede estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno (por ejemplo, un antígeno autógeno) para tratar un trastorno neurológico. En una forma de realización adicional, se pueden utilizar antagonistas del PD-1 como potenciadores para aumentar las respuestas contra los antígenos extraños en el proceso de inmunización activa.

En otra forma de realización adicional, se puede inhibir la producción de una forma de B7-4 que se une a un receptor inhibitor o que compite con la unión de B7-4 a un receptor coestimulador (por ejemplo, una forma de B7-4 que se une al PD-1 o una molécula soluble natural), por ejemplo, utilizando ARN antisentido, para regular por aumento la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, en una forma de realización, se puede inhibir la producción de moléculas inhibitoras B7-4 por parte una célula tumoral para aumentar la inmunidad antitumor.

En una forma de realización, los inmunocitos se obtienen a partir de un paciente y se cultivan *ex vivo* en presencia de una forma de B7-4 que se une a una molécula coestimuladora o en presencia de una sustancia que inhibe una señal inhibitora de B7-4 o PD-1 para aumentar la población de inmunocitos. En una forma de realización adicional, los inmunocitos se administran a un paciente. Se pueden estimular los inmunocitos para que se multipliquen *in vitro*, por ejemplo, proporcionando a los inmunocitos una señal de activación primaria y una señal coestimuladora, tal como se conoce en la técnica. Se pueden utilizar asimismo diversas formas de proteínas B7-4 o sustancias que se unen a un receptor coestimulador o que inhiben la señalización mediante PD-1 para coestimular la multiplicación de los inmunocitos. En una forma de realización los inmunocitos se cultivan *ex vivo* según el método descrito en la solicitud PCT n.º WO 94/29436. La molécula coestimuladora puede ser soluble, unida a una membrana celular o unida a una superficie sólida, tal como una perla.

B. Identificación de citocinas en la que interviene la modulación de B7-4 y/o PD-1

Las moléculas B7-4 y PD-1 descritas en la presente memoria se pueden utilizar para identificar citocinas que se producen, o cuya producción se ha potenciado o inhibido en los inmunocitos, como respuesta a la modulación de la actividad de la B7-4 y/o el PD-1. Se puede realizar una estimulación subóptima *in vitro* de los inmunocitos que expresan el PD-1 con una señal de activación primaria, por ejemplo, se pueden estimular los linfocitos T con éster de forbol, un anticuerpo anti-CD3 o preferentemente un antígeno asociado a una molécula MHC de clase II, y se les proporciona un señal coestimuladora, por ejemplo, mediante una forma estimuladora de antígeno de la familia B7, por ejemplo, mediante una célula sometida a transfección con un ácido nucleico que codifica un polipéptido B7 y expresa el péptido en su superficie o mediante una forma estimuladora soluble del péptido. Se pueden identificar las citocinas conocidas liberadas en el medio mediante la prueba ELISA o por la capacidad de un anticuerpo que bloquea la citocina para inhibir la multiplicación de los inmunocitos o la multiplicación de otros tipos celulares provocada por la citocina. Por ejemplo, se encuentra disponible un kit de ELISA para la IL-4 en Genzyme (Cambridge MA), como anticuerpo bloqueador de una IL-7. Se encuentran disponibles anticuerpos bloqueadores contra IL-9 e IL-12 en el Genetics Institute (Cambridge, MA). Por lo tanto, se puede determinar el efecto de estimular o bloquear la interacción de la B7-4 con el PD-1 en el perfil de la citocina.

Se puede utilizar asimismo un ensayo de coestimulación de inmunocitos *in vitro* tal como se ha descrito anteriormente en un método para identificar nuevas citocinas que se pueden modular mediante la modulación de B7-4 y/o PD-1. Por ejemplo, cuando parece que la estimulación de la vía CD28/CTLA4 mejora la secreción de la IL-2, parece que la estimulación de la vía ICOS mejora la secreción de la IL-10 (Hutloff et al. 199. Nature 397:263). Si una actividad particular provocada por la coestimulación, por ejemplo, la multiplicación de inmunocitos, no se puede inhibir añadiendo anticuerpos bloqueadores para citocinas conocidas, la actividad puede proceder de la acción de

una citocina desconocida. Tras la coestimulación, se puede purificar dicha citocina a partir del medio mediante métodos convencionales y medir su actividad con respecto a su capacidad para provocar la proliferación de los inmunocitos.

- 5 Para identificar las citocinas que pueden desempeñar un cierto papel la provocación de tolerancia, se puede utilizar un ensayo de coestimulación de linfocitos T *in vitro* tal como se ha descrito anteriormente. En este caso, se proporcionaría a los linfocitos T la señal de activación primaria y se pondrían en contacto con una citocina seleccionada, pero no se les proporcionaría la señal coestimuladora. Después de lavar y reposar los inmunocitos, se volverían a exponer las células tanto a una señal de activación primaria como a una señal coestimuladora. Si los
- 10 inmunocitos no responden (por ejemplo, se multiplican o producen citocinas) se han convertido en tolerantes y la citocina no ha impedido que se produzca la tolerancia. Sin embargo, si los inmunocitos responden, se ha evitado mediante la citocina la provocación de la tolerancia. Dichas citocinas que pueden prevenir la provocación de tolerancia pueden ser objeto de bloqueo *in vivo* junto con reactivos que bloquean los antígenos de los linfocitos B como medio más eficiente para provocar tolerancia en receptores de trasplantes o pacientes con enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, se podría administrar un anticuerpo bloqueador de una citocina a un paciente junto
- 15 con una sustancia que active una B7-4 o una actividad inhibidora del PD-1.

C. Identificación de moléculas que modulan la expresión de un polipéptido B7-4 o PD-1

- 20 Los anticuerpos producidos utilizando las proteínas y péptidos de la presente invención se pueden utilizar en una prueba de identificación sistemática para moléculas que modulan la expresión del polipéptido B7-4 o PD-1 en las células. Por ejemplo, se pueden identificar las moléculas que modulan las vías de señalización intracelulares que provocan cambios en la expresión de los polipéptidos B7-4 o PD-1 (por ejemplo, como respuesta a las señales de activación), analizando la expresión de uno o más polipéptidos B7-4 o PD-1 en la superficie celular. Una reducción
- 25 de la tinción de inmunofluorescencia mediante un anticuerpo apropiado en presencia de la molécula podría indicar que la molécula inhibe las señales intracelulares. Las moléculas que regulan por aumento la expresión del polipéptido B7-4 o PD-1 provocan un aumento de la tinción de inmunofluorescencia. Alternativamente, se puede determinar el efecto de una molécula en la expresión de un polipéptido detectando los niveles de ARNm celular utilizando una sonda de la presente invención. Por ejemplo, se puede poner en contacto una célula que expresa un
- 30 polipéptido B7-4 o PD-1 con una molécula para analizar, y un aumento o una disminución de los niveles de ARNm en la célula detectados mediante técnicas estándar, tales como análisis de la hibridación de tipo Northern o por transferencia puntual convencional de ARNm o de poli(A⁺)ARN total utilizando una sonda de ADNc marcado con un marcador detectable. Las moléculas que modulan la expresión de un polipéptido B7-4 o PD-1 resultan útiles
- 35 terapéuticamente, tanto para regular por aumento como para regular por disminución las respuestas inmunitarias solas o en conjunto con reactivos bloqueadores o estimuladores solubles tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, una molécula que inhibe la expresión de la B7-4 se puede administrar junto con una segunda sustancia, por ejemplo, un inmunodepresor o una molécula que inhibe la expresión del PD-1 se puede administrar con un inmunoestimulante, por ejemplo, un potenciador. Los ejemplos de moléculas que se pueden analizar con respecto a
- 40 su capacidad para modular la B7-4 o el PD-1 comprenden citocinas tales como IL-4, γ INF, IL-10, IL-12, GM-CSF y prostaglandinas.

D. Pruebas de identificación sistemática

- 45 La presente invención proporciona un método (denominado también en la presente memoria como "prueba de identificación sistemática") para identificar moduladores, es decir, compuestos o sustancias candidatos o de ensayo (por ejemplo, péptidos, miméticos peptídicos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen a las proteínas B7-4 o PD-1, tienen un efecto estimulador o inhibidor, por ejemplo, en la expresión de B7-4 o PD-1 o la actividad de B7-4 o PD-1.
- 50 En una forma de realización, la presente invención proporciona pruebas para realizar la identificación sistemática de compuestos candidatos o de ensayo que se unen a, o modulan, la actividad de una proteína o polipéptido B7-4 o PD-1 o región biológicamente activa de la misma, por ejemplo, modulan la capacidad del polipéptido B7-4 o PD-1 para interactuar con un ligando análogo o una molécula de interacción (por ejemplo, una molécula de interacción intracelular). Se pueden obtener los compuestos de ensayo de la presente invención utilizando cualquiera de los
- 55 numerosos planteamientos de los métodos de genotecas combinatorias conocidos en la técnica, entre ellos: genotecas biológicas; genotecas de fase sólida en paralelo direccionable en el espacio o de fase en disolución; métodos de genotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de biblioteca de 'una perla - un compuesto'; y métodos de genotecas sintéticas que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. El planteamiento de genoteca biológica se limita a genotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro planteamientos
- 60 se pueden aplicar a péptidos, oligómeros no peptídicos o genotecas de moléculas pequeñas de compuestos (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Se pueden encontrar en la técnica ejemplos de métodos para la síntesis de genotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al. (1993) Science 261:1303; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; and in Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233.

Las genotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (por ejemplo, Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421), o en perlas (Lam (1991) Nature 354:82-84), chips (Fodor (1993) Nature 364:555-556), bacterias (Ladner USP 5.223.409), esporas (Ladner USP '409), plásmidos (Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869) o en fagos (Scott and Smith (1990) Science 249:386-390); (Devlin (1990) Science 249:404-406); (Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382); (Felici (1991) J Mol. Biol. 222:301-310); (Ladner *supra*).

En una forma de realización adicional, un ensayo es una prueba basada en células que comprende poner en contacto una célula que expresa una molécula diana de B7-4 (una molécula de interacción intracelular o un receptor PD-1) o una molécula diana de PD-1 (por ejemplo, un ligando B7-4 o una molécula de interacción intracelular) con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular (por ejemplo estimular o inhibir) la actividad de la molécula diana de B7-4 o PD-1. Se puede determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una molécula diana de B7-4 o PD-1, por ejemplo, determinando la capacidad de la proteína B7-4 o PD-1 para unirse o interactuar con la molécula diana de B7-4 o PD-1. Se puede realizar la determinación de la capacidad de la proteína B7-4 o PD-1 para unirse o interactuar con su ligando, por ejemplo, midiendo la unión directa.

En un ensayo de unión directa, la proteína B7-4 o PD-1 (o sus moléculas diana correspondientes) se pueden acoplar con una etiqueta de radioisótopos o enzimática de tal modo que se puede determinar la unión de la proteína B7-4 o PD-1 a una molécula diana de B7-4 o PD-1 detectando la proteína marcada en un complejo. Por ejemplo, se pueden marcar las moléculas B7-4 o PD-1, por ejemplo, las proteínas B7-4 o PD-1, con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , directa o indirectamente, y se puede detectar el radioisótopo mediante el recuento directo de la radioemisión o mediante el recuento de centelleo. Alternativamente, las moléculas B7-4 o PD-1 se pueden marcar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y detectar la etiqueta enzimática por determinación de la conversión de un sustrato apropiado en el producto.

Queda comprendido asimismo dentro del alcance de la presente invención determinar la capacidad de un compuesto para modular la interacción entre B7-4 o PD-1 y su molécula diana, sin el etiquetado de cualquiera de los interactuantes. Por ejemplo, se puede utilizar un microfisiómetro para detectar la interacción de B7-4 o PD-1 con su molécula diana sin el marcado de B7-4 o PD-1 o de la molécula diana (McConnell, H. M. et al. (1992) Science 257:1906-1912). Tal como se utiliza en la presente memoria, un "microfisiómetro" (por ejemplo, Cytosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su entorno utilizando un sensor potenciométrico direccionable con la luz (LAPS). Se pueden utilizar los cambios en dicha velocidad de acidificación como indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

En una forma de realización preferida, se puede realizar la determinación de la capacidad de la proteína B7-4 o PD-1 para unirse o interactuar con una molécula diana de B7-4 o PD-1 determinando la actividad de la B7-4, PD-1 o de la molécula diana apropiada. Por ejemplo, se puede determinar la actividad de B7-4, PD-1 o de la molécula diana apropiada detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, la actividad de la tirosina cinasa), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apto, detectando la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador que reacciona a la diana ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, la cloranfenicol acetiltransferasa) o detectando una respuesta celular regulada por B7-4, PD-1 o la molécula diana apropiada. Por ejemplo, se puede realizar la determinación de la capacidad de la proteína B7-4 o PD-1 para unirse o interactuar con una molécula diana de B7-4 o PD-1, por ejemplo, midiendo la capacidad de un compuesto para modular la coestimulación o inhibición del inmunocito en un ensayo de multiplicación, o interfiriendo con la capacidad de un polipéptido B7-4 o PD-1 para unirse a anticuerpos que reconocen una región del polipéptido B7-4 o PD-1.

En otra forma de realización adicional, un ensayo de la presente invención es un ensayo sin células en el que se pone en contacto una proteína B7-4 o PD-1 o región biológicamente activa de la misma con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para unirse a la proteína B7-4 o PD-1 o región biológicamente activa de la misma. Se puede determinar la unión del compuesto de ensayo a la proteína B7-4 o PD-1 directa o indirectamente tal como se ha descrito anteriormente. En una forma de realización preferida, el ensayo comprende poner en contacto la proteína B7-4 o PD-1 o una región biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a B7-4 o PD-1 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con una proteína B7-4 o PD-1, comprendiendo la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para

interaccionar con una proteína B7-4 o PD-1 determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente al polipéptido B7-4 o PD-1 o región biológicamente activa del mismo en comparación con el compuesto conocido.

5 En una forma de realización adicional, el ensayo es un ensayo sin células en el que se pone en contacto una proteína B7-4 o PD-1 o región biológicamente activa de la misma con un compuesto de ensayo y se determina la capacidad del compuesto de ensayo para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad de la proteína B7-4 o PD-1 o región biológicamente activa de la misma. Se puede realizar la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una proteína B7-4 o PD-1, por ejemplo, determinando la capacidad de la
10 proteína B7-4 o PD-1 para unirse a la molécula diana de B7-4 o PD-1 mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar un enlace directo. Se puede realizar asimismo la determinación de la capacidad de la proteína B7-4 o PD-1 para unirse a una molécula diana B7-4 o PD-1 utilizando una tecnología tal como el análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Tal como se utiliza en la presente memoria, "BIA" es una
15 tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore). Se pueden utilizar los cambios en el fenómeno óptico de resonancia de plasmón de superficie (SPR) como indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

En otra forma de realización adicional, el ensayo sin células implica poner en contacto la proteína B7-4 o PD-1 o una
20 región biológicamente activa de la misma con un compuesto conocido que se une a la proteína B7-4 o PD-1 para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con la proteína B7-4 o PD-1, comprendiendo la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con una proteína B7-4 o PD-1
25 determinar la capacidad de la proteína B7-4 o PD-1 para unirse preferentemente a, o modular la actividad de, una molécula diana de B7-4 o PD-1.

Los ensayos sin células de la presente invención pueden utilizar las formas de proteínas solubles y/o unidas a la membrana (por ejemplo, proteínas B7-4 o PD-1 o regiones biológicamente activas de las mismas, o ligandos a los que se une B7-4 o PD-1) En el caso de ensayos sin células en el que se utiliza una forma de proteína unida a la
30 membrana (por ejemplo, un receptor de B7-4 o PD-1 superficie de celular), se puede pretender utilizar un solubilizante de tal modo que la forma de proteína unida a membrana se mantiene en disolución. Los ejemplos de dichos solubilizantes comprenden detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, isotridecilo(etilenglicol éter)_n, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-
35 [(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO) o sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano.

En más de una forma de realización de los métodos de ensayo anteriores de la presente invención, se puede pretender inmovilizar tanto B7-4 o PD-1 como una molécula diana apta para facilitar la separación de formas que
40 constituyen complejos de las que no constituyen complejos de una o ambas proteínas, como así como para adaptar la automatización del ensayo. Se pueden realizar la unión de un compuesto de ensayo a una proteína B7-4 o PD-1, o la interacción de una proteína B7-4 o PD-1 con una molécula diana con y sin un compuesto candidato, en cualquier recipiente apto que contenga los reactivos. Los ejemplos de tales recipientes comprenden placas de microvaloración, tubos de ensayo y tubos de microcentrifugación. En una forma de realización, se puede
45 proporcionar una proteína de fusión que añada un dominio que permita que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa-B7-4 o PD-1 o las proteínas de fusión / diana glutatión-S-transferasa pueden adsorberse sobre perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microvaloración modificadas con glutatión que, a continuación, se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y, o la proteína diana no adsorbida o la proteína B7-4 o PD-1, y se incuba la mezcla en
50 unas condiciones que provocan la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas con respecto a la sal y el pH). Tras la incubación, se lavan las perlas o pocillos de las placas microvaloración para eliminar cualquier componente no unido, se inmoviliza la matriz en el caso de perlas, se termina el complejo directa o indirectamente, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, se pueden disociar los complejos de la matriz y determinar el nivel de unión o actividad de B7-4 o PD-1 utilizando técnicas estándar.

Se pueden utilizar otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices en los ensayos de identificación sistemática de la presente invención. Por ejemplo, se pueden inmovilizar tanto una proteína B7-4 o PD-1 como una
60 molécula diana de B7-4 o PD-1 utilizando la conjugación de la biotina y la estreptavidina. Se puede preparar la proteína B7-4 o PD-1 biotinilada o moléculas diana a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) utilizando procedimientos muy conocidos en la técnica (por ejemplo, un kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, se pueden modificar los anticuerpos reactivos con la proteína B7-4 o PD-1 o moléculas diana pero que no interfieran con la unión de la proteína B7-4 o PD-1 a su molécula diana en los pocillos de la placa, y separar

la proteína diana o B7-4 o PD-1 atrapada en los pocillos mediante conjugación de anticuerpos. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, comprenden la inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos que reaccionan con la proteína B7-4 o PD-1 o su molécula diana, así como ensayos de ligación con enzimas que dependen de la detección de una actividad enzimática relacionada con la proteína B7-4 o PD-1 o su molécula diana.

En una forma de realización alternativa, se puede realizar la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una proteína B7-4 o PD-1 determinando la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de una molécula que funciona a continuación de la B7-4, por ejemplo, una molécula que interacciona con la B7-4 o una molécula que funciona a continuación del PD-1, por ejemplo, interaccionando con el dominio citoplasmático del PD-1. Por ejemplo, se pueden determinar los niveles de segundos mensajeros, la actividad de la molécula de interacción en un objetivo apropiada o se puede determinar la unión de la molécula de interacción a una diana apta tal como se ha descrito anteriormente.

En una forma de realización adicional, se identifican los moduladores de la expresión de B7-4 o PD-1 en un método en el que se pone en contacto una célula con un compuesto candidato y se determina la expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1. El nivel de expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1 ARNm sin el compuesto candidato. A continuación se puede identificar el compuesto candidato como modulador de la expresión de B7-4 o PD-1 basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1 es superior (por ejemplo, estadísticamente significativamente superior) en presencia del compuesto candidato que si falta, se identifica el compuesto candidato como estimulador de la expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1. Alternativamente, cuando la expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1 es inferior (por ejemplo, estadísticamente significativamente inferior) en presencia del compuesto candidato que si falta, el compuesto candidato se identifica como inhibidor de la expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1. Se puede determinar el nivel de expresión del ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1 en las células con los métodos descritos en la presente memoria para detectar el ARNm o la proteína de B7-4 o PD-1.

En otro aspecto adicional de la presente invención, se pueden utilizar las proteínas B7-4 o PD-1, preferentemente en una forma unida a la membrana, como "proteínas cebo" en un ensayo de dos híbridos de ensayo o de tres híbridos (véase, por ejemplo, la patente US n.º 5.283.317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; y Brent WO94/10300), para identificar otras proteínas ("proteínas de unión con B7-4 o PD-1" o "pb B7-4 o PD-1"), que se unen o interaccionan con B7-4 o PD-1 y se encuentran implicadas en la actividad de B7-4 o PD-1. Dichas proteínas de unión con B7-4 o PD-1 tienden asimismo a estar implicadas en la propagación de señales mediante las proteínas B7-4 o PD-1 las dianas de B7-4 o PD-1 tales como, por ejemplo, elementos anteriores o posteriores de una vía de señalización en la que intervienen B7-4 o PD-1. Alternativamente, dichas proteínas de unión con B7-4 o PD-1 pueden ser inhibidoras de B7-4 o PD-1.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de factores de la transcripción, que consisten en dominios de unión y de activación con el ADN separables. En pocas palabras, el ensayo utiliza dos constructos de distintos. En un constructo, el gen que codifica una proteína B7-4 o PD-1 se fusiona con un gen que codifica el dominio de unión con el ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN, procedente de una genoteca de secuencias de ADN, que codifica una proteína no identificada ("presa" o "muestra") se fusiona con un gen que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas "cebo" y "presa" pueden interaccionar *in vivo* formando un complejo dependiente de la B7-4, los dominios de unión y de activación del ADN del factor de transcripción se aproximan entre sí. Dicha proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo, LacZ) que se encuentra unido operativamente a un sitio regulador de la transcripción que reacciona con el factor de la transcripción. Se puede detectar la expresión del gen indicador y se pueden aislar y utilizar las colonias celulares que contienen el factor de la transcripción funcional para obtener el gen clonado que codifica la proteína que interacciona con la proteína B7-4 o PD-1.

La presente descripción se refiere además a unas nuevas sustancias identificadas mediante los ensayos de identificación sistemática descritos anteriormente. Por consiguiente, se encuentra dentro del alcance de la presente invención utilizar además una sustancia identificada tal como se ha descrito en la presente memoria en un modelo apto con animales. Por ejemplo, se puede utilizar una sustancia identificada tal como se ha descrito en la presente memoria (por ejemplo, una sustancia de modulación de B7-4 o PD-1, una molécula de ácido nucleico antisentido de B7-4 o PD-1, un anticuerpo específico de B7-4 o PD-1, o un ligando de B7-4 o PD-1) en un modelo con animales para determinar la eficacia, la toxicidad o los efectos secundarios del tratamiento con dicha sustancia. Alternativamente, se puede utilizar una sustancia identificada tal como se ha descrito en la presente memoria en un modelo con animales para determinar el mecanismo de acción de dicha sustancia. Además, la presente invención se

refiere a los usos de unas nuevas sustancias identificadas mediante los ensayos de identificación sistemática descritos anteriormente para los tratamientos tal como se ha descrito en la presente memoria.

F. Ensayos de detección

Se pueden utilizar las regiones o fragmentos de las secuencias de ADNc identificadas en la presente memoria (y las secuencias génicas completas correspondientes) de numerosas maneras como reactivos de polinucleótidos. Por ejemplo, se pueden utilizar dichas secuencias para: (i) cartografiar sus genes correspondientes en un cromosoma; y, de este modo, localizar las regiones de genes relacionadas con la enfermedad genética; (ii) identificar a un individuo a partir de una muestra biológica muy pequeña (tipificación de tejidos); y (iii) ayudar en la identificación forense de una muestra biológica. Dichas aplicaciones se describen en los apartados siguientes.

1. Cartografía cromosómica

Una vez se ha aislado la secuencia (o parte de la secuencia) de un gen, se puede utilizar dicha secuencia para cartografiar la ubicación del gen en un cromosoma. Dicho procedimiento se denomina cartografía cromosómica. Por consiguiente, se pueden utilizar las partes o fragmentos de secuencias de nucleótidos de B7-4, descritos en la presente memoria, para cartografiar la ubicación de los genes de B7-4 en un cromosoma. La cartografía de las secuencias de B7-4 en los cromosomas constituye una primera etapa importante en la correlación de dichas secuencias con los genes relacionados con la enfermedad.

En pocas palabras, los genes B7-4 se pueden asignar a cromosomas preparando cebadores de PCR (preferentemente con una longitud de pb comprendida entre 15 y 25) a partir de secuencias de nucleótidos de B7-4. Se puede utilizar el análisis informático de las secuencias de B7-4 para predecir cebadores que no comprenden más de un exón en el ADN genómico, complicando de este modo el proceso de amplificación. Dichos cebadores se pueden utilizar a continuación en la identificación sistemática por PCR de híbridos de células somáticas que contengan cromosomas humanos individuales. Únicamente aquellos híbridos que contengan el gen humano correspondiente a las secuencias B7-4 producirán un fragmento amplificado.

Se preparan híbridos de células somáticas fusionando células somáticas de mamíferos distintos (por ejemplo, humanos y células de ratón). Puesto que los híbridos de células humanas y de ratón crecen y se dividen, pierden gradualmente los cromosomas humanos en un orden aleatorio, pero conservan los cromosomas de ratón. Utilizando unos medios en los que las células de ratón no puedan crecer, ya que carecen de una enzima en particular, pero en el que las células humanas sí pueden, ya que se conservará el cromosoma humano que contiene el gen que codifica la enzima necesaria. Utilizando diversos medios, se pueden establecer paneles de estirpes celulares híbridas. Cada estirpe celular de un panel comprende un único cromosoma humano o un número reducido de cromosomas humanos, y un conjunto completo de cromosomas de ratón, lo que permite cartografiar con facilidad los genes individuales de los cromosomas humanos específicos. (D'Eustachio, P. et al. (1983) Science 220:919-924). Se pueden producir asimismo híbridos de células somáticas que contengan únicamente fragmentos de cromosomas humanos utilizando cromosomas humanos con translocaciones y deleciones.

La cartografía por PCR de híbridos de células somáticas es un procedimiento rápido para asignar una secuencia particular a un cromosoma particular. Se pueden asignar tres o más secuencias por día utilizando un único termociclador. Con la utilización de secuencias de nucleótidos B7-4 para diseñar cebadores de oligonucleótidos, se puede realizar la sublocalización con paneles de fragmentos de cromosomas específicos. Otras estrategias de cartografía que se pueden utilizar de un modo similar para cartografiar una secuencia en su cromosoma comprenden la hibridación *in situ* (descrita en Fan, Y. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6223-27), realizando una identificación sistemática previa con cromosomas marcados por separación de flujo y seleccionados previamente por hibridación con genotecas de ADNc específicas de los cromosomas.

Se puede utilizar además la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) de una secuencia de ADN hasta una extensión cromosómica en metafase para proporcionar una localización cromosómica precisa en una etapa. Se pueden realizar las extensiones de cromosomas utilizando células cuya división se ha bloqueado en metafase mediante un producto químico tal como colcemid que interrumpe el huso mitótico. Se pueden tratar brevemente los cromosomas con tripsina y teñir a continuación con Giemsa. Se desarrolla una pauta de bandas claras y oscuras en cada cromosoma, de tal modo que los cromosomas se pueden identificar individualmente. La técnica FISH se puede utilizar con una secuencia de ADN de tan solo 500 o 600 bases. Sin embargo, los clones de más de 1.000 bases presentan una mayor probabilidad de unirse a una ubicación cromosómica única con una intensidad de señal suficiente para una detección simple. Preferentemente 1.000 bases y más preferentemente 2.000 bases resultarán suficientes para obtener unos buenos resultados en un plazo razonable de tiempo. Para una revisión de esta técnica, véase Verma et al., Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (Pergamon Press, New York 1988).

Se pueden utilizar reactivos para realizar la cartografía cromosómica individualmente para marcar un único cromosoma o un único sitio de dicho cromosoma, o se pueden utilizar paneles de reactivos para marcar una pluralidad de sitios y/o una pluralidad de cromosomas. Los reactivos correspondientes a las regiones no codificantes de los genes son en realidad los preferidos para realizar la cartografía. Es más probable que se conserven las secuencias codificantes dentro de las familias de genes, aumentando de este modo la posibilidad de hibridaciones cruzadas durante la cartografía cromosómica.

Una vez se ha cartografiado una secuencia en una ubicación cromosómica precisa, se puede correlacionar la posición física de la secuencia en el cromosoma con los datos de la cartografía genética. (Dichos datos se encuentran, por ejemplo, en McKusick, V., Mendelian Inheritance in Man, disponible en línea en la Johns Hopkins University Welch Medical Library). Se puede identificar la relación entre un gen y una enfermedad, cartografiado en la misma región cromosómica, mediante el análisis de ligamiento (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes), descrito, por ejemplo, en Egeland, J. et al. (1987) Nature 325:783-787.

Además, se pueden determinar las diferencias en las secuencias de ADN entre pacientes afectados y no afectados con una enfermedad relacionada con el gen de la B7-4. Si se observa una mutación en algunos o todos los pacientes afectados pero no en los pacientes no afectados, es probable que la mutación se trate del agente causante de la enfermedad particular. La comparación entre pacientes afectados y no afectados implica generalmente buscar en primer lugar alteraciones estructurales en los cromosomas, tales como deleciones o translocaciones, que son visibles en extensiones de cromosomas o detectables utilizando una PCR basada en dicha secuencia de ADN. Por último, se puede realizar la secuenciación completa de los genes de diversos pacientes para confirmar la presencia de una mutación y para distinguir las mutaciones de los polimorfismos.

2. Tipificación de tejidos

Las secuencias de la B7-4 de la presente invención se pueden utilizar asimismo para identificar personas a partir de muestras biológicas reducidas. En el ejército de los Estados Unidos, por ejemplo, se está considerando la utilización del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En dicha técnica, se digiere el ADN genómico de una persona con una o más enzimas de restricción y se somete a inmunotransferencia de tipo Southern para producir bandas únicas de identificación. Este procedimiento no adolece de las limitaciones actuales de las "placas de identidad", que se pueden perder, intercambiar o robar, lo que dificulta una identificación positiva. Las secuencias de la presente invención resultan útiles como marcadores de ADN adicionales para el RFLP (descrito en la patente US 5.272.057).

Además, se pueden utilizar las secuencias de la presente descripción para proporcionar una técnica alternativa que determine la secuencia real del ADN base a base de partes seleccionadas del genoma de una persona. Por lo tanto, se pueden utilizar las secuencias de nucleótidos de B7-4 descritas en el presente documento para preparar dos cebadores de PCR desde los extremos 5' y 3' de las secuencias. A continuación se pueden utilizar dichos cebadores para amplificar el ADN de una persona y posteriormente secuenciarlo.

Los paneles de secuencias de ADN correspondientes de personas, preparadas de este modo, pueden proporcionar identificaciones individuales únicas, ya que cada persona presentará un conjunto singular de dichas secuencias de ADN debido a las diferencias alélicas. Se pueden utilizar las secuencias de la presente descripción para obtener dichas secuencias de identificación de personas y de tejidos. Las secuencias de nucleótidos de la B7-4 de la presente invención representan únicamente partes del genoma humano. La variación alélica se produce en cierto grado en las regiones codificantes de dichas secuencias y, en mayor grado, en las regiones no codificantes. Se estima que la variación alélica entre seres humanos individuales se produce con una frecuencia de aproximadamente una por cada 500 bases. Cada una de las secuencias descritas en la presente memoria puede, en cierto grado, utilizarse como modelo con el que se puede comparar el ADN de una persona para su identificación. Debido a que el mayor número de polimorfismos se produce en las regiones no codificantes, son necesarias menos secuencias para diferenciar personas. Las secuencias no codificantes de SEC ID N.º 1 o 3 pueden proporcionar cómodamente una identificación individual positiva con un panel de aproximadamente 10 a 1.000 cebadores que producen, cada uno, una secuencia amplificada no codificante de 100 bases. Si se utilizan secuencias de codificación predichas, un número más apropiado de cebadores para la identificación individual positiva sería de 500 a 2.000.

Si se utiliza un panel de reactivos de secuencias de nucleótidos de la B7-4 descritos en la presente memoria para generar una base de datos de identificación única para una persona, estos mismos reactivos se pueden utilizar posteriormente para identificar el tejido de dicho individuo. Utilizando la base de datos de identificación singular, se puede realizar una identificación positiva del individuo, vivo o muerto, con muestras tisulares muy pequeñas.

3. Utilización de secuencias parciales de B7-4 en biología forense

Se pueden utilizar asimismo técnicas de identificación basadas en el ADN en biología forense. La biología forense es un campo científico que emplea la tipificación genética de pruebas biológicas encontradas en la escena del crimen como medio para identificar positivamente, por ejemplo, el autor de un delito. Para realizar dicha identificación, se puede utilizar la tecnología de la PCR para amplificar secuencias de ADN tomadas a partir de muestras biológicas muy pequeñas tales como tejidos, por ejemplo, pelo o piel, o fluidos corporales, por ejemplo, sangre, saliva o semen encontrados en la escena de un crimen. A continuación se puede comparar la secuencia amplificada con un modelo, lo que permite de este modo identificar el origen de la muestra biológica.

Se pueden utilizar las secuencias de la presente invención para proporcionar reactivos de polinucleótidos, por ejemplo, cebadores de la PCR, dirigidos a locus específicos en el genoma humano, lo que puede mejorar la fiabilidad de las identificaciones forenses basadas en el ADN, por ejemplo, proporcionando otro "marcador de identificación" (es decir, otra secuencia de ADN que es singular para una persona en particular). Tal como se ha mencionado anteriormente, la información real de la secuencia de bases se puede utilizar en la identificación como alternativa precisa a los patrones formados por fragmentos generados por enzimas de restricción. Las secuencias dirigidas a regiones no codificantes resultan particularmente apropiadas para este uso ya que se produce un número superior de polimorfismos en las regiones no codificantes, lo que facilita diferenciar personas utilizando esta técnica. Los ejemplos de reactivos de polinucleótidos comprenden las secuencias de nucleótidos de B7-4 o partes de las mismas que presentan una longitud de por lo menos 20 bases, preferentemente por lo menos 30 bases.

Se pueden utilizar asimismo las secuencias de nucleótidos de la B7-4 descritas en la presente memoria para proporcionar reactivos de polinucleótidos, por ejemplo, sondas marcadas o marcables que se pueden utilizar en, por ejemplo, una técnica de hibridación *in situ*, para identificar un tejido específico, por ejemplo, tejido cerebral. Ello puede resultar muy útil en los casos en los que un patólogo forense se enfrenta a un tejido de origen desconocido. Se pueden utilizar los paneles de dichas sondas de la B7-4 para identificar el tejido según la especie y/o según el tipo de órgano.

De un modo similar, se pueden utilizar dichos reactivos, por ejemplo, cebadores o sondas de la B7-4 para realizar la identificación sistemática en cultivos de tejidos con respecto a la contaminación (es decir, identificar la presencia de una mezcla de distintos tipos celulares en un cultivo).

G. Medicina predictiva

La presente descripción se refiere asimismo al campo de la medicina predictiva en la que se utilizan pruebas de diagnóstico, pruebas de pronóstico y el seguimiento de pruebas clínicas para realizar pronósticos (predictivos) y de este modo tratar preventivamente un paciente. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a pruebas de diagnóstico para determinar la expresión de la proteína y/o del ácido nucleico de B7-4 o PD-1 así como la actividad de B7-4 o PD-1, en relación con una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células, tejidos) a fin de determinar de este modo si un paciente padece una enfermedad o trastorno, o se encuentra en riesgo de desarrollar un trastorno, relacionado con una expresión o actividad anómala de la B7-4 o el PD-1. La presente invención proporciona asimismo unas pruebas de pronóstico (o predictivos) para determinar si un paciente se encuentra en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la expresión o la actividad del ácido nucleico de la proteína B7-4 o PD-1. Por ejemplo, se pueden analizar las mutaciones en un gen de B7-4 o PD-1 en una muestra biológica. Se pueden utilizar dichas pruebas para realizar pronósticos o con fines predictivos para tratar de este modo preventivamente un paciente antes de que se inicie un trastorno caracterizado por, o asociado a, la expresión o la actividad del ácido nucleico de la proteína B7-4 o PD-1. Se pueden utilizar asimismo las pruebas descritas en la presente memoria, tales como las pruebas de diagnóstico anteriores o las pruebas siguientes para detectar la tendencia a tener abortos espontáneos.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al seguimiento de la influencia de determinadas sustancias (por ejemplo, fármacos, compuestos) en la expresión o la actividad de la B7-4 o del PD-1 en las pruebas clínicas.

Estas y otras sustancias se describirán más detalladamente en los apartados siguientes.

1. Pruebas de diagnóstico

Un ejemplo de procedimiento para detectar la presencia o falta de la proteína o el ácido nucleico de B7-4 o PD-1 o en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un paciente al que se realiza la prueba y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o sustancia capaz de detectar proteína de B7-4 o PD-1 o el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) que codifica la proteína B7-4 o PD-1 de tal modo que se detecta la presencia de la proteína o del ácido nucleico de B7-4 o PD-1 en la muestra biológica. Una sustancia preferida para detectar el ARNm o ADN genómico de B7-4 o PD-1 es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridarse con el ARNm o DNA genómico de B7-4 o PD-1. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ácido nucleico humano de B7-4 o PD-1, tal como el ácido nucleico de SEC ID N.º 1, 3, 10 u 11 o una región del

mismo, tal como un oligonucleótido de por lo menos 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en unas condiciones estrictas con el ARNm o DNA genómico de B7-4 o PD-1. Otras sondas aptas para utilizar en las pruebas de diagnóstico de la presente invención se describen en la presente memoria.

5 Una sustancia preferida para detectar la proteína B7-4 o PD-1 es un anticuerpo capaz de unirse a la proteína B7-4 o PD-1, preferentemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, más preferentemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende comprender el marcado directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, unión física) entre una sustancia detectable y la sonda o anticuerpo, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de marcado indirecto comprenden la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado terminal de una sonda de ADN con biotina de tal modo que se pueda detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia. Se pretende que el término "muestra biológica" comprenda tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un paciente, así como tejidos, células y fluidos presentes en un paciente. Es decir, se puede utilizar el procedimiento de detección de la presente invención para detectar ARNm, proteína o ADN genómico de B7-4 o PD-1 en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para detectar ARNm de B7-4 o PD-1 comprenden hibridaciones de tipo Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para detectar la proteína B7-4 o PD-1 comprenden pruebas de inmunoabsorción enzimática (ELISA), inmunotransferencias de tipo Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para detectar el ADN genómico de B7-4 o PD-1 comprenden hibridaciones de tipo Southern. Además, las técnicas *in vivo* para detectar la proteína B7-4 o PD-1 comprenden introducir en un paciente un anticuerpo marcado anti-B7-4 o PD-1. Por ejemplo, se puede marcar el anticuerpo con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un paciente se pueda detectar mediante técnicas estándar de formación de imágenes.

En una forma de realización, la muestra biológica contiene moléculas de proteína del paciente de la prueba. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del paciente de la prueba o moléculas de ADN genómico del paciente de la prueba. Una muestra biológica preferida es una muestra de suero aislado por medios convencionales a partir de un paciente.

En una forma de realización adicional, los procedimientos implican además obtener una muestra biológica de control de un paciente de control, poner en contacto la muestra de control con un compuesto o sustancia capaz de detectar la proteína, ARNm, o ADN genómico de B7-4 o PD-1, de tal modo que la presencia de la proteína, ARNm, o ADN genómico de B7-4 o PD-1 se detecta en la muestra biológica, y comparar la presencia de la proteína, ARNm, o ADN genómico de B7-4 o PD-1 de la muestra de control con la presencia de la proteína, ARNm, o ADN genómico de B7-4 o PD-1 de la muestra de la prueba.

La presente invención comprende asimismo kits para detectar la presencia de B7-4 o PD-1 en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o sustancia capaz de detectar la proteína o ARNm de B7-4 o PD-1 en una muestra biológica marcada; medios para determinar la cantidad de B7-4 o PD-1 en la muestra; y medios para comparar la cantidad de B7-4 o PD-1 en la muestra con un modelo. Se puede envasar el compuesto o sustancia en un recipiente apto. El kit puede comprender además las instrucciones de uso del kit para detectar la proteína o el ácido nucleico de B7-4 o PD-1.

45 2.Pruebas de pronóstico

Se pueden utilizar además los procedimientos de diagnóstico descritos en la presente memoria para identificar pacientes que padezcan o se encuentren en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno relacionado con una expresión o actividad anómala de la B7-4 o del PD-1. Por ejemplo, se pueden utilizar las pruebas descritas en la presente memoria, tales como las pruebas de diagnóstico anteriores o las pruebas siguientes, para identificar un paciente que padece o se encuentra en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la expresión o la actividad de la proteína B7-4 o PD-1. De este modo, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar una enfermedad o trastorno relacionado con la expresión o la actividad anómala de la proteína B7-4 o PD-1 en el que se obtiene una muestra de prueba de un paciente y se detecta la proteína o el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) de B7-4 o PD-1, en el que la presencia de la proteína o ácido nucleico de B7-4 o PD-1 constituye un diagnóstico en relación con un paciente que padece o se encuentra en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno relacionado con una expresión o actividad anómala de B7-4 o PD-1. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "muestra de prueba" se refiere a una muestra biológica obtenida de un paciente de interés. Por ejemplo, una muestra de prueba puede ser un fluido biológico (por ejemplo, suero), muestra celular o tejido.

Además, se pueden utilizar las pruebas de pronóstico descritas en la presente memoria para determinar si se puede administrar a un paciente una sustancia (por ejemplo, un agonista, antagonista, mimético peptídico, proteína,

péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con una expresión o actividad anómala de B7-4 o PD-1. De este modo, la presente invención proporciona unos procedimientos para determinar si puede tratarse eficazmente un paciente con una sustancia para un trastorno relacionado con una expresión o actividad anómala de B7-4 o PD-1 en la que se obtiene una muestra de prueba y se detecta la expresión o actividad de la proteína o del ácido nucleico de B7-4 o PD-1 (por ejemplo, en el que el nivel de expresión o actividad de la proteína o del ácido nucleico de B7-4 o PD-1 constituye un diagnóstico para un paciente al que se puede administrar la sustancia para tratar un trastorno relacionado con una expresión o actividad anómala de B7-4 o PD-1).

Se pueden utilizar asimismo los procedimientos de la presente invención para detectar alteraciones genéticas en un gen de B7-4 o PD-1, determinando con ello si un paciente con el gen alterado se encuentra en riesgo de padecer un trastorno relacionado con el gen de B7-4 o PD-1. En unas formas de realización preferidas, los procedimientos comprenden detectar, en una muestra de células del paciente, la presencia o falta de una alteración genética caracterizada por al menos una de una alteración que afecta a la integridad de un gen que codifica una proteína B7-4 o PD-1 o la mala expresión del gen de B7-4 o PD-1. Por ejemplo, se pueden detectar dichas alteraciones genéticas determinando la existencia de por lo menos uno de 1) una delección de uno o más nucleótidos de un gen de B7-4 o PD-1; 2) una adición de uno o más nucleótidos a un gen de B7-4 o PD-1; 3) una sustitución de uno o más nucleótidos de un gen de B7-4 o PD-1, 4) un reordenamiento cromosómico de un gen de B7-4 o PD-1; 5) una alteración en el nivel de un transcrito de ARN mensajero de un gen de B7-4 o PD-1, 6) la modificación anómala de un gen de B7-4 o PD-1, tal como de la pauta de metilación del ADN genómico, 7) la presencia de una pauta de tipo de corte y empalme no natural de un transcrito de ARN mensajero de un gen de B7-4 o PD-1, 8) un nivel de tipo no natural de una proteína B7-4 o PD-1, 9) la pérdida alélica de un gen de B7-4 o PD-1, y 10) la modificación inapropiada posterior a la traducción de una proteína B7-4 o PD-1. Tal como se describe en la presente memoria, existe un gran número de procedimientos de prueba conocidos en la técnica que se pueden utilizar para detectar alteraciones en un gen de B7-4 o PD-1. Una muestra biológica preferida es una muestra de tejido o suero aislada por medios convencionales de un paciente, por ejemplo, una muestra de tejido cardíaco.

En ciertas formas de realización, la detección de la alteración implica utilizar una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véanse, por ejemplo, las patentes US n.º 4.683.195 y 4.683.202), tal como PCR anclada o PCR RACE o, alternativamente, en una reacción en cadena de la ligación (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran et al. (1988) *Science* 241:1077-1080; y Nakazawa et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), pudiendo resultar particularmente útil este último para detectar mutaciones puntuales en el gen de B7-4 o PD-1 (véase Abravaya et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). Este procedimiento puede comprender las etapas de recoger una muestra de células de un paciente, aislar el ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que se hibridan específicamente con un gen de B7-4 o PD-1 en unas condiciones tales que se produce la hibridación y la amplificación del gen B7-4 o PD-1 (si se encuentra presente), y detectar la presencia o falta de un producto de la amplificación, o detectar el tamaño del producto de la amplificación y comparar la longitud con la de una muestra de control. Se prevé que resulte ventajoso utilizar la PCR y/o LCR como etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas utilizadas para detectar mutaciones descritas en la presente memoria.

Los procedimientos de amplificación alternativos comprenden: la replicación de la secuencia autosostenida (Guatelli, J.C. et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), el sistema de amplificación de la transcripción (Kwoh, D. Y. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), la Q- β -replicasa (Lizardi, P. M. et al. (1988) *Biotechnology* 6:1197), o cualquier otro procedimiento de amplificación del ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas muy conocidas por los expertos en la materia. Dichos esquemas de detección resultan especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas se encuentran presentes en números muy bajos.

En una forma de realización alternativa, se pueden identificar las mutaciones en un gen B7-4 o PD-1 a partir de una célula de muestra mediante las alteraciones en las pautas de escisión de la enzima de restricción. Por ejemplo, se aísla ADN de la muestra y del control, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de longitud de los fragmentos mediante electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias de los tamaños de longitud de fragmentos entre el ADN de la muestra y el de control indican mutaciones en el ADN de la muestra. Además, el uso de ribozimas específicas de la secuencia (véase, por ejemplo, la patente US n.º 5.498.531) se puede utilizar para indicar la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de escisión de ribozimas.

En unas formas de realización adicionales, se pueden identificar las mutaciones genéticas en B7-4 o PD-1 hibridando los ácidos nucleicos de una muestra y de un control, por ejemplo ADN o ARN, con matrices de alta densidad que contengan cientos o miles de sondas de oligonucleótidos (Cronin, M. T. et al. (1996) *Hum. Mutat.* 7:244-255; Kozal, M. J. et al. (1996) *Nat. Med.* 2:753-759). Por ejemplo, se pueden identificar mutaciones genéticas en B7-4 o PD-1 en matrices bidimensionales que contengan sondas de ADN generadas con luz tal como se describe

5 en Cronin, M. T. et al. (1996) *supra*. En pocas palabras, se puede utilizar una primera matriz de hibridación de sondas para explorar largos tramos de ADN de una muestra y del control para identificar cambios en las bases entre las secuencias realizando matrices lineales de sondas superpuestas secuenciales. Esta etapa permite la identificación de mutaciones puntuales. Tras esta etapa se realiza una segunda matriz de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas utilizando matrices de sondas especializadas más pequeñas complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutación comprende conjuntos de sondas paralelas, una complementaria al gen natural y la otra complementaria al gen mutante.

10 En otra forma de realización adicional, se puede utilizar cualquiera de una serie de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el gen de B7-4 o PD-1 y detectar mutaciones comparando la secuencia de la muestra de B7-4 o PD-1 con la secuencia de tipo natural correspondiente (control). Los ejemplos de reacciones de secuenciación comprenden las basadas en técnicas desarrolladas por Maxam and Gilbert ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560) o Sanger ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463). Se prevé asimismo que se pueda utilizar cualquiera de una serie de procedimientos de secuenciación automatizados cuando se realizan las pruebas de diagnóstico ((1995) *Biotechniques* 19:448), comprendiendo la secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, la publicación Internacional PCT n.º WO 94/16101; Cohen et al. (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; y Griffin et al. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

20 Otros procedimientos para detectar mutaciones en el gen de B7-4 o PD-1 comprenden métodos en los que se utiliza la protección de sustancias de escisión para detectar bases mal apareadas en ARN/ARN o ARN/heterodúplex de ADN (Myers et al. (1985) *Science* 230:1242). En general, la técnica de "escisión por apareamiento incorrecto" comienza proporcionando heterodúplex formados hibridando ARN o ADN (marcados) que contiene la secuencia de tipo natural de B7-4 o PD-1 con ARN o ADN potencialmente mutante obtenido de una muestra de tejido. Los dúplex bicatenarios se tratan con una sustancia que escinde regiones monocatenarias del dúplex tales como las que existirán debido a los apareamientos incorrectos de pares de bases entre el control y las cadenas de muestra. Por ejemplo, se pueden tratar los dúplex de ARN/ADN con ARNasa y se pueden tratar los híbridos de ADN/ADN tratados con nucleasa S1 para digerir enzimáticamente las regiones con apareamientos incorrectos. En otras formas de realización, se pueden tratar los dúplex de tanto ADN/ADN como ARN/ADN con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina para digerir regiones con apareamiento incorrecto. Tras la digestión de las regiones con apareamiento incorrecto, se separa el material resultante según el tamaño en geles de poliacrilamida desnaturizantes para determinar el sitio de la mutación. Véase, por ejemplo, Cotton et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba et al. (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. En una forma de realización preferida, se puede marcar el ADN o ARN de control para su detección.

35 En otra forma de realización adicional, la reacción de escisión del apareamiento incorrecto utiliza una o más proteínas que reconocen pares de bases apareados incorrectamente en el ADN bicatenario (denominados "enzimas de reparación de apareamientos incorrectos del ADN") en sistemas definidos para detectar y cartografiar puntos de mutaciones en el ADNc de B7-4 o PD-1 obtenidos a partir de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde la A en los apareamientos incorrectos G/A y la timidina ADN glucosilasa de células HeLa escinde la T en los apareamientos incorrectos G/T (Hsu et al. (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). Según un ejemplo de forma de realización, una sonda basada en una secuencia de B7-4, por ejemplo, una de secuencia de B7-4 o PD-1 natural, se hibrida a un ADNc u otro producto de ADN de una(s) célula(s) de prueba. El dúplex se trata con una enzima de reparación de apareamientos incorrectos del ADN y se puede detectar los productos de la escisión, si existen, a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la patente US n.º 5.459.039.

45 En otras formas de realización, se pueden utilizar las alteraciones en la movilidad electroforética para identificar mutaciones en los genes B7-4 o PD-1. Por ejemplo, se puede utilizar el polimorfismo en la conformación monocatenaria (SSCP) para detectar las diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y naturales (Orita et al. (1989) *Proc Natl. Acad. Sci. USA*: 86:2766, véase asimismo Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; y Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Los fragmentos monocatenarios de ADN de los ácidos nucleicos de B7-4 o PD-1 de la muestra y del control se pueden desnaturizar y dejar renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía en función de la secuencia y la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un único cambio de base. Se pueden marcar o detectar los fragmentos de ADN con sondas marcadas. Se puede potenciar la sensibilidad de la prueba utilizando un ARN (en vez de ADN), en el que la estructura secundaria sea más sensible a un cambio en la secuencia. En una forma de realización preferida, el procedimiento en cuestión utiliza el análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias basándose en los cambios en la movilidad electroforética (Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7:5).

60 En otra forma de realización adicional, se analiza el movimiento de fragmentos naturales o mutantes en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturizante utilizando electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE) (Myers et al. (1985) *Nature* 313:495). Cuando se utiliza la DGGE como procedimiento de análisis, se puede modificar el ADN para garantizar que no se desnaturiza completamente, por ejemplo, añadiendo una

bloqueo de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alta fusión por PCR. En una forma de realización adicional, se utiliza un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturante para identificar las diferencias en la movilidad del control y de la muestra de ADN (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:12753).

5 Los ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales comprenden, pero sin limitarse a las mismas, la hibridación selectiva de oligonucleótidos, la amplificación selectiva o la extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores de oligonucleótidos en los que se dispone céntricamente la mutación conocida y a continuación se hibridan con el ADN diana en unas condiciones que permiten la hibridación únicamente si se encuentra una coincidencia perfecta (Saiki et al. (1986) Nature); Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230). Dichos oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con el ADN diana amplificado por PCR o diversas mutaciones distintas cuando los oligonucleótidos se encuentran unidos a la membrana de hibridación y se hibridan con el ADN diana marcado.

15 Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación selectiva por PCR junto con la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés al centro de la molécula (de tal modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador en el que, en unas condiciones apropiadas, se puede prevenir el apareamiento incorrecto o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner et al. (1993) Tibtech 11:238). Además, se puede pretender introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear una detección basada en la escisión (Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6:1). Se prevé que en ciertas formas de realización la amplificación se puede realizar asimismo utilizando la Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189). En dichos casos, la ligación se produce únicamente si se produce un apareamiento perfecto en el extremo de la 3' de la secuencia 5', lo que permite detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o falta de amplificación.

Se pueden realizar los procedimientos descritos en la presente memoria, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico preenvasados que comprenden por lo menos una sonda de ácido nucleico o reactivo de anticuerpo descrito en la presente memoria, que se puede utilizar convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos para diagnosticar pacientes que presentan síntomas o antecedentes familiares de una enfermedad o dolencia que implica un gen de B7-4 o PD-1.

Además, en las pruebas de pronóstico descritas en la presente memoria, se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido en el que se expresen B7-4 o PD-1.

VII. Administración de sustancias moduladoras de B7-4 o PD-1

Las sustancias moduladoras de B7-4 o PD-1 de la presente invención se administran a los pacientes en una forma biológicamente compatible apta para la administración farmacéutica *in vivo* para mejorar o suprimir las respuestas inmunitarias en las que intervienen inmunocitos. El concepto "forma biológicamente compatible apta para la administración *in vivo*" significa una forma de la proteína para administrar en la que cualquier efecto tóxico se ve compensado por los efectos terapéuticos de la proteína. Se pretende que el término paciente comprenda organismos vivos en los que provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, mamíferos. Los ejemplos de pacientes comprenden seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. La administración de una sustancia tal como se describe en la presente memoria se puede realizar en cualquier forma farmacológica que comprenda una cantidad terapéuticamente activo de una sustancia sola o combinada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones terapéuticas de la presente invención se define como una cantidad efectiva, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado pretendido. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido B7-4 o PD-1 puede variar en función de factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del péptido para provocar la respuesta pretendida en el paciente. Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis fraccionadas o se puede reducir proporcionalmente la dosis según sea indicado en función de las exigencias de la situación terapéutica.

La sustancia moduladora de B7-4 o PD-1 (por ejemplo, un péptido, una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo, un mimético peptídico o una molécula pequeña) se puede administrar de un modo conveniente, por ejemplo, mediante inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica o administración rectal. En función de la vía de administración, se puede recubrir el principio activo con un material para proteger el compuesto ante la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el

compuesto. Por ejemplo, para administrar una sustancia moduladora de B7-4 o PD-1 mediante una administración distinta de la parenteral, se puede pretender recubrir el péptido con, o administrar conjuntamente el péptido con, un cierto material para evitar su inactivación.

5 Se puede administrar una sustancia moduladora de B7-4 o PD-1 a un paciente en un vehículo, diluyente o potenciador apropiado, administrarla conjuntamente con inhibidores de enzimáticos o en un vehículo apto tal como los liposomas. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables comprenden la disolución salina y las disoluciones amortiguadoras acuosas. Se utiliza el término potenciador en su sentido más amplio comprende cualquier compuesto estimulante inmunitario tal como el interferón. Los potenciadores contemplados en la presente memoria
10 comprenden resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como éter oleílico de polioxietileno y éter de n-hexadecilopolietileno. Los inhibidores enzimáticos comprender inhibidores de la tripsina pancreática, diisopropilfluofosfato (DEEP) y trasilol. Los liposomas comprenden emulsiones de agua-en-aceite-en-agua así como liposomas convencionales (Sterna et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

15 Se puede administrar asimismo el principio activo por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones se pueden preparar también en glicerol, macrogles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En unas condiciones normales de almacenamiento y uso, dichas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

20 Las composiciones farmacéuticas aptas para uso inyectable comprenden disoluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para realizar soluciones o dispersiones inyectables estériles sin preparación. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que se pueda inyectar con facilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar ante la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente
25 o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y macrogol líquido, y similares), y mezclas aptas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, utilizando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y utilizando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede realizar mediante diversos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, se prefiere incorporar en la composición isotónica, por ejemplo, azúcares, polialcoholes
30 tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico. Se puede provocar la absorción prolongada de las composiciones inyectables incorporando en la composición un retardante de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando el principio activo (por ejemplo, un polipéptido B7-4 o PD-1) en la cantidad requerida en un disolvente apto con uno o una combinación de los ingredientes indicados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los indicados anteriormente. En el caso los de polvos estériles para la
40 preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del principio activo (por ejemplo, un péptido) más cualquier ingrediente adicional pretendido de una solución estéril filtrada previamente del mismo.

45 Cuando el principio activo se protege adecuadamente, tal como se ha descrito anteriormente, se puede administrar la proteína por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible digestible. Tal como se utiliza en la presente memoria "vehículo farmacéuticamente aceptable" comprende cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibacterianos y antifúngicos, retardantes de la isotonicidad y de la absorción, y similares. Resulta muy conocida en la técnica la utilización de dichos medios y sustancias como principios farmacéuticamente activos. Excepto en la medida en que cualquier medio o sustancia convencional sea
50 incompatible con el compuesto activo, se contempla su utilización en las composiciones terapéuticas. Se pueden incorporar asimismo en las composiciones principios activos complementarios.

Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma dosis unitaria para facilitar su administración y uniformidad de dosificación. La formulación en dosis unitaria tal como se utiliza en la presente
55 memoria se refiere a unidades físicamente discretas aptas como dosificaciones unitarias para los pacientes mamíferos que se deben tratar; cada unidad comprende una cantidad predeterminada del principio activo calculada para producir el efecto terapéutico pretendido junto con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las dosis unitarias de la presente invención viene estipulada por, y depende directamente de, (a) las características únicas del principio activo y el efecto terapéutico particular que se pretende conseguir, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica para preparar dicho principio activo para el tratamiento de la sensibilidad de los pacientes.
60

En una forma de realización de la presente invención se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo contra una proteína B7-4 o PD-1 a un paciente. Tal como se define en la presente memoria, una cantidad

5 terapéuticamente efectiva de anticuerpos (es decir, una dosificación efectiva) se encuentra comprendida entre aproximadamente 0,001 y 30 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,01 y 25 mg/kg de peso corporal, más preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, e incluso más preferentemente entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg, 2 y 9 mg/kg, 3 y 8 mg/kg, 4 y 7 mg/kg, o 5 y 6 mg/kg de peso corporal. Los expertos en la materia apreciarán que ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar efectivamente un paciente, comprendiendo pero sin limitarse a los mismos la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, el estado de salud general y/o la edad del paciente, y la presencia de otras enfermedades. Además, el tratamiento de un paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo puede comprender un único tratamiento o, preferentemente, puede comprender una pluralidad de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata un paciente con anticuerpos en un intervalo comprendido entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. Se podrá apreciar asimismo que la dosis efectiva de anticuerpo utilizado en el tratamiento puede aumentar o disminuir durante un tratamiento particular. Los cambios en la dosificación pueden ser el resultado de los resultados de las pruebas de diagnóstico tal como se describen en la presente memoria.

20 El seguimiento de la influencia de determinadas sustancias (por ejemplo, fármacos, compuestos) en la expresión o la actividad de la B7-4 o del PD-1 se puede aplicar no únicamente en la identificación sistemática básica de los fármacos, sino asimismo en las pruebas clínicas. Por ejemplo, se puede realizar el seguimiento de la efectividad de una sustancia determinada mediante una identificación sistemática tal como se describe en la presente memoria con respecto al aumento de la expresión génica de B7-4 o PD-1, los niveles proteicos o la regulación por aumento de la actividad de B7-4 o PD-1, en las pruebas clínicas de pacientes que presenten una disminución de la expresión génica de B7-4 o PD-1, los niveles proteicos o una regulación por disminución de la actividad de B7-4 o PD-1. Alternativamente, se puede realizar el seguimiento de la efectividad de una sustancia determinada mediante una identificación sistemática con respecto a la disminución de la expresión génica de B7-4 o PD-1, los niveles proteicos o la regulación por disminución de la actividad de B7-4 o PD-1, en las pruebas clínicas de pacientes que presenten un aumento de la expresión génica de B7-4 o PD-1, los niveles proteicos o una regulación por aumento de la actividad de B7-4 o PD-1. En dichas pruebas clínicas, la expresión o la actividad de un gen de B7-4 o PD-1, y preferentemente, de otros genes que se encuentran implicados en un trastorno se pueden utilizar como "lectura" o marcadores del fenotipo de una célula particular.

35 Por ejemplo, y sin que constituya limitación alguna, se pueden identificar genes, entre ellos los de B7-4 o PD-1, que se modulan en células mediante el tratamiento con una sustancia (por ejemplo, un compuesto, un fármaco o una molécula pequeña) que modula la actividad de B7-4 o PD-1 (por ejemplo, identificada en una prueba de identificación sistemática como se describe en la presente memoria). De este modo, para estudiar el efecto de las sustancias en un trastorno relacionado con la B7-4 o el PD-1, por ejemplo, en una prueba clínica, se pueden aislar las células y preparar ARN y realizar un análisis con respecto a los niveles de expresión de B7-4 o PD-1 y otros genes implicados en el trastorno relacionado con la B7-4 o el PD-1, respectivamente. Se pueden cuantificar los niveles de expresión génica (es decir, la pauta de expresión génica) mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Northern o RT-PCR, tal como se describe en la presente memoria o, alternativamente, midiendo la cantidad de proteína producida, mediante uno de los procedimientos descritos en la presente memoria, o midiendo los niveles de la actividad de B7-4 o PD-1 u otros genes. De este modo, la pauta de expresión génica puede servir como marcador, indicativo de la respuesta fisiológica de las células a la sustancia. Por consiguiente, se puede determinar este estado de respuesta antes, y en diversos puntos durante el tratamiento del paciente con la sustancia.

50 En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para realizar el seguimiento de la efectividad del tratamiento de un paciente con una sustancia (por ejemplo, un agonista, antagonista, mimético peptídico, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato identificado mediante las pruebas de identificación sistemática descritas en la presente memoria) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra previa a la administración de un paciente antes de la administración de la sustancia; (ii) detectar el nivel de expresión de una proteína, ARNm o ADN genómico de B7-4 o PD-1, en la muestra previa a la administración; (iii) obtener del paciente una o más muestras posteriores a la administración; (iv) detectar el nivel de expresión o actividad de la proteína, ARNm o ADN genómico de B7-4 o PD-1 en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de la proteína, ARNm o ADN genómico de B7-4 o PD-1 en la muestra previa a la administración con la proteína, ARNm o ADN genómico de B7-4 o PD-1 en la(s) muestra(s) posterior(es) a la administración; y (vi) ajustar la administración de la sustancia al paciente en consecuencia. Por ejemplo, se puede pretender aumentar la administración de la sustancia a fin de aumentar la expresión o la actividad de la B7-4 o del PD-1 hasta unos niveles más elevados que los detectados, es decir, para aumentar la efectividad de la sustancia. Alternativamente, se puede pretender disminuir la administración de la sustancia a fin de disminuir la expresión o la actividad de la B7-4 o del PD-1 hasta unos niveles inferiores que los detectados, es decir, para disminuir la efectividad de la sustancia. Según una forma de realización de este tipo, se

pueden utilizar la expresión o actividad de B7-4 o PD-1 como indicador de la eficacia de una sustancia, incluso a falta de una respuesta fenotípica observable.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no deben interpretarse como limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento de moléculas de ADNc de B7-4.

Se utilizó la secuencia de la proteína del dominio extracelular de B7-1 humana para buscar en las bases de datos públicas las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos homólogos. Se identificaron dos secuencias superpuestas en la base de datos EST, AA292201 y AA399416. Se utilizaron dichas secuencias para aislar la longitud completa del ADNc de B7-4 a partir de genotecas de queratinocitos humanos activados y de genotecas de ADNc placentario del siguiente modo.

Se sintetizaron oligonucleótidos con la secuencia 5'-CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAA-3' (SEC ID N.º 5) y 5'-AGGTGCTAGGGGACAGTGTTAGACA-3' (SEC ID N.º 6) a partir de dichas EST. Se utilizaron dichos oligonucleótidos para cebar una reacción de PCR utilizando como plantilla ADNc preparado mediante transcripción inversa del ARNm a partir del bazo de un caso de linfoma folicular, linfocitos B activadas, queratinocitos activados INF- γ , bazo normal y placenta. Las condiciones fueron 94 °C, 1 min; 94 °C, 30 seg, 56 °C, 30 seg, 68 °C, 1 min durante 35 ciclos; 68 °C, 3 min, manteniéndose a 4 °C. Todas las plantillas proporcionaron una banda del tamaño esperado de 389 pb. Se purificó el producto de 389 pb de la PCR de los queratinocitos activados INF- γ mediante electroforesis en gel de agarosa y se utilizaron 0,12 ng como plantilla en una reacción de PCR que contenía biotina-21-dUTP 0,05 mM y los cebadores anteriores. Las condiciones fueron 94 °C, 1 min; 94 °C, 30 seg, 56 °C, 30 seg, 68 °C, 2 min durante 20 ciclos; 68 °C, 5 min, manteniéndose a 4 °C. Se purificó el producto biotinilado de la PCR en una columna Nucleospin (Clontech) y se utilizó como sonda en el procedimiento de selección del ADNc ClonCapture (Clontech). Se incubaron 60 ng del producto biotinilado desnaturalizado de la PCR, se incubaron con CoCl₂ 2 mM, una disolución amortiguadora 1 X RecA, 1 μ g de proteína RecA, 1X ATP en un volumen final de 30 μ l. Se incubó la reacción a 37 °C durante 15 min. Para dicha mezcla, se añadieron 0,7 μ g de ADN plasmídico de una genoteca de ADNc de queratinocitos activados y 0,4 μ g de una genoteca de ADNc de placenta humana y se continuó la incubación durante 20 min. Se añadieron a la reacción 50 ng de ADN digerido con EcoRV λ y se incubaron durante 5 min. Se añadieron y se incubaron 0,6 μ l de SDS al 10 % y 5,6 g de proteinasa K a 37 °C durante 10 min. Se inactivó la proteinasa K añadiendo 1 μ l de PMSF 0,1 M. Se preincubaron perlas magnéticas de estreptavidina con 5 μ g de ADN de esperma de salmón cortado durante 10 min y se capturaron las perlas con un imán, se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender las perlas en 30 μ l de disolución amortiguadora de unión (ácido edético 1 mM, NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). Se añadieron las perlas a la reacción y se incubó la reacción durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se capturaron las perlas capturadas con un imán y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las perlas con 1 ml de disolución amortiguadora de lavado (ácido edético 1 mM, NaCl 2 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5), se capturaron las perlas con un imán y se eliminó el sobrenadante. Se repitió 3 veces el procedimiento de lavado. Se añadió un ml de H₂O estéril a las perlas lavadas, se incubaron durante 5 min a 37 °C, se capturaron las perlas con un imán y se eliminó el sobrenadante. Se eluyó el ADN capturado añadiendo 0,1 ml de disolución amortiguadora de elución (ácido edético 1 mM, NaOH 0,1 N), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, se capturaron las perlas con un imán, y se eliminó el sobrenadante y se guardó en un tubo nuevo. Se añadieron 22,5 μ l del vehículo que contenía la mezcla de precipitación y neutralizadores del pH junto con 2,5 volúmenes de etanol. Se concentró el ADN plasmídico por centrifugación y se disolvió de nuevo en H₂O. Se volvió a introducir el ADN plasmídico en E. coli DH10B/P3 por electroporación y seleccionó en placas de LB-agar que contenían 7,5 mg/ml de tetraciclina y 25 mg/ml de ampicilina. Se elevaron las colonias en filtros de Nytran y se hibridaron con oligonucleótidos marcados con ³²P con la secuencia 5'-CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAA-3' (SEC ID N.º 7), 5'-AGGTGCTAGGGGACAGTGTTAGACA-3' (SEC ID N.º 8) y 5'-TCGCTTGTAGTCGGCACCACCATA-3' (SEC ID N.º 9). Todos los oligonucleótidos presentaron la secuencia de AA292201. Las condiciones finales de lavado fueron 2 X SSC, SDS al 0,1 % a 55 ° durante 20 min. Se recogieron las dos colonias de hibridación y se determinó la secuencia de los insertos de ADNc.

La secuenciación puso de manifiesto la presencia dos formas de moléculas B7-4. La primera forma, la B7-4 secretada (B7-4S) codifica una proteína que presenta un dominio hidrófilo corto sin un anclaje a la membrana. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de esta forma se muestran en las SEC ID N.º 1 y 2, respectivamente. La segunda forma, la B7-4 de membrana (B7-4M) codifica una proteína que presenta una transmembrana y el dominio citoplasmático corto. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de esta forma se muestran en las SEC ID N.º 3 y 4, respectivamente. Ambos miembros de la familia de B7-4 identificados presentan los dominios señal, IgV e IgC, tal como se ilustra en las figuras 3 y 4. La forma B7-4M presenta aproximadamente el 21 % de identidad de aminoácidos con respecto a la B7-1 humana y aproximadamente el 20 % de identidad de aminoácidos con respecto a la B7-2 humana, como se calcula utilizando la matriz por defecto Blosum62 con penalizaciones de

abertura establecidas en existencia 11 y extensión 1 (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), en unas condiciones en las que B7-1 y B7-2 presentan aproximadamente un 26 % de identidad.

Ejemplo 2. Expresión del ARNm de la B7-4: análisis de inmunotransferencia de tipo Northern

Se prevé que un ARNm de la forma soluble de B7-4 sea de aproximadamente 1,2 kb, aunque son posibles otros tamaños. El ARNm de la segunda forma es de aproximadamente 3,8 kb, con ARNm menores de 1,6 y 6,5 kb.

Se analizó la expresión de los polipéptidos de B7-4. Se preparó el ARN mediante homogeneización de tiocianato de guanidina y centrifugación con cloruro de cesio. Se sometió a electroforesis una cantidad equivalente de ARN (aproximadamente 2 µg de poli(A)+ ARN) en un gel de agarosa, se realizó la inmunotransferencia y se hibridó en una porción de ADNc de B7-4 marcado con ³²P común a ambas formas B7-4S y B7-4M. Dichos ARNm de B7-4 quedan muy expresados en la placenta, pulmón y corazón, y se expresan moderadamente en el timo. Además, dichos ARNm de B7-4 se expresan poco en el músculo esquelético, riñón, páncreas, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, colon y leucocitos de la sangre periférica. Se ha descubierto asimismo que se expresan muy poco en el hígado o el cerebro. Los ARNm de B7-4 no se expresaron en monocitos sin estimular, pero resultaron muy estimulados por el IFN-γ. De un modo similar, se descubrió que se puede provocar la expresión de dichos polipéptidos en los queratinocitos mediante TPA/IFN-γ y en las células dendríticas mediante IFN-γ. Dichos ARNm de B7-4 no se expresaron en los linfocitos B sin estimular, pero se estimularon mediante la reticulación de la Ig.

Se examinó asimismo la expresión de dichos ARNm de B7-4 en diversas estirpes celulares. No se encontró que se expresaran en estirpes de linfocitos B tales como Raji, Ramos, LBL, Nalm 6 y DHL-4. Tampoco se expresaban en estirpes de linfocitos T, tales como Jurkat, Rex, CEM, HPB-ALL, Peer4 y H9 o en estirpes de linfocitos T transformadas con HTLV-1 tales como SPP y MT2 o en la estirpe de mielocitos U937.

Ejemplo 3. Caracterización adicional de la expresión del ARNm de la B7-4: análisis de inmunotransferencia de tipo Northern

Se hibridó una pluralidad de inmunotransferencias de tipo Northern (Clontech, Palo Alto, CA) de tejidos de ratón y humanos con sondas de ADNc radiomarcadas con ³²P-dCTP en QuikHyb (Stratagene, La Jolla, CA) según las instrucciones del fabricante. La sonda de B7-4 humana consistía en un fragmento de ADNc de 1 kb de BamHI/NotI que comprendía la región codificante y la región 3' sin traducir de la SEC ID N.º 1. La sonda de B7-4 de ratón consistía en un fragmento de ADNc de 300 pb de la región codificante. Clontech proporcionó sondas de actina de control. Se lavaron las inmunotransferencias dos veces a temperatura ambiente en 2X SSC, SDS al 0,1 %, seguido por 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C, y se examinaron por autorradiografía.

Se expresó el ARNm de B7-4 en unos niveles elevados en corazón, placenta humana e hígado fetal humano, y en niveles inferiores en bazo, ganglios linfáticos, timo e hígado del ratón.

Se expresó el ARNm de B7-4 en diversas estirpes celulares de ratón transformadas, entre ellas PU5-1.8, RAW 264.7, K-Balb, M-MSV-Balb/3T3, Hepa 1-6, R1.1, L1210, P38D1, P815 y células NB41A3.

Ejemplo 4. Caracterización adicional de la expresión del ARNm de la B7-4: PCR cuantitativa, hibridación de la matriz génica y análisis de inmunotransferencia del ARN

Se examinó la expresión de ARNm de B7-4 en las células que presentan antígenos y se comparó con la expresión de B7-1 y B7-2 en dichas células. Para el análisis de PCR cuantitativa, se trató el ARN celular con desoxirribonucleasa, se volvió a extraer y se convirtió en la primera cadena de ADNc. Se adquirieron sondas FAM marcadas con (6-carboxifluoresceína) de B7-4, B7-1, B7-2 humanas, y se adquirieron sondas GAPDH en PE Biosystems (B7-4: cebadores 5'-GCCGAAGTCATCTGGACAAG-3' (SEC ID N.º 13) y 5'-TCTCAGTGTGCTGGTCACAT-3' (SEC ID N.º 14), sonda 5'-FAM-CACCACCACCAATTCCAAGA-3' (SEC ID N.º 15); B7-1: cebadores 5'-ACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAA-3' (SEC ID N.º 16) y 5'-TGCCAGCTCTTCAACAGAAACAT-3' (SEC ID N.º 17), sonda 5'-FAM-TGGCAACGCTGTCCTGTGGTCAC-3' (SEC ID N.º 18); B7-2: cebadores 5'-GGGCCGCACAAGTTTTGAT-3' (SEC ID N.º 19) y 5'-GCCCTTGTCCTTGATCTGAAGA-3' (SEC ID N.º 20), sonda 5'-FAM-CGGACAGTTGGACCCTGAGACTTCACA-3' (SEC ID N.º 21).

Se prepararon las reacciones de PCR en placas de 96 pocillos utilizando reactivos del kit EZ de Perkin Elmer TaqMan™ EZ, según las instrucciones del fabricante. Se realizaron las curvas normales para cada uno de los cuatro genes analizados. Se ejecutaron cuarenta ciclos de PCR en un detector de Secuencias ABI Prism 7700 y se utilizó GAPDH para normalizar los resultados de B7-4, B7-1 y B7-2.

Se utilizó el chip Affymetrix Mu19KsubA para el análisis de la hibridación de Genechip. La secuencia de una región de B7-4 murino está representada por la etiqueta TC 17781 de la secuencia expresada, del Instituto de Investigación

Genómica en dicho matriz. Se realizó el aislamiento del ARN, la hibridación de la matriz y el escaneo tal como se describe en Byrne, M. C. et al. (2000) *Curr. Prot. Mol. Biol. Suppl.* 49:22.2.1-22.2.13.

5 Para la hibridación por inmunotransferencia de ARN, se escindieron las 1,6 kb humanas y 3,6 kb murinas de ADNc de B7-4 mediante digestión con Xba I y se marcaron por cebado aleatorio con γ -³²P-ATP y el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. Los productos de las transferencias de ARN se hibridaron tal como se describe en Freeman, G. J. et al. (1992) *J. Immunol.* 149:3795-3801.

10 Se obtuvieron células dendríticas humanas a partir de la sangre periférica. Se aislaron células mononucleares tras el fraccionamiento en un gradiente de Ficoll. Se eliminaron las células no adherentes se eliminaron y se cultivaron las células restantes en 150 ng/ml de GM-CSF humano (R&D Systems) y 100 ng/ml de IL-4 humana (R&D Systems) durante 2 días. Se aislaron las células dendríticas no adherentes (CD80⁺ CD86⁺ HLA-DR⁺ CD54⁺ CD58⁺ CD1a⁺) y se cultivaron en GM-CSF solo o se activaron con GM-CSF, 2,5 μ g/ml de LPS (Sigma Chemicals) y 10 ng/ml de interferón- γ humano. Al cabo de 4 horas y 20 horas tras la activación, se cultivaron las células y se aisló el ARN utilizando el kit RNeasy (Qiagen).

15 Células mononucleares de médula ósea murina se inmunogotaron de granulocitos, linfocitos y células Ia⁺ por clasificación de células activadas magnéticamente y se cultivaron en placas de Petri con GM-CSF e IL-4. Se cultivaron las células dendríticas como la población no adherente tras 7 días de cultivo y se demostró que eran CD11c⁺ 75-80 %, células Ia⁺ elevada. Se activaron las células con LPS e interferón- γ humano.

20 El análisis de la expresión en monocitos de sangre humana por hibridación de inmunotransferencia de ARN demostró que B7-2 no se expresa mediante monocitos sin estimular, pero se regula por aumento rápidamente tras el tratamiento con interferón- γ . El tratamiento de los monocitos con otra citocina proinflamatoria, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , provocó una estimulación de bajo nivel similar a la encontrada con únicamente medio, se supone que como resultado de la activación por adherencia al plástico. Además del ARNm de B7-4 grande de 4,2 kb, se observó asimismo una especie menor de ARNm de B7-4 de 1,8 kb en los monocitos tratados con interferón- γ . Se observó asimismo la expresión de B7-4 por linfocitos B humanos activados por la reticulación de la inmunoglobulina de la superficie celular, pero no por la estirpe celular Raji. Del mismo modo, la B7-1 no se expresa por monocitos sin estimular, pero se regula por aumento como respuesta al interferón- γ con una cinética similar a la expresión de la B7-4. En cambio, el ARNm de B7-2 se expresa constitutivamente en los monocitos y los niveles no se ven afectados por el interferón- γ o el tratamiento con TNF- α .

25 Se examinó asimismo la expresión del ARNm de B7-4, B7-1 y B7-2 por parte de las células dendríticas humanas mediante PCR cuantitativa. Se trataron las células obtenidas de la sangre periférica humana con un factor estimulado por colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) solo o activado con GM-CSF, lipopolisacárido (LPS) e interferón- γ . Como resultado de la activación por el LPS y el interferón- γ , se estimuló rápidamente el ARNm de B7-4 con un aumento de 16 veces en 4 horas y un aumento de 34 veces en 20 horas, con respecto a las células no estimuladas. Se estimularon asimismo ARNm de B7-1 y B7-2 tras la activación: B7-1 se estimuló 21 veces en 4 horas y 22 veces en 20 horas. B7-2 presentó poca estimulación a las 4 horas; sin embargo, se estimuló la expresión 5 veces en 20 horas. Se examinó la expresión de B7-4 por las células dendríticas obtenidas de la médula ósea murina tratadas con LPS e interferón- γ mediante la hibridación GenechipTM. La expresión de B7-4 en dichas células sigue una pauta similar a la observada en las células dendríticas humanas: una estimulación de 5 veces del ARNm de B7-4 con respecto a las células no estimuladas a las 6 y 20 horas tras la estimulación. Estos datos demuestran que la B7-4 se expresa por las células que presentan antígenos y los linfocitos, y se estimula en las células dendríticas de un modo similar a B7-1 y B7-2. El tratamiento de queratinocitos humanos con éster de forbol e interferón- γ estimuló también la B7-4.

30 En los tejidos murinos, se detectaron aproximadamente 3,7 kb de transcrito de ARNm de B7-4 mediante hibridación por inmunotransferencia de tipo Northern. La distribución del ARNm de B7-4 murino se parecía mucho a la de la B7-4 humana, con unos niveles elevados en corazón, timo y pulmón, y unos niveles bajos en riñón, bazo e hígado.

Ejemplo 5. Localización cromosómica de B7-4

35 Se determinó la localización cromosómica de los genes de B7-4 utilizando un kit de inmunotransferencia monocromosómica disponible comercialmente en Quantum (Toronto, Canadá). Se hibridaron las inmunotransferencias con una secuencia que reconoce tanto la B7-4S como la B7-4M. Utilizando este procedimiento, se han localizado los polipéptidos B7-4 en el cromosoma humano 9, mientras que la B7-1 y la B7-2 se han localizado en el cromosoma humano 3. Las butirofilinas, que también comparten una identidad limitada de la secuencia de aminoácidos con la familia de B7-4, se han localizado en el complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6. La localización cromosómica de la B7-4 se confirmó utilizando cebadores específicos de la B7-4 en la amplificación por PCR de plantillas de ADN de híbridos de células somáticas monocromosómicas disponibles en Quantum Technologies (Canadá).

Ejemplo 6. Unión de moléculas B7-4 a ligandos celulares o anticuerpos de linfocitos T.

5 Se sometieron a transfección células COS con un vector de ADN (pcDNA1) o un plásmido de expresión que contenía el ADNc de la B7-4M. Después de 72 horas, las células COS sometidas a transfección se separaron por incubación en PBS que contenía ácido edético 0,5 mM durante 30 min a 37 °C.

10 Se analizó la capacidad de las células COS que expresan la B7-4M para unirse a diversos receptores y anticuerpos de linfocitos T. El análisis FACS de la unión de CD28lg, CTLA4-Ig y la Ig de control mediante células COS sometidas a transfección con B7-4 demostró que ni CD28lg ni CTLA4-Ig estaba enlazada con la B7-4 (figura 8). Se analizó asimismo la capacidad de las células COS que expresan B7-4M para unirse a la IgG murina y su proteína de fusión ICOS. No se detectó unión alguna de la B7-4 humana con las ICOS murinas (figura 9). Tal como se representa en la figura 10, el análisis FACS puso de manifiesto la unión de los anticuerpos BB (anti B7-1 y anti B7-3), pero no IgM o 133 (anti-B7) o con las células COS sometidas a transfección con B7-4.

15

Ejemplo 7. Coestimulación de la multiplicación de los linfocitos T mediante moléculas B7-4

Se analizó la capacidad de los polipéptidos B7-4 para coestimular la multiplicación de los linfocitos T humanos.

20 Se aislaron linfocitos T CD28⁺ humanos mediante el agotamiento de perlas inmunomagnéticas utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los linfocitos B, linfocitos citotóxicos naturales y macrófagos tal como se ha descrito anteriormente (Gimmi, C.D., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6586-6590). Se cultivaron células COS sometidas a transfección con B7-4 vectores durante 72 horas tras la transfección, se incubaron con 25 µg/ml de mitomicina-C durante 1 hora y a continuación se lavaron exhaustivamente. Se estimularon 10⁵ linfocitos T indiferenciados con anti-CD3 mAb unidos a placas más 20.000 células COS tratadas con mitomicina-c sometidas a transfección con el constructo de ADN indicado.

25

30 Se determinó la multiplicación de los linfocitos T con ³H-timidina (1 µCi) incorporada durante las últimas 12 horas de una incubación de 72 horas. Tal como se muestra en las figuras 11 y 12, las células COS que expresan la B7-4 pueden coestimular la multiplicación de los linfocitos T.

30

Ejemplo 8. Generación de anticuerpos murinos contra B7-4

35 Se prepararon vectores de expresión de mamíferos (pEF6 o pcDNA3.1 (Invitrogen)) que comprendían todo el ADNc de B7-4 murino o humano. El constructo ADNc/vector se disolvió en 0,9% de disolución salina hasta 1 mg/ml (sin TE o PBS).

35

40 Antes de la inmunización, se inyectaron 78 µl de 1 mg/ml cardiotoxina (Sigma #C-1777) en 0,9% de disolución salina en el músculo tibial anterior de cada extremidad posterior del ratón que se inmunizó. A continuación, se aisló cada ratón durante 5 días.

40

Tras anestesiar a los ratones, se inyectaron 50 µl de 1 mg/ml del constructo ADNc/vector de B7-4 purificado (en disolución salina al 0,9 %) en cada músculo tibial anterior en regeneración.

45 Se determinaron los valores de los anticuerpos aproximadamente seis días después de la inmunización utilizando procedimientos estándar, por ejemplo, una prueba ELISA. Se repitió la inmunización con ADNc cada 2 a 4 semanas durante tres ciclos (hasta alcanzar un valor de anticuerpos > 1:10.000). A continuación se administró a los ratones una dosis de recuerdo con células CHO sometidas a transfección con PDL-1.

45

50 Se cultivaron células de bazo aisladas de ratones que presentaban unos valores de anticuerpos apropiados. Se fusionaron las células de bazo con ligandos SP2-0) para crear hibridomas. Se manipularon los hibridomas y los anticuerpos utilizando procedimientos estándar (véase, por ejemplo, "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow, E. and Lane, D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

50

55 Los anticuerpos 2A3, 10D9, 5A9 y 11D12 se encontraban entre los seleccionados en los ensayos de identificación sistemática. Se descubrió que dichos anticuerpos se unían células las células COS o CHO sometidas a transfección con B7-4 humana y no con las células sometidas a una transfección simulada o las células sometidas a transfección con B7-4 de ratón. Se utilizaron los anticuerpos para detectar la presencia de B7-4 en diversas poblaciones celulares. Se observó la expresión de B7-4, entre otros, en el tejido cardíaco, células tumorales (entre ellas algunas células tumorales de pulmón, algunas células tumorales de ovario, algunas células tumorales de mama, algunas células tumorales epiteliales y algunos carcinomas espinocelulares), placenta y epitelio del timo.

55

60

Ejemplo 9. Generación de anticuerpos completamente humanos contra B7-4

En este ejemplo, se realizaron anticuerpos completamente humanos contra la B7-4 de PD-1 en ratones que eran transgénicos con respecto a los genes de la inmunoglobulina humana. Los ratones transgénicos se realizan utilizando procedimientos estándar, por ejemplo, según Hogan, et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, o se adquieren comercialmente. Se manipularon las células germinales embrionarias según procedimientos publicados ("Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach", Robertson, E. J. ed., IRL Press, Washington, D.C., 1987; Zijlstra et al. (1989) Nature 342:435-438; y Schwartzberg et al. (1989) Science 246:799-803). Se realizaron los procedimientos de clonación de ADN según Sambrook, J. et al. en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Se sintetizar los oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de oligonucleótidos de Applied Bio Sistemas según las especificaciones proporcionadas por el fabricante o se adquieren comercialmente.

Se inmunizaron los ratones transgénicos utilizando una B7-4 o PD-1 purificada o recombinante o una proteína de fusión que comprende por lo menos una región inmunógena del dominio extracelular de B7-4 o PD-1. Se inyectaron aproximadamente cuatrocientos µg de B7-4 o PD-1 en 100 µl de disolución amortiguadora de fosfato salino (PBS) por vía intraperitoneal a cada ratón. Se recogieron las muestras de suero aproximadamente seis días después mediante sangrado del seno retroorbital.

Se analizó la reactividad de los anticuerpos y la especificidad con respecto a B7-4 o PD-1 utilizando un ensayo indirecto de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Se analizaron diversas moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas como controles (por ejemplo, CTLA4 y CD28) para comprobar la especificidad de los anticuerpos hacia B7-4 o PD-1. Los anticuerpos que presentan regiones variables humanas que se unen a B7-4 o PD-1 se detectaron mediante conjugados enzimáticos específicos de las subclases de la IgG humana y la IgM humana sin reactividad cruzada con inmunoglobulina de ratón. En pocas palabras, se recubrieron placas de microvaloración de PVC están recubiertas con B7-4 o PD-1 recubriendo los pocillos durante la noche a 37 °C con 5 mg/ml de B7-4 en PBS. Se diluyeron las muestras de suero en PBS, suero al 5 %, Tween-20 al 0,5 % y se incubaron en los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por anti-IgG Fc humana e IgG F(ab')-peroxidasa de rábano o anti-IgM Fc humana-peroxidasa de rábano en el mismo diluyente. Tras 1 hora a temperatura ambiente se analizó la actividad enzimática añadiendo sustrato ABTS (Sigma, St. Louis, MO) y se procedió a la lectura tras 30 minutos a 415 a 490 nm. En las muestras de suero preinmunización de los mismos ratones, se analizaron también los valores de anticuerpos humanos contra los mismos antígenos diana.

Se cultivaron células de bazo aisladas de ratones que presentaban unos valores de anticuerpos apropiados. Se fusionaron las células del bazo con elementos de fusión apropiados (por ejemplo, mielocitos) para realizar hibridomas. Se manipularon los hibridomas y los anticuerpos según "Antibodies: A Laboratory Manual", Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Las secuencias que determinan la complementariedad de los dominios V_H y V_L murinos de un anticuerpo murino se podrían utilizar para realizar un injerto en el marco de las inmunoglobulinas humanas a fin de generar un anticuerpo humanizado contra la B7-4 o el PD-1 (Riechmann et al. 1988. Nature 332:323; Verhoeyen et al. 1988. Science 239:1534).

Ejemplo 10. Generación de Fv monocatenarios humanos reactivos con B7-4 o PD-1

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se identificaron y aislaron anticuerpos anti-B7-4 o anti-PD-1 (regiones monocatenarias de tipo Fv de anticuerpos) procediendo a una identificación sistemática de una genoteca combinatoria de secuencias de inmunoglobulina humana que se presentan en el bacteriófago M13 de Cambridge Antibody Technology, Ltd., Melbourn, UK (Winter et al. 1994 Annu. Rev. Immunol. 1994 12:433; Hoogenboom et al., 1998, Immunotechnology 4: 1). Se utilizaron PD-1.Fc o B7-4.Fc para aislar de este modo miembros de la genoteca de inmunoglobulinas que se unen con un polipéptido B7-4 o PD-1. Los kits para generar y realizar la identificación sistemática de genotecas de presentación de fagos se encuentran disponibles comercialmente y se utilizaron procedimientos estándar para generar scFv (Helfrich et al. J. Immunol Methods 2000. 237: 131-45; Cardoso et al. Scand J. Immunol 2000. 51: 337-44). Se inmovilizaron PD-1.Fc o B7-4.Fc en plástico y se seleccionó el fago que expresa el scFv específico según la vista completa y una pluralidad de rondas de enriquecimiento (Griffiths et al. 1993 EMBO J. 12:725).

Ejemplo 11. Identificación de un receptor para la B7-4.

Se utilizaron proteínas de fusión que consisten en la región extracelular del PD-1 humano fusionado con los dominios bisagra-CH2-CH3 de la inmunoglobulina gamma 1 humana o de la gamma Ig 2a murina (con mutaciones bloqueadoras de la interacción entre FcR y el complemento) para buscar un ligando que se una al PD-1. Como parte de esta búsqueda, se utilizó la tinción de la superficie celular de monocitos estimulados se encontró con interferón y.

Se activa la B7-4 en los monocitos tras la estimulación con interferón γ , tal como se observa mediante hibridación de inmunotransferencia de tipo Northern.

Se analizó la unión de PD-1-Fc (γ -Ig 1 humana) a la superficie de las células COS sometidas a transfección transitoria con un vector de expresión-B7-4. Las células COS se sometieron a transfección con B7-4M o B7-1 utilizando el reactivo de transfección LipofectAMINE. Después de 48 horas, se tiñeron con las células PD-1-Fc humano, PD-1-Fc murino, CTLA4-Fc, Flt4-Fc o IgG seguido por anti-IgG conjugado con ficoeritrina (PE). A continuación se analizaron las células por citometría de flujo. Tal como se representa en la figura 13, las células COS que expresan B7-4 se enlazaron con PD-1-Fc tanto humano como murino y PD-1-Fc, pero no se unieron a CTLA4-Fc, Flt4-Fc o IgG humana. Como control positivo, se demostró que las células COS que expresan B7-4 se unieron a CTLA4-Fc, pero no a PD-1-Fc o IgG.

Además, se realizó una prueba *in situ* con monocapas de células COS sometidas a transfección. Se analizaron las monocapas con PD-1-Fc, CTLA4-Fc o IgG1 humana y se detectó la unión con un anticuerpo secundario dirigido contra la región Fc y conjugado con fosfatasa alcalina. Se visualizó la unión con sustratos cromógenos de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y nitro azul tetrazolio y microscopía óptica. En paralelo, se encontró que las células sometidas a transfección con B7-4 se unían a PD-1-Fc y no a CTLA4-Fc (γ -Ig 1 humana) o Flt4-Fc, la región extracelular del Flt4 murino ligado a γ -Ig 1 humana. En paralelo, el PD-1-Fc no se unió a la superficie de células COS sometidas a transfección simulada con B7-1 o B7-2.

En otro experimento, no se detectó unión del PD-1-Fc con las formas solubles de B7-1 o B7-2 y se detectó la unión con B7-4 utilizando una prueba basada en BIACORE. En paralelo, se demostró que las hCTLA4 se unían a B7-1 y no a B7-4. Se inmovilizaron PD-1-Fc o CTLA4-Fc y las condiciones fueron sustancialmente las descritas por Fitz et al. (1997) Oncogene 15:613). Se inyectó medio de células COS concentrado a partir de células que se habían sometido a transfección con B7-4M o B7-4-Fc de longitud completa y se midieron las interacciones utilizando análisis de la interacción biomolecular (BIA) en tiempo real (Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Se descubrió que la B7-4 humana se unía al PD-1 humano y de ratón y que dicha unión se inhibía por la competencia con un PD-1-Fc inyectado simultáneamente pero no con CTLA4-Fc. Estos experimentos demuestran no únicamente la unión de la proteína de fusión soluble B7-4-Fc con el PD-1-FcR inmovilizado, sino que demuestran asimismo la presencia de una forma soluble de B7-4 en el medio acondicionado de células sometidas a transfección con ADNc de B7-4M, probablemente como resultado de la dispersión.

La figura 14 representa la capacidad del PD-1 y no del Flt4 (el receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular C) para inhibir competitivamente la unión del PD-1 con la B7-4. La unión de la proteína de fusión humana PD-1- γ -2a a las células COS que expresan la B7-4M se muestra en el Panel A. Se detectó la unión con reactivos específicos anti- γ 2a ligados a PE. Se añadió PD-1 humano ligado a IgG1 en: 50 μ g/ml, 6,25 μ g/ml, 100 μ g/ml o 25 μ g/ml y se descubrió que competían por la unión. Como control, no se encontró que la Flt4-IgG1 en 100 μ g/ml compitiese por la unión del PD-1 con la B7-4.

En otro experimento adicional, se determinó la capacidad de la B7-4 para unirse al PD-1 por citometría de flujo y pruebas de unión BIACORE. Las proteínas de fusión PD-1.Ig humanas y murinas se unieron a la B7-4 humana y murina expresada en células CHO, detectada mediante citometría de flujo (figura 15). Sin embargo, la CTLA-4.Ig humana, la CD28.Ig humana ni la ICOS.Ig humana se unieron a cualquiera de las estirpes celulares que expresaban la B7-4. Las proteínas de fusión PD-1 no se unieron a las células CHO sometidas a transfección con el vector solo. Se obtuvo la confirmación adicional de la interacción PD-1:B7-4 utilizando resonancia de plasmones superficial con un instrumento BIACORE. Se inmovilizaron las proteínas PD-1.Ig humanas y murinas, y la CTLA-4.Ig humana sobre las superficies de las células de flujo de un chip de dextrano y analizaron con respecto a la unión con la B7-4.Ig humana soluble. La B7-4.Ig se unió a la PD-1.Ig humana y murino, pero no a la CTLA-4.Ig (figura 16). Esta unión quedó bloqueada por la competencia con la PD-1.Ig soluble inyectada simultáneamente, pero no por la CTLA-4.Ig. Las formas solubles de B7-1 y B7-2 humana no se unieron al PD-1 humano inmovilizado.

Estos datos demuestran que el PD-1 se une a la B7-4, y que esta interacción puede regular la acción del PD-1.

Ejemplo 12. La B7-4 puede transmitir una señal negativa a los inmunocitos

En este ejemplo, se estimularon 5×10^5 inmunocitos T Jurkat por pocillo con perlas recubiertas con anti-CD3 (en una proporción 1:1) y anti-CD28 soluble. Se valoraron las células COS que expresaban la B7-4 o un control negativo, denominado EZZ, en los pocillos. Se recogieron los sobrenadantes al cabo de 48 horas y se analizaron mediante ELISA con respecto IL-2 humana. La figura 17 muestra como un número creciente de células COS B7-4 (barras de la parte derecha de la figura) provocan una disminución de la producción de IL-2.

Utilizando formatos similares de prueba, por ejemplo, en el que se estimularon blastos PHA humanos a partir de PBMC con anti-CD3 y anti-CD28 soluble inmovilizados, se observó una disminución en la multiplicación de los linfocitos T mediante valoración de las células COS que expresaban la B7-4.

5 Ejemplo 13. La interacción PD-1:B7-4 inhibe la multiplicación de los linfocitos T en la que interviene CD3

Para examinar la importancia funcional de la interacción PD-1:B7-4, también se examinaron las consecuencias funcionales de la interacción de B7-4 con su receptor utilizando linfocitos T humanos. Se aislaron células mononucleares de la sangre periférica por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Se purificaron poblaciones de linfocitos T CD4⁺ (85-90 % de pureza) mediante selección negativa utilizando una mezcla de anticuerpos monoclonales y perlas inmunomagnéticas (PerseptiveBiosystems). Se unieron covalentemente el anticuerpo anti-CD3, la IgG de control y la proteína de fusión a tosilo recubierto de poliuretano activado de Dynabeads (Dyna) según las instrucciones del fabricante y tal como se ha descrito anteriormente (Blair, P. J. et al. (1998) J. Immunol. 160:12-15). Se añadió el anticuerpo anti-CD3 (UCHT1, Pharmingen) a la concentración indicada a 1 x 10⁷ perlas/ml de disolución amortiguadora de fosfato 0,1 M a un pH de 7,4. Se añadió la IgG de control a la suspensión de perlas para mantener una concentración de Ig total constante de 5 µg/ml durante la unión. De un modo similar, se prepararon perlas anti-CD3/B7-4.Ig(γ2a) con la concentración del anticuerpo anti-CD3 indicada, una concentración constante de tanto la B7-4.Ig que representa el 40 % de la proteína total unida (2 µg/10⁷ perlas) como de la IgG de control para deducir la proteína unida total restante. Se cultivaron 10⁵ linfocitos en 96 placas de pocillos de fondo plano y se añadieron las perlas con una relación de 1 perla por 1 célula en presencia o a falta de las concentraciones indicadas del anticuerpo anti-CD28 (CD28.2, Pharmingen). Se determinó la multiplicación marcando los cultivos durante las últimas 6 h de una prueba de 4 días con 1 µCi de ³H-timidina/pocillo. Para el análisis mediante ELISA de las citocinas, se prepararon los cultivos tal como se ha descrito anteriormente y se recogieron los sobrenadantes en los tiempos indicados. Se determinaron las concentraciones interferón-γ, IL-10 e IL-2 utilizando kits de ELISA disponibles comercialmente (Genzyme).

Se activaron linfocitos CD4⁺ purificados obtenidos a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con perlas recubiertas con anti-CD3 mAb y, o bien B7-4.Ig humana o una Ig de control. Se analizó la proliferación y la producción de citocinas 96 horas después de la estimulación. Tal como se representa en la figura 18, las células activadas con perlas recubiertas con anti-CD3 mAb/B7-4.Ig presentaron una disminución del 69 % en la proliferación con respecto a las células activadas con anti-CD3 mAb/Ig de control. Además, la activación de las células en presencia de B7-4 perjudica también a la secreción de citocinas. En presencia de B7-4, interferón-γ e IL-10 disminuyeron las secreciones en aproximadamente un 80 % y un 60 %, respectivamente (figura 18). La producción de IL-2 se encontraba por debajo de la capacidad de detección en estas condiciones de activación, tanto a las 24 como a las 96 h. Sin embargo, en unas condiciones en las que se proporcionó coestimulación en forma de anti-CD28 soluble, la activación de las células en presencia de B7-4 provocó también una disminución en la producción de IL-2. De este modo, la activación de linfocitos T murinos y humanos en presencia de la B7-4 provoca la inhibición de tanto la proliferación como la secreción de citocinas.

40 Ejemplo 14. El resultado de la interacción PD-1:B7-4 depende de la resistencia de los receptores de los linfocitos T y las señales de CD28

Para examinar la relación entre el receptor de los linfocitos T, las señales en las que intervienen CD28 y PD-1, se estimularon los linfocitos T CD4⁺ humanos con concentraciones subóptimas u óptimas de anti-CD3 mAb, una concentración fija de B7-4.Ig y concentraciones crecientes de anti-CD28 mAb soluble. Se determinaron las concentraciones necesarias para la estimulación subóptima y óptima de los linfocitos T utilizando perlas recubiertas con anti-CD3 mAb. En unas condiciones de acoplamiento subóptimo del receptor de los linfocitos T (anti-CD3 mAb a 1 µg/ml), se observó la multiplicación mínima sin coestimulación (figura 19A). La adición de concentraciones crecientes de anti-CD28 mAb soluble provocó un aumento de hasta 30 veces en la multiplicación. En dichas condiciones, la activación de los linfocitos T en presencia de B7-4 produjo una reducción del 80 % en la multiplicación (figura 19A). Resultó necesario un nivel máximo de coestimulación (anti-CD28 a 250 ng/ml) para rescatar la inhibición de la multiplicación en la que interviene la estimulación de B7-4. En cambio, en unas condiciones de saturación de la activación del receptor de los linfocitos T (anti-CD3 mAb a 2 µg/ml), la inhibición de la multiplicación de los linfocitos T en la que interviene la B7-4 se observó únicamente sin coestimulación con CD28 (figura 19B).

Ejemplo 15. Capacidad de la B7-4 para inhibir las señales de CD28 y la producción de citocinas

Parece ser que los efectos inhibidores de la vía PD-1:B7-4 vienen determinados por la resistencia de señal a través del TCR y CD28 (véase el ejemplo anterior), con lo que las respuestas débiles en las que intervienen CD28/CD3 se regulan por disminución con facilidad. Para estudiar la interacción de la señal de CD28 y la vía PD-1:B7-4, se activaron los linfocitos T CD4⁺ DO11.10 preactivados se activan con el péptido OVA presentado por CHO-IA^d/B7.2 o CHO-IA^d/B7.2B7-4.

Para la detección de la B7-4, se incubaron con 5×10^4 células transfectantes CHO con $5 \mu\text{g/ml}$ de PD-1Ig (hPD-1-Ig) humana (Genetics Institute, Cambridge, MA) y se desarrollaron con un IgG2a-ficoeritina (PE) de cabra antimurina (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL). Además, se tiñeron las células por separado con $5 \mu\text{g/ml}$ de anti-IA^d-PE o B7.2-PE (Pharmingen, San Diego, CA). Después de cada etapa, se lavaron tres veces las células con PBS / BSA al 1 % / azida de sodio al 0,02 %. Tras la incubación final, se fijaron las células con paraformaldehído al 1 %. Se analizaron diez mil casos en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Se obtuvieron todos los controles de isotipo en Pharmingen.

Se prepararon los esplenocitos a partir de ratones DO11.10 y se trataron con Tris-NH₄Cl para agotar los eritrocitos. Se cultivaron las células con $1 \mu\text{g/ml}$ de péptido OVA durante 72 horas (Analytical Biotechnology Services, Boston, MA) en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, Nueva York) enriquecido con FCS al 10 % (Sigma, St Louis, MO), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, 250 ng/ml de anfotericina B, HEPES 10 mM, 2-ME 50 μM (todos de Life Technologies) y 15 mg/ml de gentamicina (BioWhittaker, Walkersville, MD). Se purificaron los linfocitos T CD4⁺ mediante selección positiva utilizando columnas de separación para la clasificación de células activadas magnéticamente (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) obteniéndose una pureza > 98 %. Se dejaron reposar las células durante la noche antes de volver a estimular.

Se inhibió la multiplicación de células CHO mediante su incubación con $50 \mu\text{g/ml}$ de mitomicina C (Bristol Laboratories, Princeton, NJ) durante 16 horas a 37 °C. Al final del periodo de incubación, se recogieron las células con ácido edético 10 mM en PBS, se lavaron dos veces y se dejaron en hielo durante 1 hora. A continuación se lavaron las células tres veces y se volvieron a suspender en medio de cultivo. Se cultivaron 10^5 linfocitos T CD4⁺ preactivados con unas concentraciones variables del péptido OVA y 10^4 transfectantes CHO tratados con mitomicina C en placas de 96 pocillos. Para realizar la prueba de multiplicación, se incubaron los cultivos durante 48 horas y se impulsaron con $1 \mu\text{Ci/pocillo}$ de [³H]timidina (New England Nuclear, Boston, MA) durante las últimas 6 horas del período de incubación.

La expresión de B7 y IA^d resultó similar en todas las CHO transfectantes (figura 20). Tal como se esperaba, la introducción de la B7.2 provocó un aumento en las respuestas proliferativas de los linfocitos T en todas las concentraciones del antígeno (figura 21). Sin embargo, la B7-4 inhibió las respuestas a las concentraciones más bajas de los péptidos ($0,01 \mu\text{g/ml}$ y $0,001 \mu\text{g/ml}$) (figura 21).

Para hacer frente a la capacidad de la vía PD-1:B7-4 para inhibir la producción de citocinas, se analizaron los sobrenadantes de los linfocitos T DO11.10 CD4⁺ activadas con el péptido OVA presentado por células CHO transfectantes. Se recogieron partes iguales de los sobrenadantes en diversos momentos tras la iniciación de los cultivos. Se analizaron los niveles de IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-10 utilizando modelos de citocinas recombinantes de Pharmingen. Los límites de detección fueron los siguientes: IL-2, 20 pg/ml, IL-4, 40 pg/ml, IFN- γ , 100 pg/ml e IL-10, 200 pg/ml. Se inhibió significativamente la producción de IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-10 cuando los linfocitos T DO11.10 CD4⁺ se cultivaron con $0,1 \mu\text{g/ml}$ de péptido y B7-4 (figura 22). A dicha concentración se produjo únicamente una inhibición débil de la multiplicación. Sin embargo la producción de citocinas inhibió significativamente la B7-4 en $0,01 \mu\text{g}$ péptido/ml, lo que es coherente con la inhibición de la multiplicación (figura 23). No se detectó IL-10 en estas condiciones de activación. Por lo tanto, el acoplamiento del PD-1 con la B7-4 puede regular por disminución la producción de citocinas, incluso cuando la proliferación de linfocitos T no se ve afectada.

Para determinar si la producción de citocinas disminuida se debió a la reducción de los niveles de ARNm, se utilizó una prueba de protección con ARNasa. Se volvieron a estimular linfocitos T CD4⁺ con diversas células CHO transfectantes y $0,01 \mu\text{g/ml}$ de péptido OVA. Después de 48 horas, se cosecharon las células y se aisló el ARNm utilizando el reactivo TRIzol[®] (Life Technologies). Se analizaron 5 μg de ARNm para determinar los niveles de citocinas mediante una prueba de protección con ARNasa utilizando el kit de RiboQuant Multiprobe mCK1 según las instrucciones del fabricante (Pharmingen). Se detectaron los niveles de transcripción del ARNm de IL-4, IL-10, IL-13, IL-2, IL-6 e IFN- γ en los linfocitos T CD4⁺ DO11-10 preactivados tras la estimulación con $0,01 \mu\text{g/ml}$ de péptido OVA presentado por CHO-IA^d/B7.2. Sin embargo, la introducción de la B7-4 redujo significativamente los niveles del ARNm de las citocinas. Se produjo una regulación por aumento del ARNm de las citocinas en los cultivos de linfocitos T no estimulados o de los linfocitos T activados con el péptido presentado por CHO-IA^d. Estos resultados demuestran además la capacidad de la vía PD-1:B7-4 para antagonizar una señal fuerte de B7/CD28 por lo menos cuando la estimulación antigénica es débil o limitada, y la inhibición de por lo menos la producción de citocinas en unas condiciones de fuerte estimulación antigénica.

Ejemplo 16. Mecanismo de acción de la vía PD-1:B7-4

Se ha demostrado que la reticulación de CTLA-4 inhibe la progresión del ciclo celular en los linfocitos T indiferenciados (Krummel, M. F. and Allison, J. P. (1996) J. Exp. Med. 183:2533-2540; Walunas, T. L. et al. (1996) J. Exp. Med. 183:2541-2550). Puesto que se aisló el PD-1 a partir de estirpes celulares murinas mediante apoptosis,

un posible mecanismo de acción de la vía PD-1:B7-4 podría ser la de aumentar la muerte celular programada. Para estudiar esta cuestión, se volvieron a estimular linfocitos T CD4⁺ DO11.10 con 0,01 µg/ml de péptido y diversas CHO transfectantes y se analizó la progresión del ciclo celular. Se volvieron a estimular los linfocitos T CD4⁺ con el péptido a 0,01 µg/ml tal como se ha descrito anteriormente. Después de 36 horas de cultivo, se recuperaron las células y se tiñeron con anti-CD4 FITC. Se lavaron las células en PBS, se fijaron en etanol al 70 % durante 1 hora en hielo y a continuación se volvieron a suspender en PBS que contenía 10 µg/ml de ARNasa (Sigma) y 50 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma). Se realizó el análisis antes de que hubiera transcurrido una hora desde la tinción.

Después de 48 horas, se recuperaron las células y se tiñeron con anti-CD4 FITC. Tras la permeabilización, se incubaron las células con yoduro de propidio para analizar las fases G₀/G₁, S/G₂ y las poblaciones subdiploides. Los linfocitos T CD4⁺ que se han vuelto a estimular con el péptido presentado por CHO-IA^d presentan una gran proporción de células en la población subdiploide, lo que resulta indicativo de la apoptosis (figura 24). En los cultivos en los que se estimularon los linfocitos T CD4⁺ mediante el péptido presentado por CHO-IA^d/B7-2, no aumentó el número de células en la fase G₂/S y disminuyó el número de la población subdiploide, lo que indica que las células estaban en el ciclo y se rescataron de la apoptosis mediante la coestimulación con B7/CD28. La introducción de B7-4 provocó un aumento del número de células en la fase G₀/G₁ (figura 24). Se obtuvieron unos niveles comparables de apoptosis entre los cultivos de B7-4 y los cultivos de CHO-IA^d/B7. Ello se confirmó mediante tinción con anexina. La inhibición de la progresión celular mediante la vía PD-1:B7-4 confirma su papel en la regulación por disminución de la activación de los linfocitos T

Ejemplo 17. Inhibición de la unión de la B7-4 Fc humana biotinilada con el PD-1Fc humano

Se generaron proteínas de fusión Fc enlazando la región extracelular del PD-1 o la B7-4 con los dominios de la bisagra-CH2-CH3 de la Igy2a murina. Se produjeron proteínas recombinantes en células COS sometidas a transfección transitoria con LipofectAMINE (Gibco-BRL) o estirpes celulares CHO sometidas a transfección de un modo estable y purificadas a partir de medios acondicionados utilizando proteína A-Sefarosa.

Se analizó la capacidad de los anticuerpos contra B7-4 o PD-1 para inhibir la interacción de la B7-4Fc humana y el PD-1 Fc humano utilizando procedimientos ELISA estándar. En pocas palabras, se inmovilizaron las moléculas de PD-1Fc humano en placas de 96 pocillos, se bloquearon y se lavaron. Se añadieron moléculas de B7-4Fc biotinilada (100 ng/ml) a los pocillos a unas concentraciones de aproximadamente 2.000, 700, 200, 70, 25, 8, y 1,18 ng/ml (figura 25). Se incubaron los pocillos con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, se lavaron y se desarrolló el color utilizando procedimientos estándar. Se encontró que la ED₅₀ de la B7-4Fc era de 108 ng/ml.

Se analizó la capacidad de los anticuerpos murinos contra la B7-4 humana (10D9 y 11D12) o regiones scFv de inmunoglobulinas humanas (B7-4-1, B7-4-6, y B7-4-12) para inhibir la unión de la B7-4Fc humana biotinilada con el PD-1Fc humano a 7 concentraciones de inhibidores. La IC₅₀ se encontraba comprendida en un intervalo de 0,5 nM a 24 nM y los datos se presentan en la figura 25.

Se analizó asimismo el scFv específico del PD-1 para determinar su capacidad para inhibir la unión de B7-4 Fc con PD-1Fc utilizando los mismos procedimientos ELISA descritos anteriormente. Se encontró que el ScFv humano reactivo con el PD-1 (PD1-17 scFv) inhibía la unión específica (EC₅₀ entre 10⁻⁷ y 10⁻⁸) tal como se representa en la figura 26. Se utilizaron los dominios V_L y V_H del PD1-17scFv para generar una IgG completa. En pocas palabras, se ligaron las regiones codificantes V_H y V_L a secuencias de genes C_H y C_L genómicas en vectores de expresión. Los vectores de expresión resultantes se sometieron a transfección transitoria en 293 células humanas y se recogió la IgG a partir del medio acondicionado. La potencia de toda la molécula de IgG injertado resultó superior que en el caso del anticuerpo scFv (EC50 entre 10⁻⁸ M y 10⁻⁹ M).

Ejemplo 18. La administración de la B7-4Fc soluble empeora la enfermedad en un modelo murino.

Para determinar si la modulación de la vía B7-4/PD-1 tiene actividad inmunorreguladora *in vivo*, se analizó la proteína en un modelo murino de encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) que comparte muchas características clínicas y patológicas con la esclerosis múltiple humana. Se inmunizaron ratones hembra SJL/J con 100 µg de proteína proteolípida (PLP) en potenciador completo de Freund. Diez días más tarde, se recogieron los bazo, se procesaron en suspensiones celulares individuales y a continuación se volvieron a estimular *in vitro* con 5 µg de PLP durante 96 horas. Se lavaron tres veces las células en PBS y a continuación se transfirieron por inyección intraperitoneal 15x10⁶ células a ratones SJL/J que no se habían sometido previamente a experimentación. La transferencia adoptiva de linfocitos T autorreactivos provoca una parálisis aguda en los ratones receptores que se manifiesta como pérdida de tono de la cola con la posterior evolución hacia una parálisis completa de las extremidades posteriores. Este episodio de parálisis coincide con una infiltración notable de linfocitos T activados y macrófagos en el SNC. En la mayoría de condiciones, este es un modelo agudo de la enfermedad con recuperación espontánea que se produce tras un período corto de parálisis. En el caso del análisis de la B7-4Fc, se procedió a la inyección de los ratones por vía subcutánea con 200 µg de la proteína en 100 µl de disolución salina estéril en los

días 0, 2, 4, 7 y 11 después de la transferencia de células (n = 10). Los ratones de control (n = 10) recibieron un volumen equivalente de únicamente disolución salina. Se realizó el seguimiento periódico de todos los animales para detectar signos clínicos de la enfermedad, que se clasificaron del siguiente modo: 1. pérdida del tono de la cola; 2. paresia de las extremidades posteriores / parálisis parcial de las extremidades posteriores 3. parálisis completa de las extremidades posteriores; 4. parálisis de las extremidades posteriores y anteriores; 5. muerte.

En el experimento representado en la figura 27, la incidencia y el inicio de la enfermedad fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, los ratones tratados con la B7-4Fc desarrollaron la enfermedad grave con la mayoría de los animales evolucionando rápidamente hacia la parálisis completa de las extremidades anteriores y posteriores (9/10 y 1/10 en el caso de la B7-4Fc y de los ratones de control, respectivamente). La mortalidad relacionada con signos clínicos de la enfermedad fue de un 10 % en el grupo de control y de un 70 % en los ratones tratados con la B7-4Fc. Además, se retrasó sustancialmente la recuperación de la enfermedad en los ratones tratados con la B7-4Fc que no sobrevivieron a pesar de que el tratamiento se suspendió el día 11.

En resumen, utilizando un modelo de transferencia adoptiva de la autoinmunidad en la que intervienen los linfocitos T, la administración de la B7-4Fc soluble empeora signos clínicos de la enfermedad provocando un aumento de la mortalidad y el retraso en la recuperación de la parálisis. Estos descubrimientos son coherentes con una mayor activación/infiltración de las células inflamatorias en el SNC y demuestran claramente el potencial inmunorregulador de la proteína B7-4Fc *in vivo*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para modular una respuesta inmunitaria que comprende poner en contacto *in vitro* una célula que expresa B7-4, que es un ligando proteico para PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4, o una proteína que presenta por lo menos un 50 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figuras 3 o 4, o un inmunocito que expresa PD-1, que es el receptor para B7-4, con una sustancia seleccionada de entre el grupo que comprende B7-4, una proteína que comprende un dominio extracelular de B7-4, PD-1 y anticuerpos anti-B7-4, que modula la interacción de B7-4 con PD-1 para, de este modo, modular la respuesta inmunitaria.
- 10 2. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de una sustancia seleccionada de entre el grupo que consiste en: B7-4, que es un ligando proteico para PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4, o una proteína que presenta por lo menos un 50 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figuras 3 o 4, PD-1, que es el receptor para B7-4, y anticuerpos anti-B7-4, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a modular una respuesta inmunitaria, en el que la sustancia modula la interacción de B7-4 con PD-1 para modular, de este modo, la respuesta inmunitaria al entrar en contacto con una célula que expresa B7-4 o un inmunocito que expresa PD-1.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 2, en el que la respuesta inmunitaria se regula por disminución.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 2, en el que se estimula la señalización mediante PD-1 utilizando B7-4.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 2, en el que el inmunocito se selecciona de entre el grupo que consiste en: un linfocito T, un linfocito B y un mielocito.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se provoca anergia en el inmunocito.
7. Procedimiento según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 2, en el que la respuesta inmunitaria se regula por aumento.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 2, en el que se inhibe la señalización mediante PD-1 utilizando una sustancia seleccionada de entre el grupo que consiste en: una forma soluble de B7-4, un anticuerpo que reconoce B7-4 y una forma soluble de PD-1.
- 40 9. Vacuna que comprende un antígeno patogénico y una sustancia seleccionada de entre el grupo que consiste en B7-4, que es un ligando proteico para PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4 o una proteína que presenta por los menos un 50 % identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figuras 3 o 4, una proteína que comprende un dominio extracelular de B7-4, PD-1, que es el receptor para la molécula B7-4, y anticuerpos anti-B7-4, que inhibe la interacción entre B7-4 y PD-1.
- 45 10. Uso de una sustancia seleccionada de entre el grupo que consiste en B7-4, que es un ligando proteico para PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4 o una proteína que presenta por lo menos un 50 % identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figuras 3 o 4, una proteína que comprende un dominio extracelular de B7-4, PD-1, que es el receptor para la molécula B7-4, y anticuerpos anti-B7-4, que inhibe la interacción entre PD-1 y B7-4 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad que se beneficiaría de la regulación por aumento de una respuesta inmunitaria, seleccionándose dicha enfermedad de entre el grupo que consiste en un tumor, un trastorno neurológico o una inmunodepresión.
- 50 11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha sustancia comprende una forma soluble de PD-1 o B7-4.
- 55 12. Uso de una sustancia seleccionada de entre el grupo que consiste en: formas solubles de B7-4, que es un ligando proteico para PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4 o una proteína que presenta por lo menos un 50 % identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figuras 3 o 4, PD-1, que es el receptor para la molécula B7-4, y anticuerpos anti-B7-4, que estimula la señalización en la que interviene la B7-4 mediante el PD-1 en un inmunocito de un paciente, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a tratar dicho paciente que presenta una enfermedad que se beneficiaría de la regulación por disminución de una respuesta
- 60

inmunitaria, seleccionándose dicha enfermedad de entre el grupo que consiste en un trasplante, una alergia o un trastorno autoinmunitario.

- 5
13. Procedimiento para identificar un compuesto que presenta la capacidad de modular la actividad de B7-4, que es un ligando para la proteína PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4 o una proteína que presenta por lo menos un 50 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figura 3 o 4, o la actividad de PD-1 modulando la interacción entre B7-4 y PD-1, que comprende, en una prueba basada en células
- 10
- poner en contacto una célula que expresa B7-4 con el compuesto de prueba y determinar la capacidad de PD-1 para unirse con la célula que expresa B7-4
 - o poner en contacto una célula que expresa PD-1 con el compuesto de prueba y determinar la capacidad de B7-4 para unirse con la célula que expresa PD-1.
- 15
14. Procedimiento para identificar un compuesto que presenta la capacidad de modular la actividad de B7-4, que es un ligando para la proteína PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4 o una proteína que presenta por lo menos un 50 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figura 3 o 4, o la actividad de PD-1 modulando la interacción entre B7-4 y PD-1, que comprende, en una prueba sin células
- 20
- poner en contacto B7-4 con el compuesto de prueba y determinar la capacidad de PD-1 para unirse con B7-4
 - o poner en contacto PD-1 con el compuesto de prueba y determinar la capacidad de B7-4 para unirse con PD-1.
- 25
15. Procedimiento o uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 u 11, en el que la forma soluble de B7-4 es un polipéptido que comprende un dominio extracelular de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en las figuras 3 o 4 o una proteína que presenta por lo menos un 50 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figuras 3 o 4.
- 30
16. Procedimiento, uso o vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en los que B7-4 es una proteína que presenta por lo menos un 60 %, por lo menos un 70 %, por lo menos un 80 %, por lo menos un 90 %, por lo menos un 95 % o un 100 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B7-4 de longitud completa representada en las figuras 3 o 4.
- 35

GCTTCCCGAGGCTCCGCACCAGCCGCGCTTCTGTCCGCCTGCAGGGCATTCCA
GAAAGATGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTG
AACGCATTTACTGTCACGGTTCCTCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTA
GCAATATGACAATTGAATGCAAATCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGC
TGCACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATCAATTTGTGC
ATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTGAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCC
GGCTGTTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGA
TGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGT
GCCGACTACAAGCGAATTAAGTGTGAAAGTCAATGCCCCATACAACAAAATCA
ACCAAAGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGT
CAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATC
AAGTCCTGAGTGGTAAGACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGC
TTTTCAATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTT
CTACTGCACTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTG
GTCATCCCAGGTAATATTCTGAATGTGTCCATTAATAATATGTCTAACACTGTC
CCCTAGCACCTAGCATGATGTCTGCCTATCATAGTCATTCAGTGATTGTTGAA
TAAATGAATGAATGAATAACACTATGTTTACAAAATATATCCTAATTCCTCAC
CTCCATTCATCCAAACCATATTGTTACTTAATAAACATTCAGCAGATATTTAT
GGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 1

CGAGGCTCCGCACCAGCCGCGCTTCTGTCCGCCTGCAGGGCATTCCAGAAAGA
 TGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTGAACGCATT
 TACTGTCACGGTTCCTCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGAC
 AATTGAATGCAAATTCCTCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACTAATTGT
 CTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAG
 ACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCCGGCTGTTGAAGGAC
 CAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGAT
 GCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAAT
 TACTGTGAAAGTCAATGCCCATACAACAAAATCAACCAAAGAATTTTGGTTGT
 GGATCCAGTCACTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCA
 AGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATCAAGTCCTGAGTGGTAAGACC
 ACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAGAAGCTTTTCAATGTGACCAGCACACT
 GAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTTCTACTGCACTTTTAGGAGATTAGA
 TCCTGAGGAAAACCATAACAGCTGAATTGGTCATCCCAGAACTACCTCTGGCACA
 TCCTCCAAATGAAAGGACTCACTTGGTAATTCTGGGAGCCATCTTATTATGCCTT
 GGTGTAGCACTGACATTCATCTTCCGTTTAAGAAAAGGGAGAATGATGGATGT
 GAAAAAATGTGGCATCCAAGATACAACTCAAAGAAGCAAAGTGATACACATTT
 GGAGGAGACGTAATCCAGCATTGGAACCTTCTGATCTTCAAGCAGGGATTCTCA
 ACCTGTGGTTTAGGGGTTTCATCGGGGCTGAGCGTGACAAGAGGAAGGAATGG
 GCCCGTGGGATGCAGGCAATGTGGGACTTAAAAGGCCCAAGCACTGAAAATG
 GAACCTGGCGAAAGCAGAGGAGGAGAATGAAGAAAGATGGAGTCAAACAGGG
 AGCCTGGAGGGAGACCTTGATACTTTCAAATGCCTGAGGGGCTCATCGACGCC
 TGTGACAGGGAGAAAGGATACTTCTGAACAAGGAGCCTCCAAGCAAATCATCC
 ATTGCTCATCCTAGGAAGACGGGTTGAGAATCCCTAATTTGAGGGTCAGTTCCT
 GCAGAAGTGCCCTTTGCCTCCACTCAATGCCTCAATTTGTTTTCTGCATGACTGA
 GAGTCTCAGTGTGGAACGGGACAGTATTTATGTATGAGTTTTTCCTATTTATTT
 TGAGTCTGTGAGGTCTTCTTGTGATGTGAGTGTGGTGTGAATGATTTCTTTTGA
 AGATATATTGTAGTAGATGTTACAATTTTGTGCGCCAAACTAACTTGCTGCTTAA
 TGATTTGCTCACATCTAGTAAAACATGGAGTATTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 2

292 secretados (245 aminoácidos)

Señal / IgV / IgC / cola hidrófila
 (a) (b) (c) (d)

Cisteínas de Ig en **negrita** grande

MRIFAVFIFMTYWHLLNA (señal)
 FTVTPKDLVVEYGSNMTIE**C**KFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKN
 IIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDKQLSLGNAALQITDVKLQD
 AGVYR**C**MISYGGADYKRITVKVNAPY (IgV)
 NKINQRILLVDPVTSEHELT**C**QAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT
 TTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFY**C**TFRRLLDPEENHTAEL
 VIP (IgC)
 GNILLNSIKICLTLSPST (cola hidrófila)

FIGURA 3

292 membrana (290 aminoácidos)

Señal / IgV / IgC / transmembrana (subrayado)
 más citoplasmático

Cisteínas de Ig en **negrita** grande

MRIFAVFIFMTYWHL^(señal)LLNA

FTVTPKDLVVEYGSNMTIE**C**KFPVEKQLDLAALIVWEMEDKN
 IIQFVHGEE^(IgV)DLKVQHSSYRQRARLLKDKQLSLGNAALQITDVKLQD
 AGVYR**C**MISYGGADYKRITVKVNAPY

NKINQRILVDPVTSEHELT**C**QAEGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKT
 TTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFY**C**TFRRLLDPEENHTAEL
 VIP ^(IgC)

ELPLAHPNER**THLVILGALLLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKC**
 GIQDTNSKKQSD**THLEET** (transmembrana más citoplasmático)

FIGURA 4

AGATAGTTCCCAAACATGAGGATATTTGCTGGCATTATATTCACAGCCTGC
 TGTCACCTTGCTACGGGCGTTTACTATCACGGCTCCAAAGGACTTGTACGTG
 GTGGAGTATGGCAGCAACGTCACGATGGAGTGCAGATTCCCTGTAGAACG
 GGAGCTGGACCTGCTTGCCTTAGTGGTGTACTGGGAAAAGGAAGATGAGC
 AAGTGATTCAGTTTGTGGCAGGAGAGGAGGACCTTAAGCCTCAGCACAGCA
 ACTTCAGGGGGAGAGCCTCGCTGCCAAAGGACCAGCTTTTGAAGGGAAAT
 GCTGCCCTTCAGATCACAGACGTCAAGCTGCAGGACGCAGGGCGTTTACTGC
 TGCATAATCAGCTACGGTGGTGCGGACTACAAGCGAATCACGCTGAAAGTC
 AATGCCCCATACCGCAAATCAACCAGAGAATTTCCGTGGATCCAGCCACTT
 CTGAGCATGAACTAATATGTCAAGGCCGAGGGTTATCCAGAAGCTGAGGTAA
 TCTGGACAAACAGTGACCACCAACCCGTGAGTGGGAAGAGAAGTGTACCA
 CTTCCCGGACAGAGGGGATGCTTCTCAATGTGACCAGCAGTCTGAGGGTCA
 ACGCCACAGCGAATGATGTTTTCTACTGTACGTTTTGGAGATCACAGCCAG
 GGCAAACACACAGCGGAGCTGATCATCCAGAAGTGCCTGCAACACATC
 CTCCACAGAACAGGACTCACTGGGTGCTTCTGGGATCCATCCTGTTGTTCC
 TCATTGTAGTGTCCACGGTCCTCCTCTTCTTGAGAAAACAAGTGAGAATGCT
 AGATGTGGAGAAATGTGGCGTTGAAGATAACAAGCTCAAAAACCGAAATGA
 TACACAATTCGAGGAGACGTAAGCAGTGTTGAACCCTCTGATCGTCGATTG
 GCAGCTTGTGGTCTGTGAAAGAAAGGGCCCATGGGACATGAGTCCAAAGAC
 TCAAGATGGAACCTGAGGGAGAGAACCAAGAAAGTGTGGGAGAGGAGCC
 TGGAACAACGGACATTTTTTCCAGGGAGACACTGCTAAGCAAGTTGCCCAT
 CAGTCGTCTTGGGAAATGGATTGAGGGTTCCTGGCTTAGCAGCTGGTCCTT
 GCACAGTGACCTTTTCTCTGCTCAGTGCCGGGATGAGAGATGGAGTCATG
 AGTGTTGAAGAATAAGTGCCTTCTATTTATTTGAGTCTGTGTGTTCTCACTT
 TGGGCATGTAATTATGACTGGTGAATTCTGACGACATGATAGATCTTAAGAT
 GTAGTCACCAAACCTCAACTGCTGCTTAGCATCCTCCGTAACACTGATACAA
 GCAGGGAACACAGAGGTCACCTGCTTGGTTTGACAGGCTCTTGCTGTCTGA
 CTCAAATAATCTTTATTTTTTCAAGTCTCAAGGCTCTTCGATAGCAGTTGTTCT
 GTATCAGCCTTATAGGTGTCAGGTATAGCACTCAACATCTCATCTCATTACA
 ATAGCAACCCTCATCACCATAGCAACAGCTAACCTCTGTTATCCTCACTTCA
 TAGCCAGGAAGCTGAGCGACTAAGTCACTTGCCACAGAGTATCAGCTCTC
 AGATTTCTGTTCTTCAGCCACTGTCTTTTCAAGGATAGAATTTGTCGTTAAGAA
 ATTAATTTAAAACTGATTATTGAGTAGCATTGTATATCAATCACAAACATGCC
 TTGTGCACTGTGCTGGCCTCTGAGCATAAAGATGTACGCCGGAGTACCGGT
 CGGACATGTTTATGTGTGTTAAATACTCAGAGAAATGTTTATTAAACAAGGAG
 CTTGCATTTTAGAGACACTGGAAAGTAACTCCAGTTCATTGTCTAGCATTAC
 ATTTACCTCATTGCTATCCTTGCCATACAGTCTCTTGTCTCCATGAAGTGT
 CATGAATCTTGTTGAATAGTTCTTTTATTTTTTAAATGTTTCTATTTAAATGATA
 TTGACATCTGAGGCGATAGCTCAGTTGGTAAAACCCTTTTCTCACAAGTGTG
 AAACCCTGAGTCTTATCCCTAGAACCACATAAAAAACAGTTGCGTATGTTT
 GTGCATGCTTTTATCCAGCACTAGGGAGGCAGAGGCAGGCAGATCCTG
 AGCTCTCATTGACCACCCAGCCTAGCCTACATGGTTAGCTCCAGGCCTACA
 GGAGCTGGCAGAGCCTGAAAACGATGCCTAGACACACACACACACACACA
 CA
 CA
 CTCCTACACATGCACACACATAAATTCAAACACAAATCAACAGGGGAATTGT

Figura 5

CTCAGAATGGTCCCCAAGACAAAGAAGAAGAAAAACACCAAACCAGCTCTA
TTCCCTCAGCCTATCCTCTCTACTCCTTCCTAGAAAGCAACTACTATTGTTTT
GTATATAAATTTACCCAACGACAGTTAATATGTAGAATATATATTAAGTGTC
TGCAATATATATTATCTCTTTCTTTCTTTCTTCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTC
TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTC
CTTCCTTCCTTCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTTTCTGTCTATCTGTACCTAAA
TGGTTGCTCACTATGCATTTCTGTGCTCTTCGCCCTTTTTATTTAATGTATG
GATATTTATGCTGCTTCCAGAATGGATCTAAAGCTCTTTGTTTCTAGGTTTTTC
TCCCCATCCTTCTAGGCATCTCTCACACTGTCTAGGCCAGACACCATGTCT
GCTGCCTGAATCTGTAGACACCATTTATAAAGCACGTACTIONCACCGAGTTTGT
ATTTGGCTTGTTCTGTGTCTGATTAAAGGGAGACCATGAGTCCCCAGGGTA
CACTGAGTTACCCAGTACCAAGGGGGAGCCTTGTTTGTGTCTCCATGGCA
GAAGCAGGCCTGGAGCCATTTTGGTTTCTTCCTTGACTTCTCTCAAACACAG
ACGCCTCACTTGCTCATTACAGGTTCTCCTTTGGGAATGTCAGCATTGCTCC
TTGACTGCTGGCTGCCCTGGAAGGAGCCCATTAGCTCTGTGTGAGCCCTTG
ACAGCTACTGCCTCTCCTTACCACAGGGGCCTCTAAGATACTGTTACCTAGA
GGTCTTGAGGATCTGTGTTCTCTGGGGGGAGGAAAGGAGGAGGAACCCAG
AACTTTCTTACAGTTTTCTTTGTTCTGTACATGTCAAGACTGAAGGAACAG
GCTGGGCTACGTAGTGAGATCCTGTCTCAAAGGAAAGACGAGCATAGCCGA
ACCCCCGGTGGAAACCCCTCTGTTACCTGTTACACACAAGCTTATTGATGAGT
CTCATGTTAATGTCTTGTTTGTATGAAGTTTAAGAAAATATCGGGTTGGGCAA
CACATTCTATTTATTCATTTTATTTGAAATCTTAATGCCATCTCATGGTGTGG
ATTGGTGTGGCACTTTATTCTTTTGTGTTGTGTATAACCATAAATTTTATTTTG
CATCAGATTGTCAATGTATTGCATTAATTTAATAAATATTTTTATTTATTA
AAAAA

Figura 5
(continuación)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYWEYGSNVTMECRFPVERELDLLALWYWEKEDEQVIQFVAGEE
DLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGGADYKRITLKNAPYRKINQRISV
DPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWR
SQPGQNHTAELIPELPATHPPQNRTHWLLGSILLFLIVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRN
DTQFEET.

Figura 6

m67H vs. h67-4

69% de identidad

m67-4 1 MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLVYVEYGSNVTECRFPVPERELDLLALVVYWEKE 60
 MRIFA IF HLL AFT+T PKDLYVVEYGSN+T+EC+FPVE++L DL AL+VYWE E
 h67-4 1 MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVYVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWE ME 60
 m67-4 61 DEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGG 120
 D+ +IQFV GEEDLK QHS++R RA L KDQL GNAALQITDVKLQDAGVY C+ISYGG
 h67-4 61 DKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKQDLSLGNAAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG 120
 m67-4 121 ADYKRITLKVNPYRKINQRI-SVDPATSEHELIQAEGYPEAEVIWNSDHPVSGKRS 179
 ADYKRIT+KVNAPY KINQRI VDP TSEHEL CQAEYGP+AEVIWT+SDHQ +SGK +
 h67-4 121 ADYKRITVKNAPYKINQRIILVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWNTSSDHPVLSGKTT 180
 m67-4 180 VTTSRTEGMLLNVTSRLRVNATANDVFYCTFWRSPQGNHTAELIIPELPATHPPQNRTH 239
 T S+ E L NVTS+LR+N T N++FYCTF R P +NHTAEL+IPELP HPP RTH
 h67-4 181 TTNSKREKLFNVTSTLRINTTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTH 240
 m67-4 240 WVLGSI LLFLVIVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET 290
 V+LG+ILL L V T + LRK RM+DV+KCG++DT+SK ++DT EET
 h67-4 241 LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG-RMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET 290

Figura 7

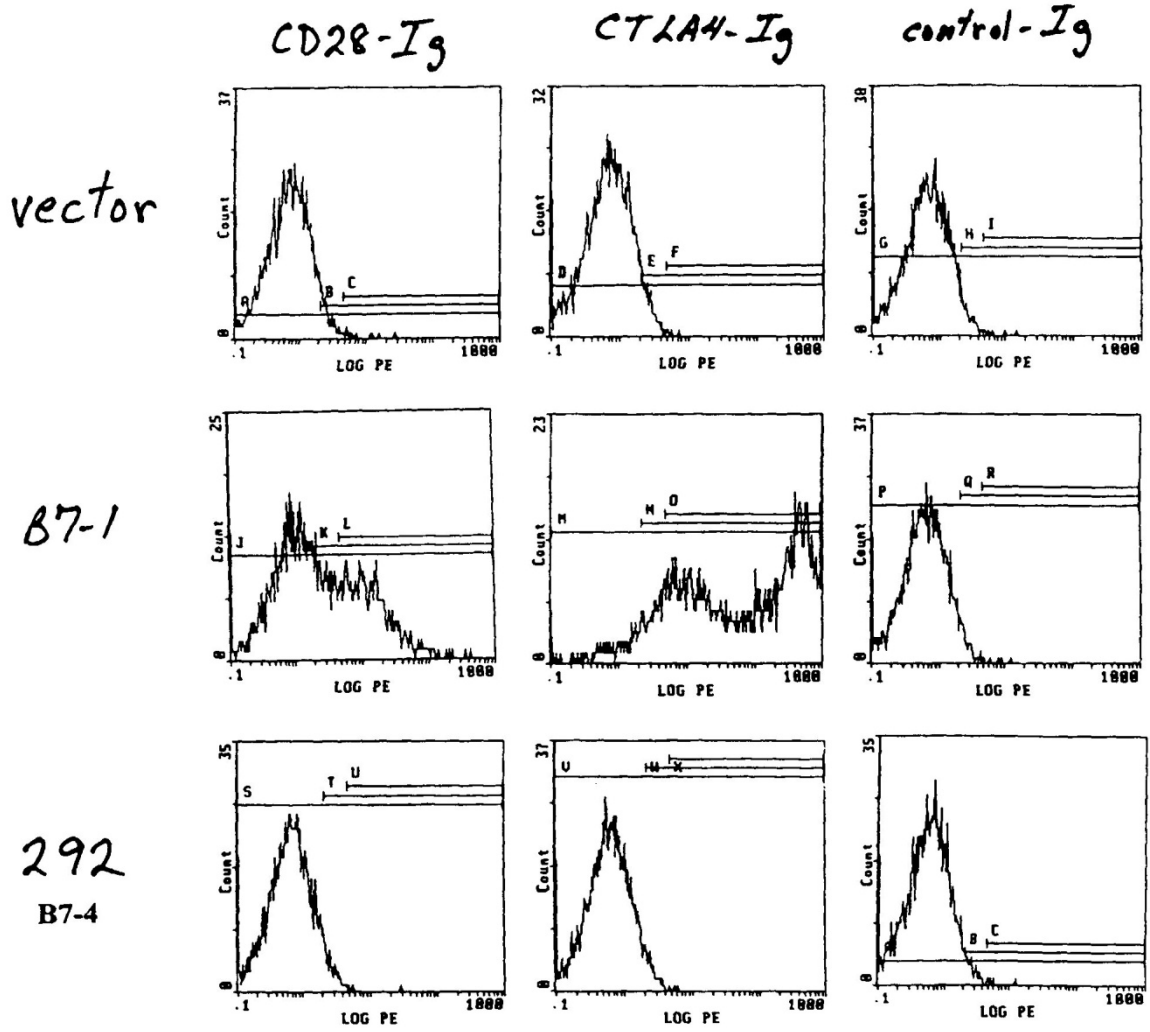


Figure 8

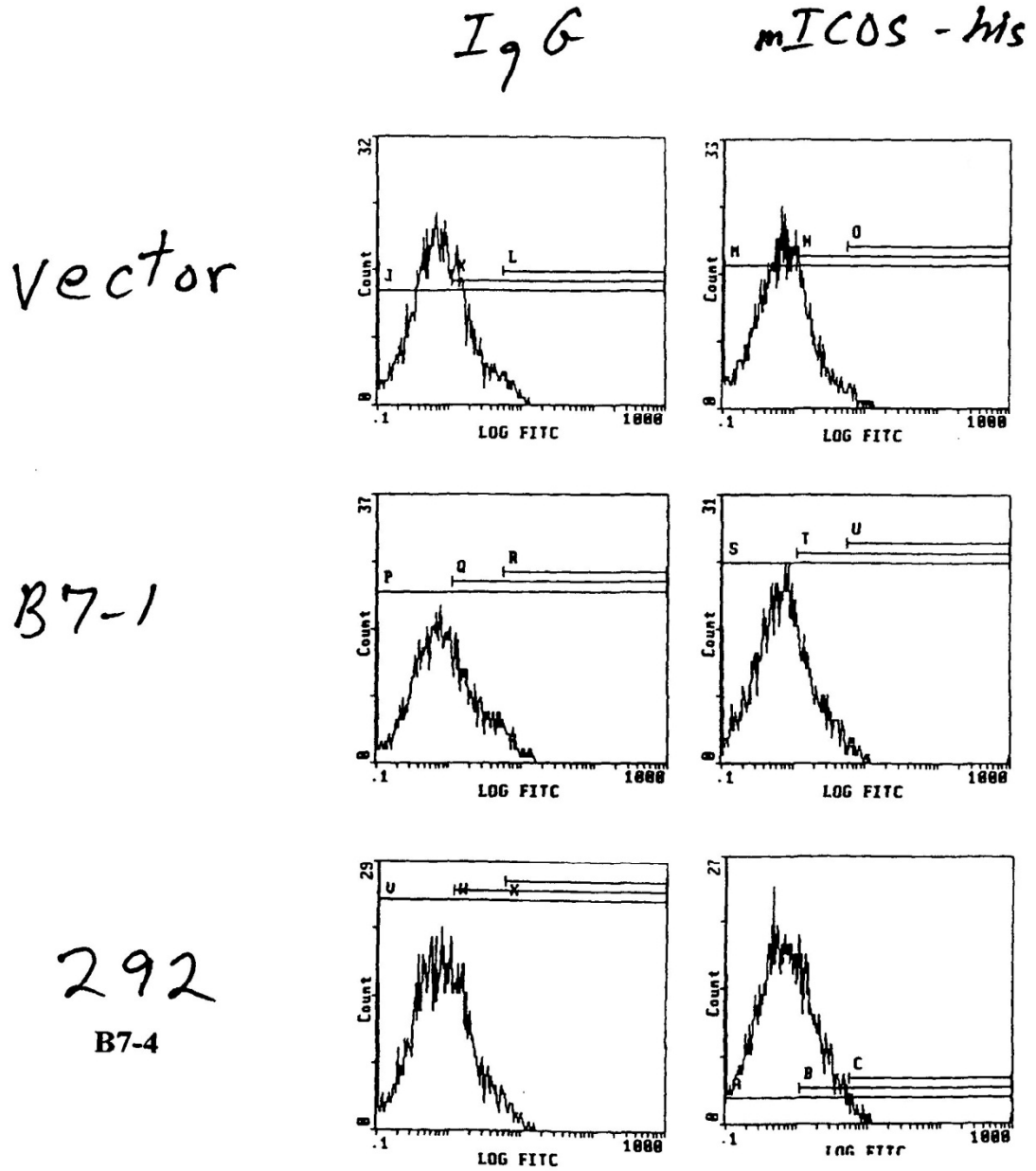


Figura 9

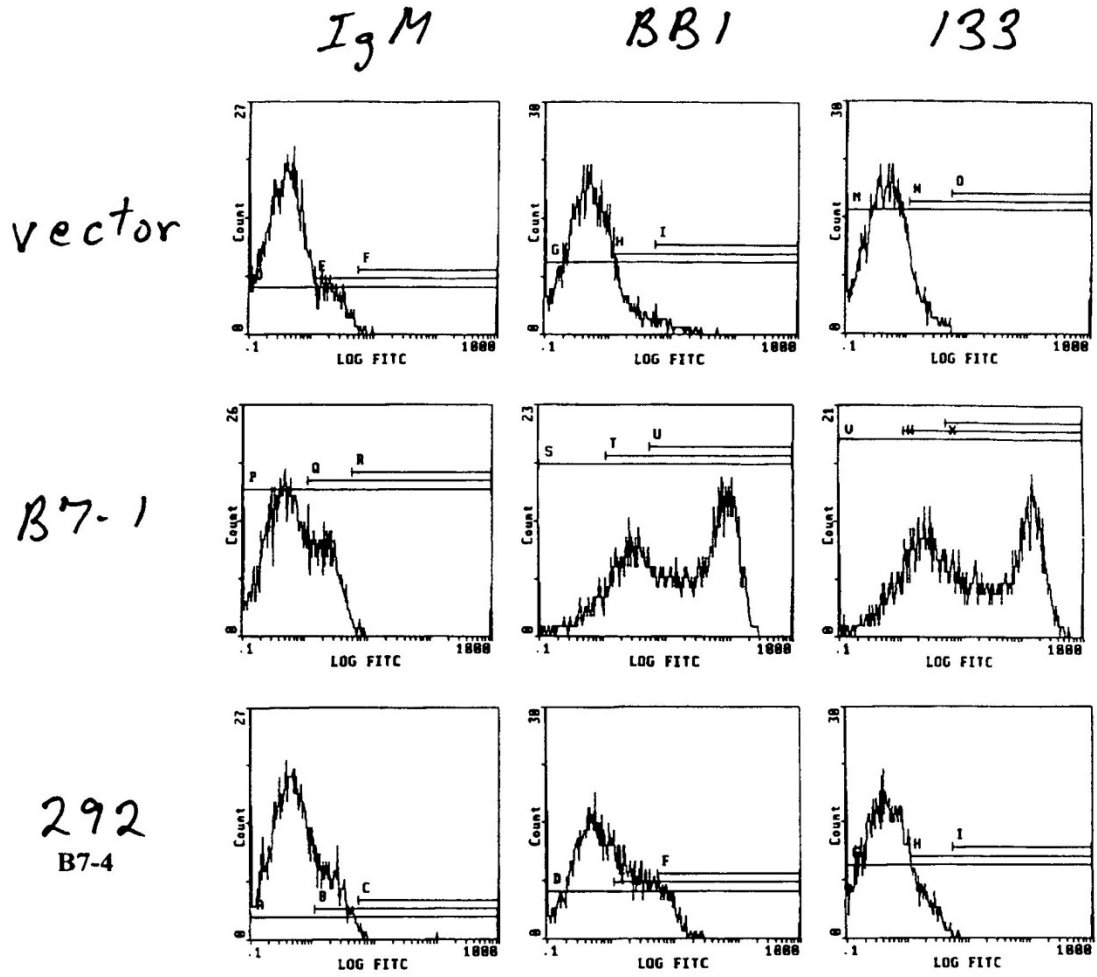


Figura 10

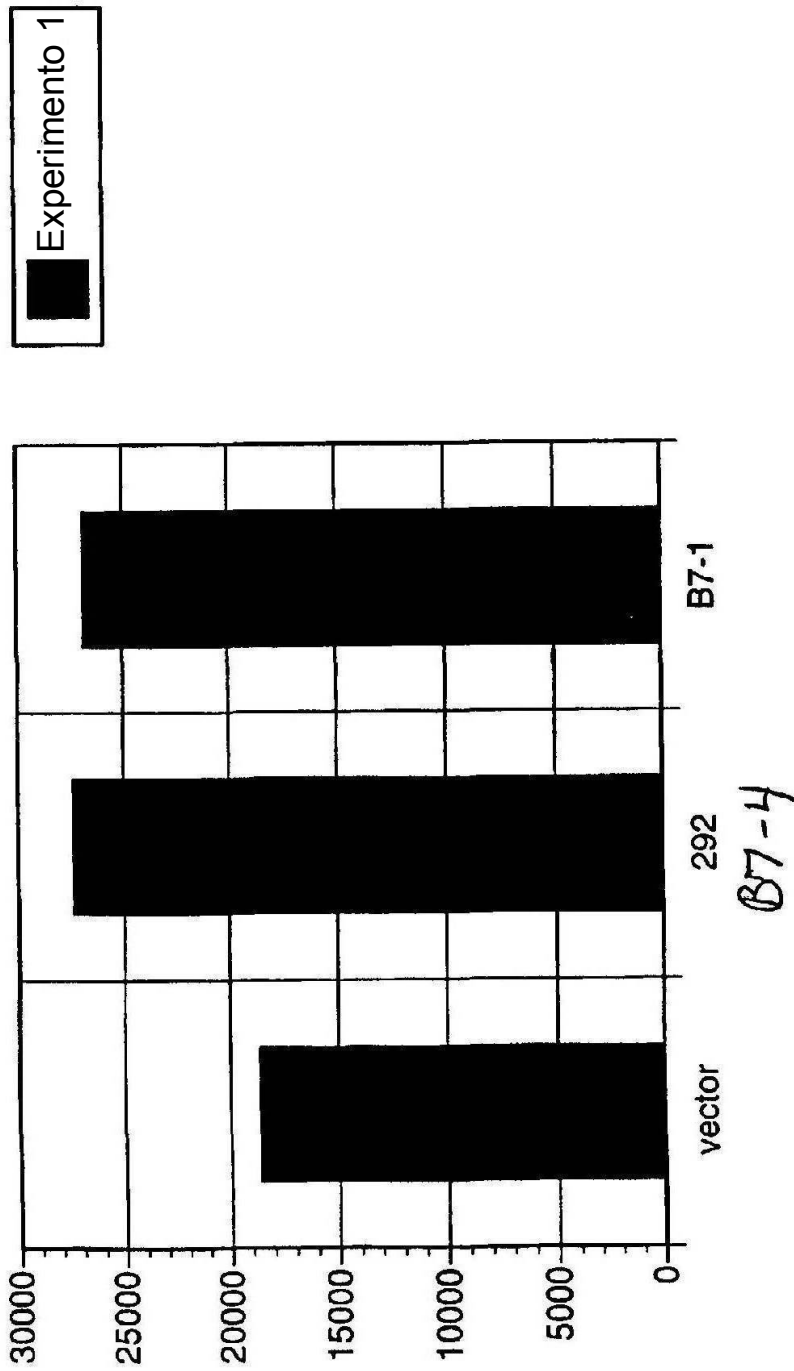


Figura 11

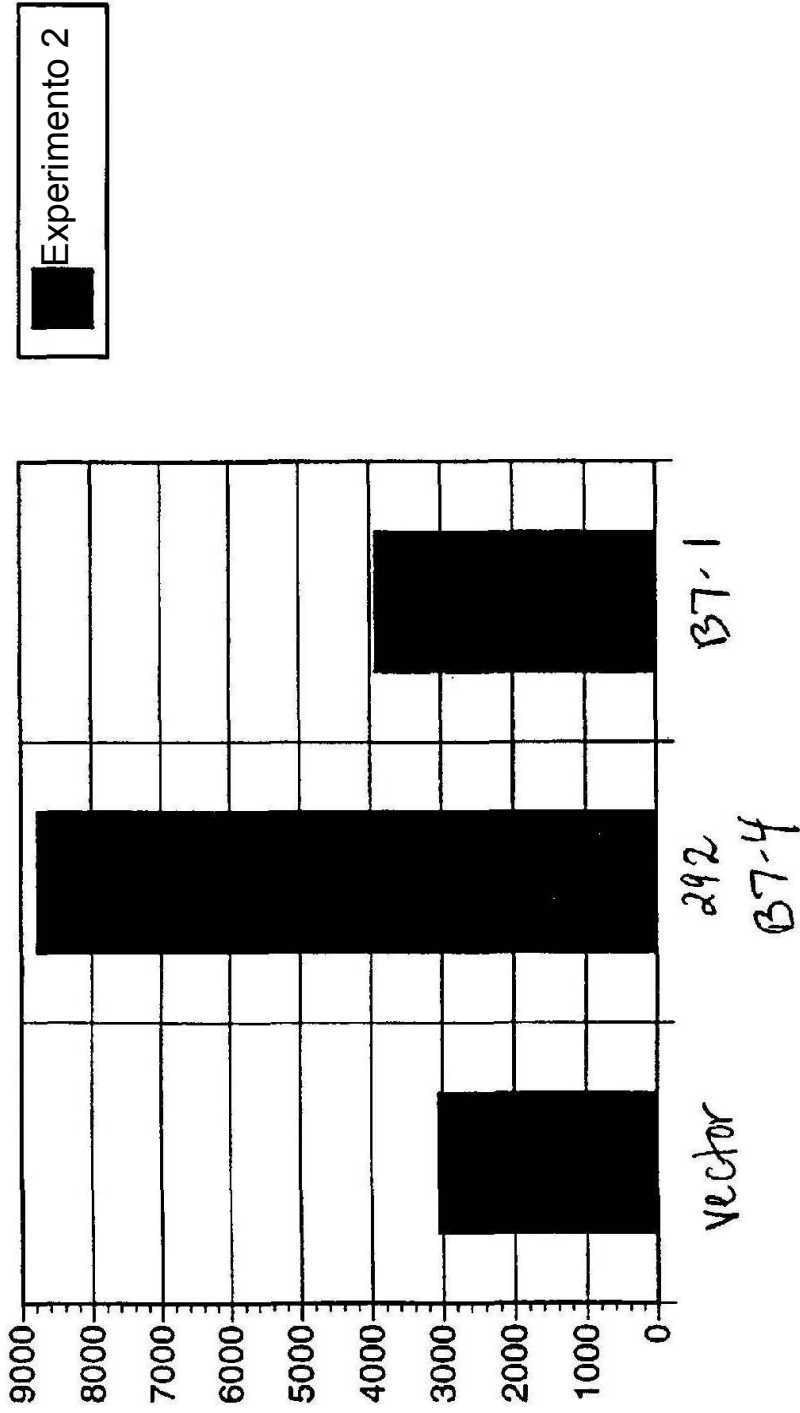
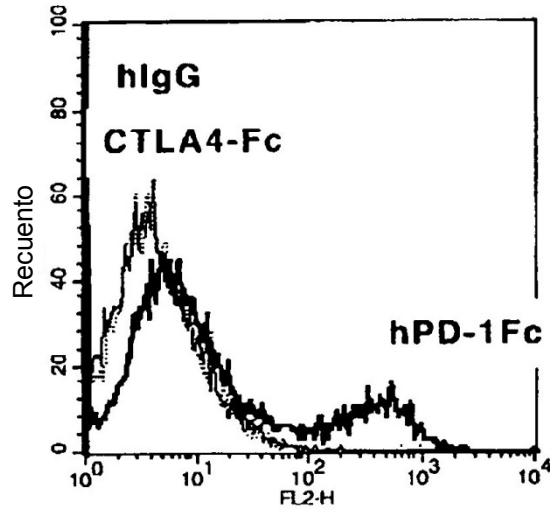
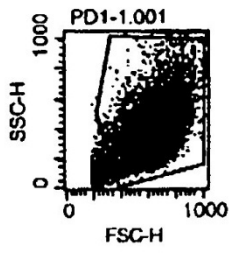
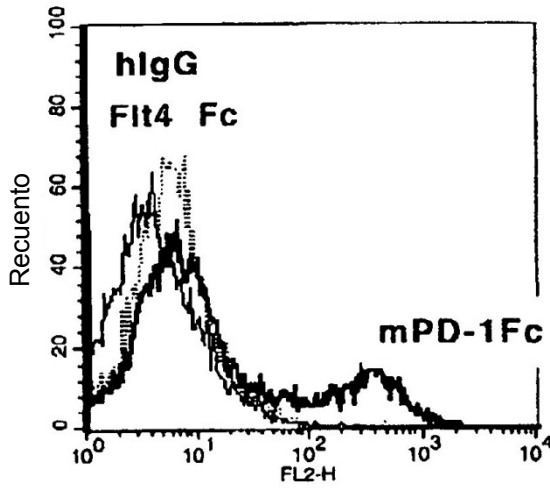


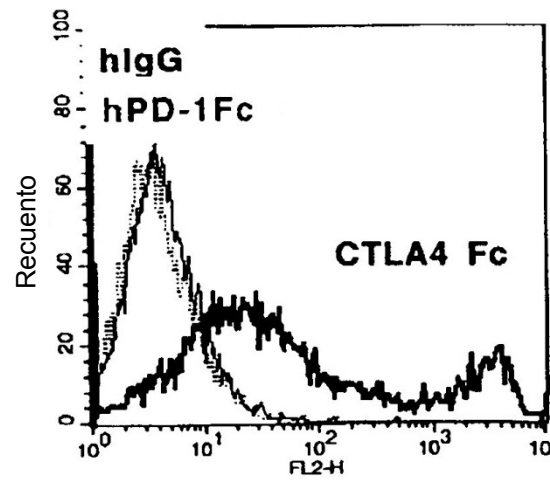
Figura 12



292
B7-4



292
B7-4



B7.1

Figura 13

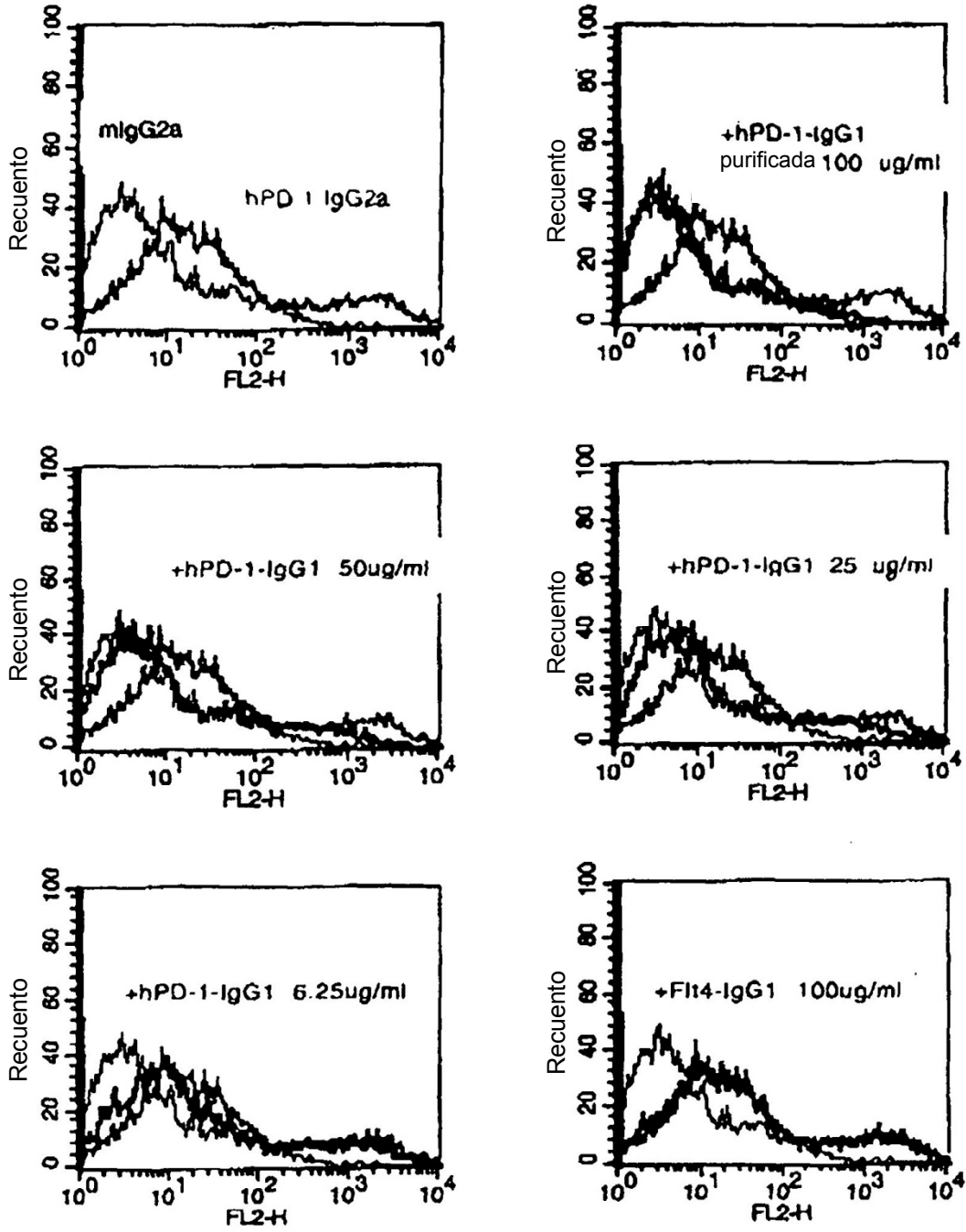


Figura 14

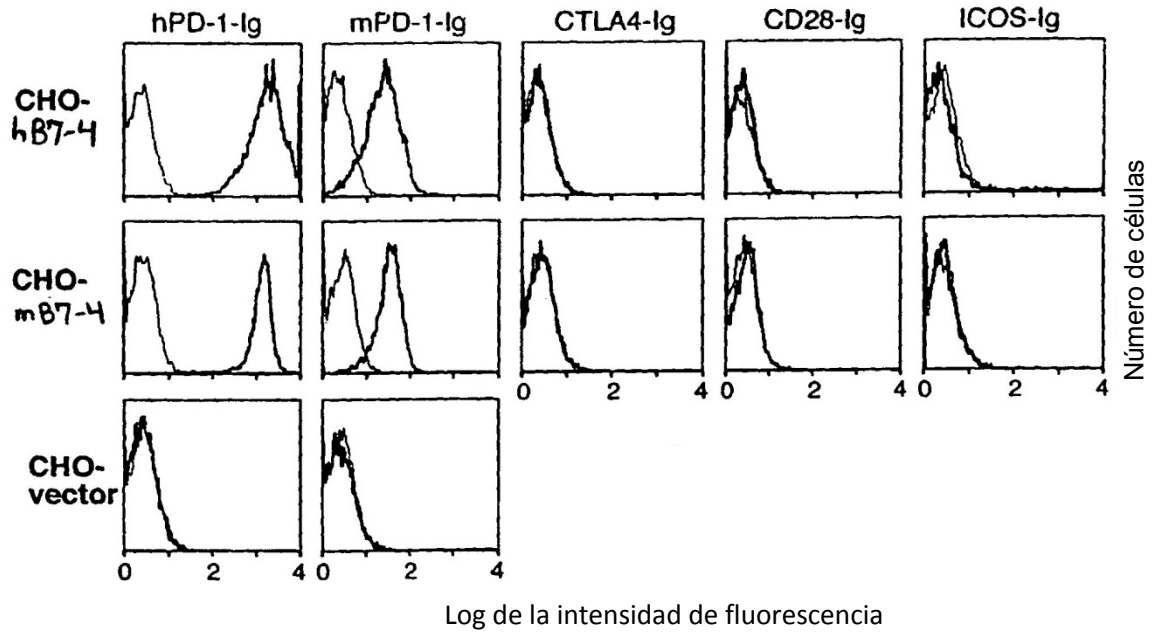


Figura 15

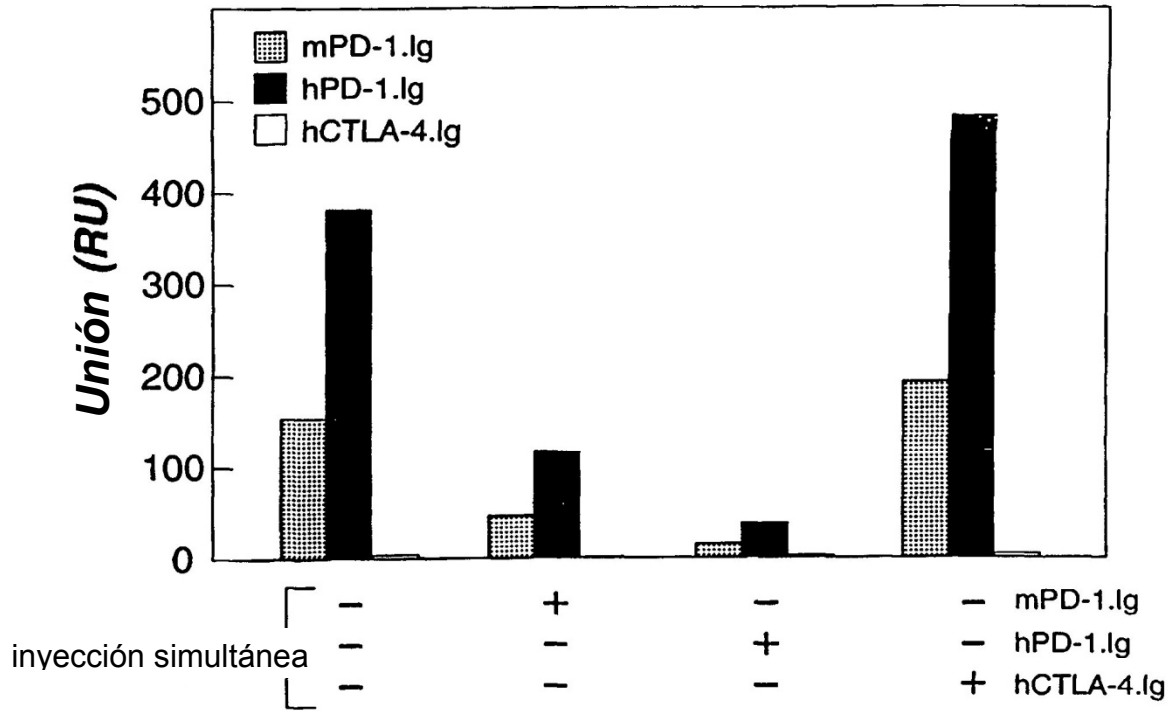


Figura 16

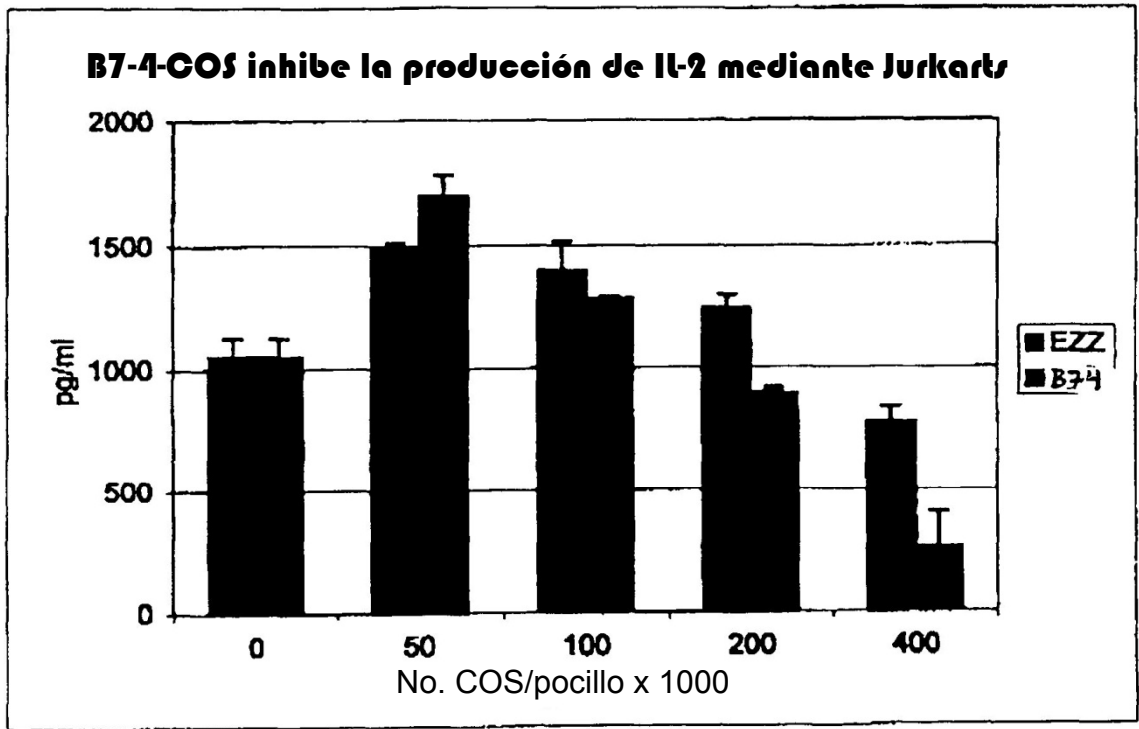


Figura 17

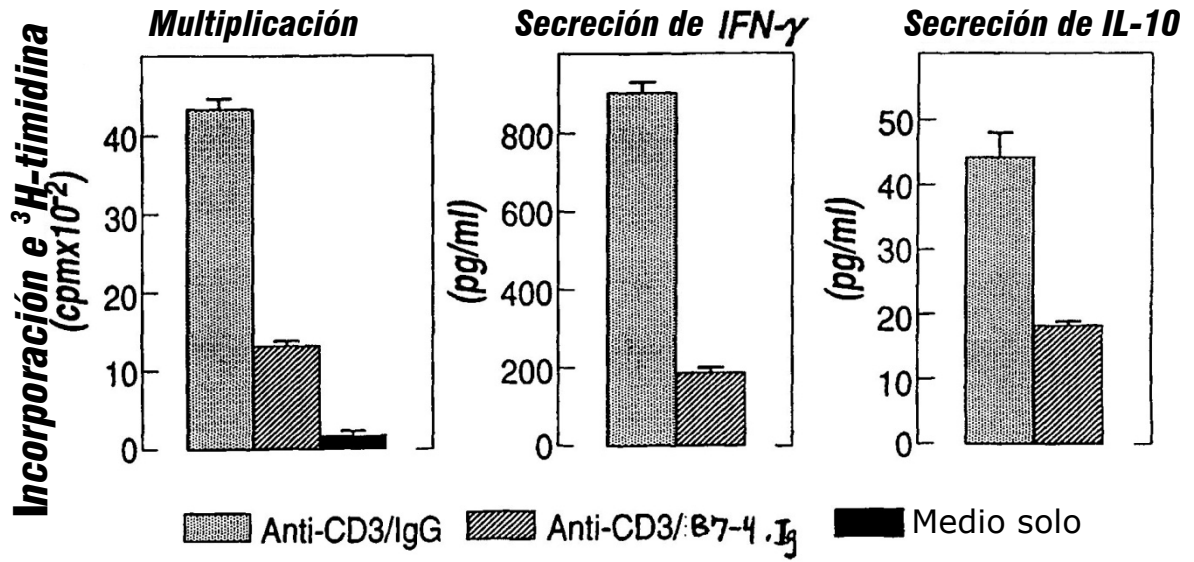


Figura 18

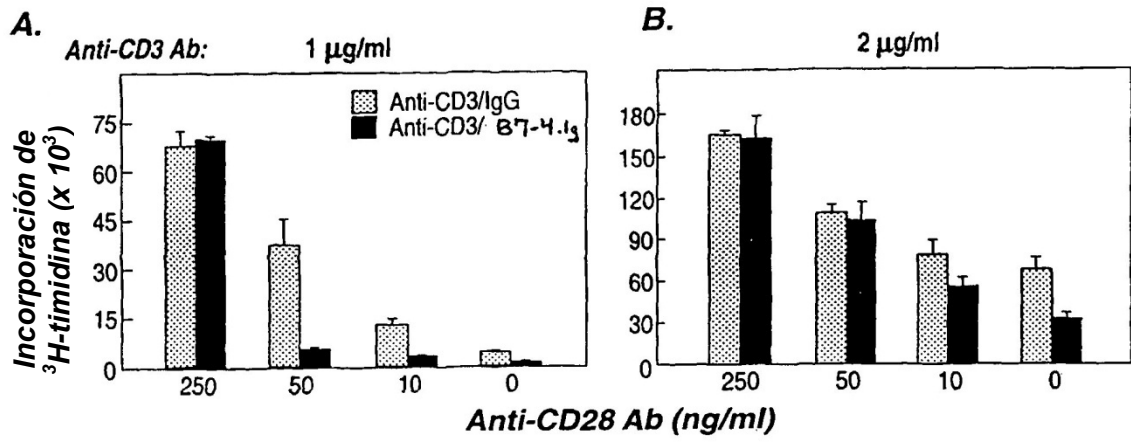
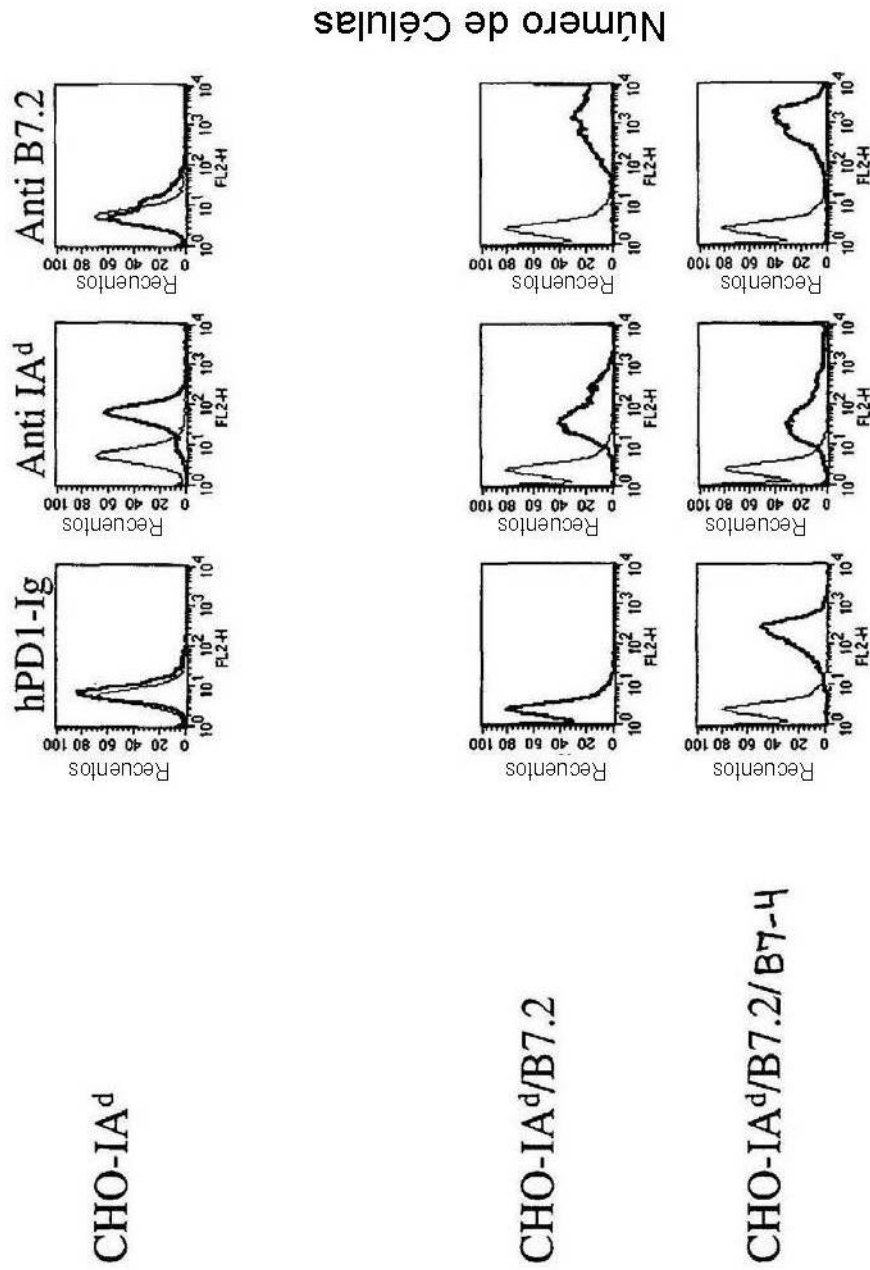


Figura 19



Número de Células

Log Fluorescencia

FIGURA 20

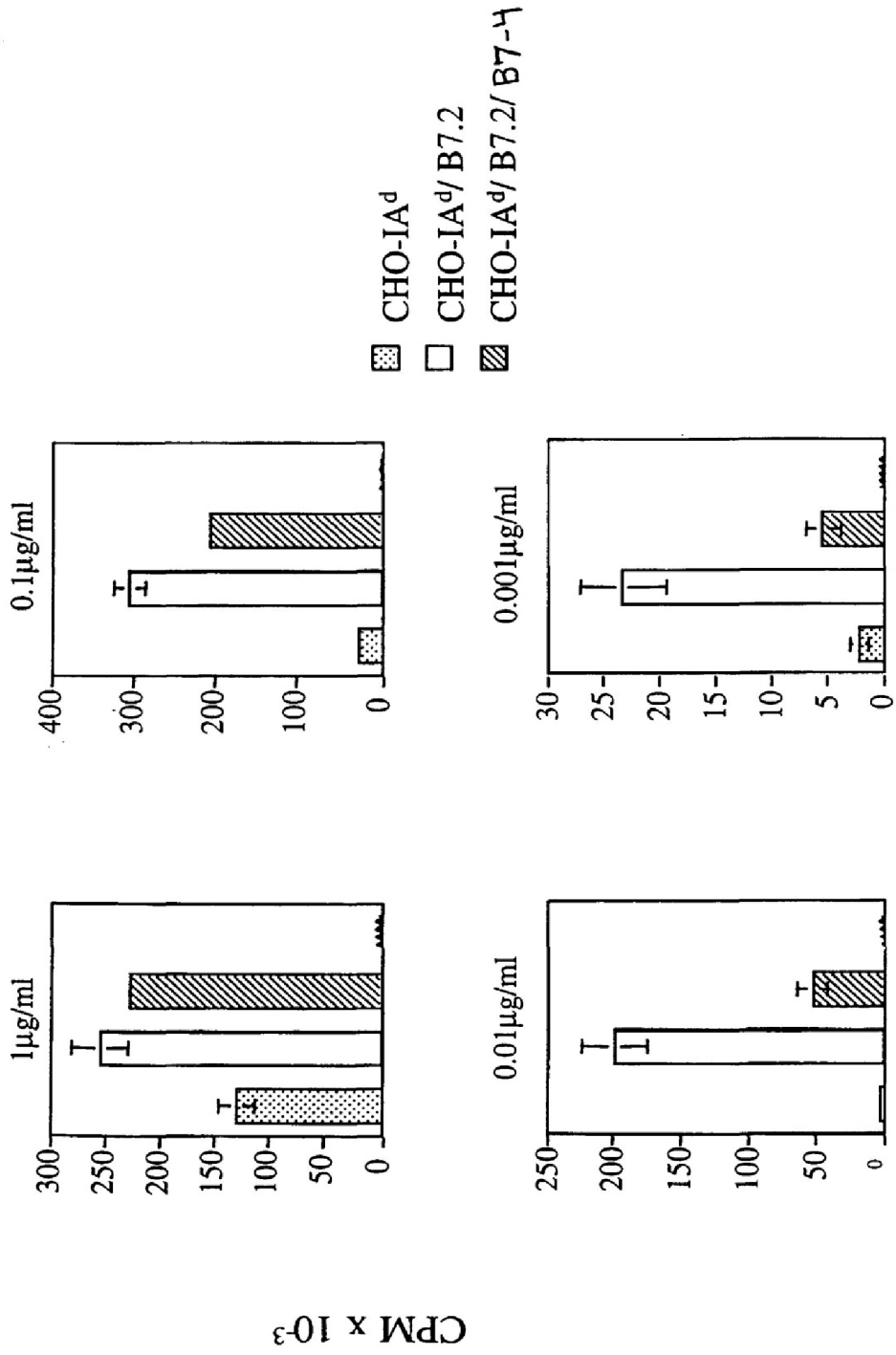


FIGURA 2A

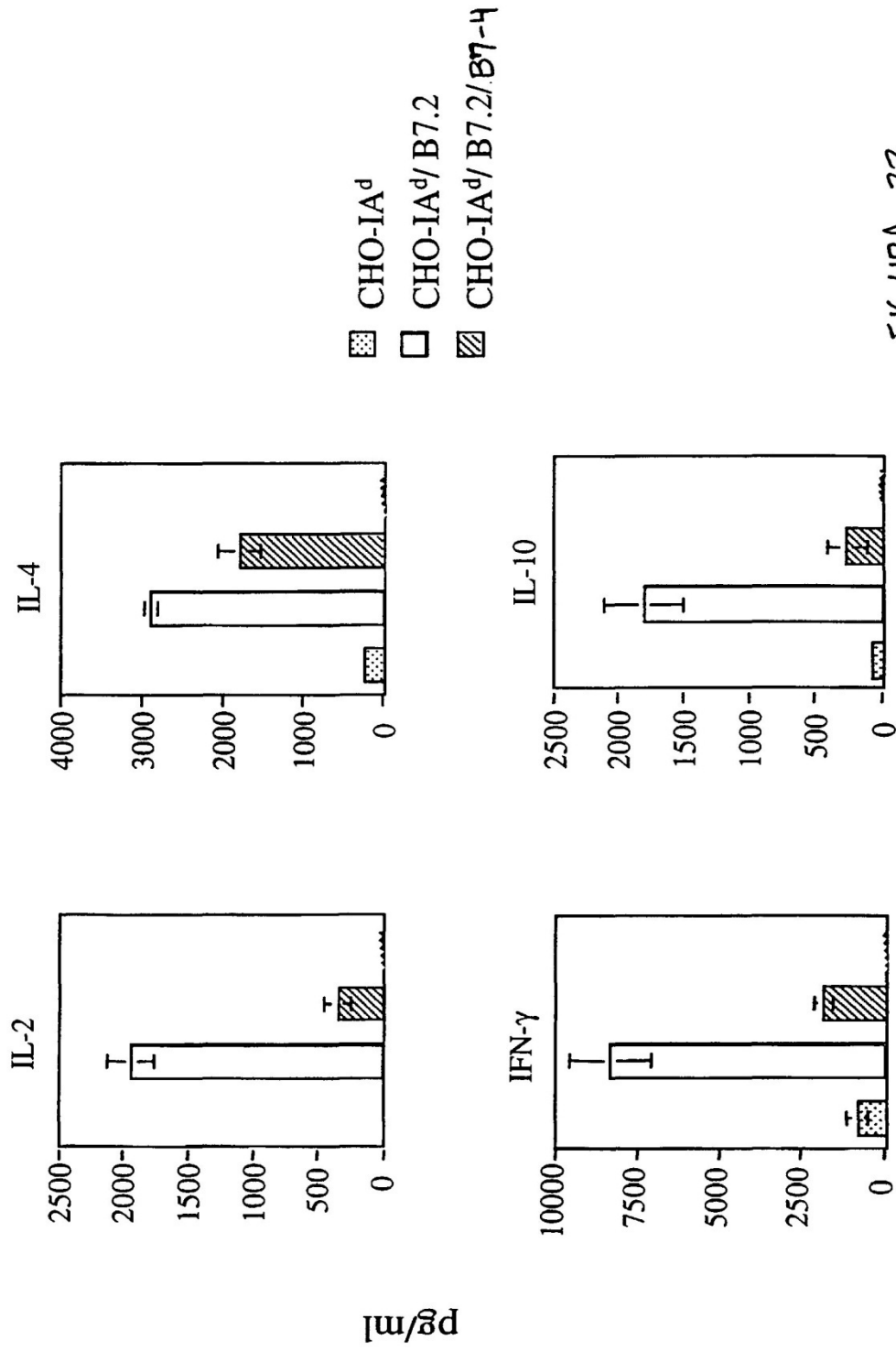


FIGURE 22

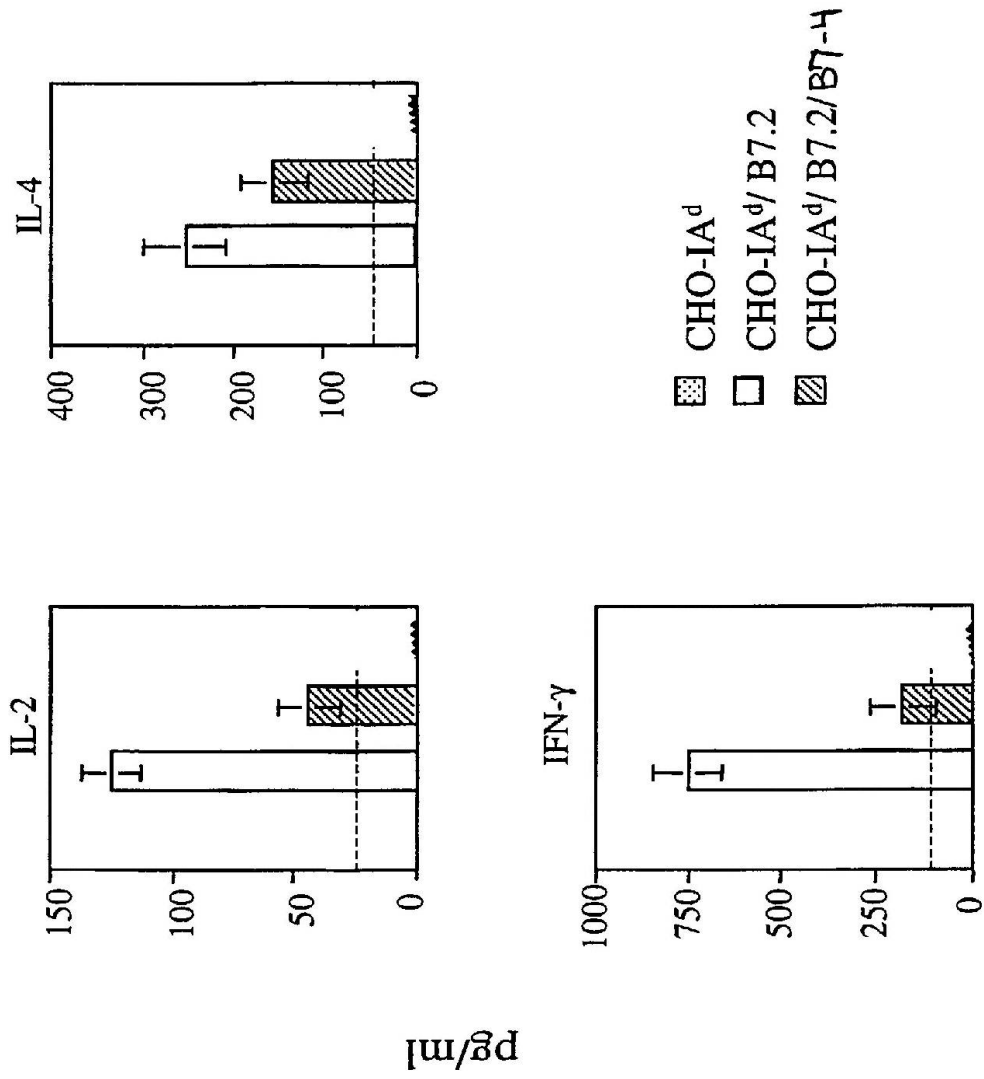
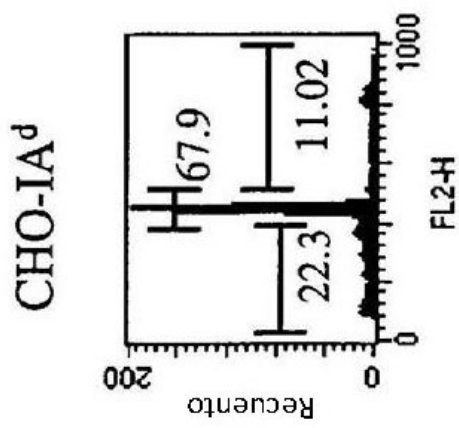
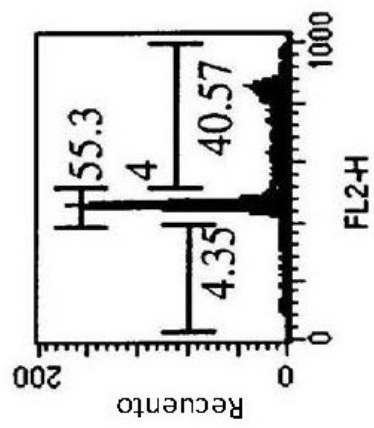


FIGURA 23



CHO-IA^d/B7.2



CHO-IA^d/B7.2/ B7-4

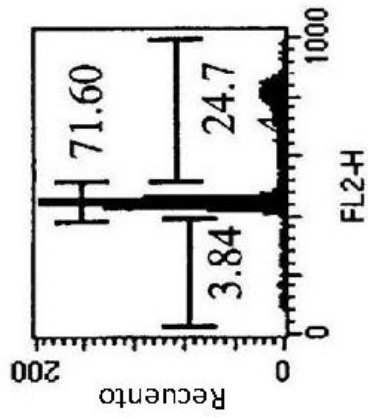
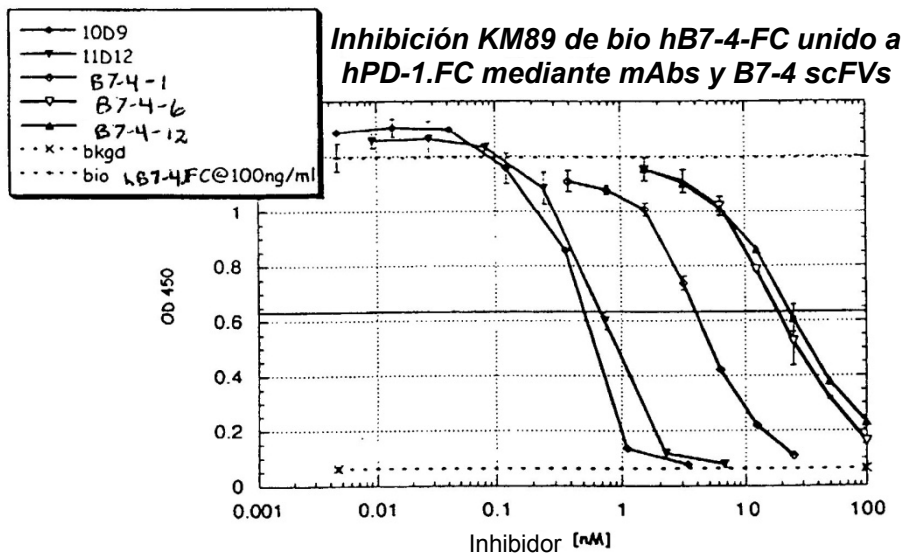
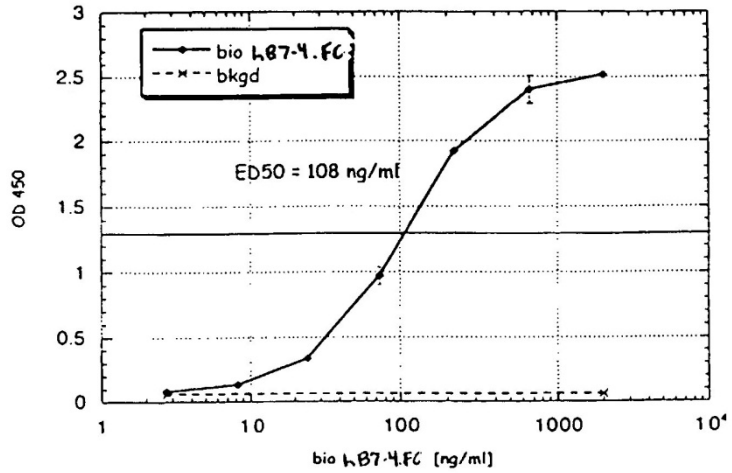


FIGURA 24

**Curva de unión de bio hB7-4-FC (TV2001)
con hPD-1-FC**



Inhibidor	IC50
10D9	0.5
11D12	0.7
B7-4-1	4
B7-4-6	19
B7-4-12	24

Figura 25

Inhibición de unión de bio B7-4 mediante un clon 17 de PD-1

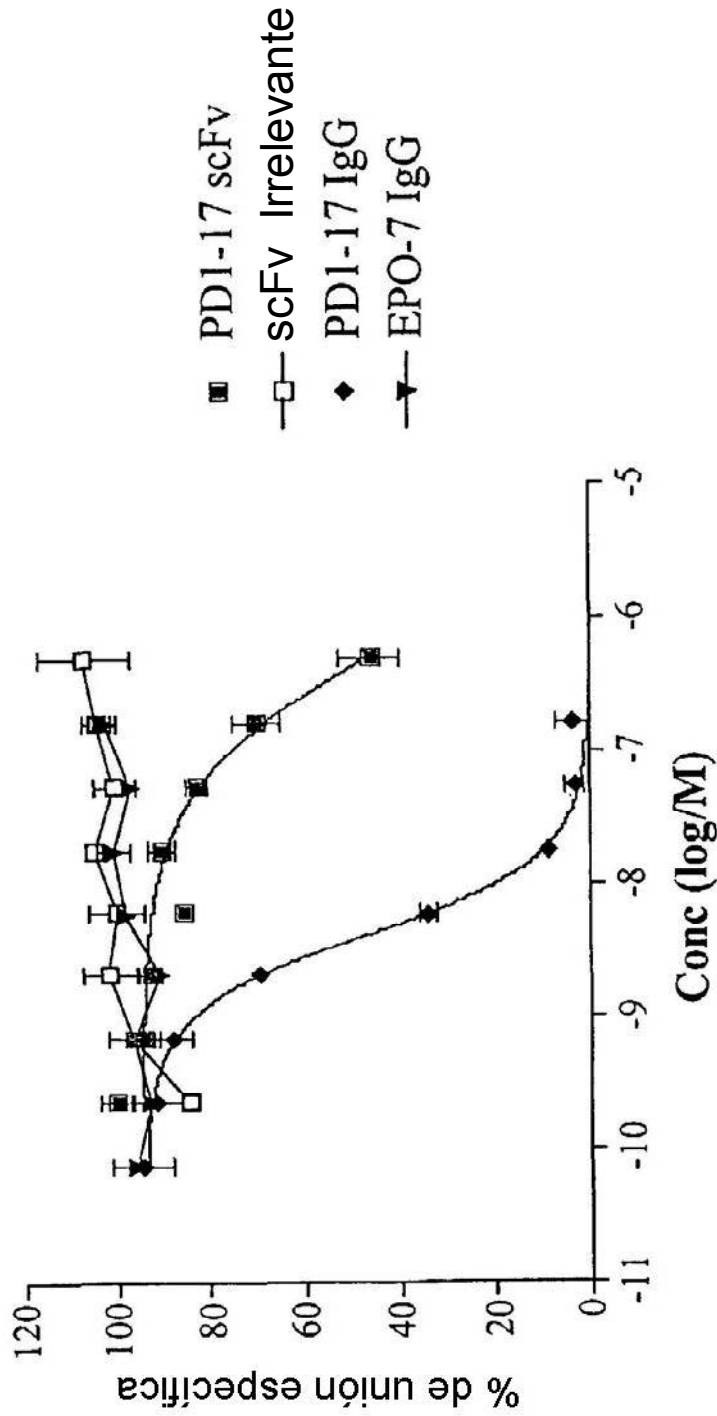


FIGURA 26

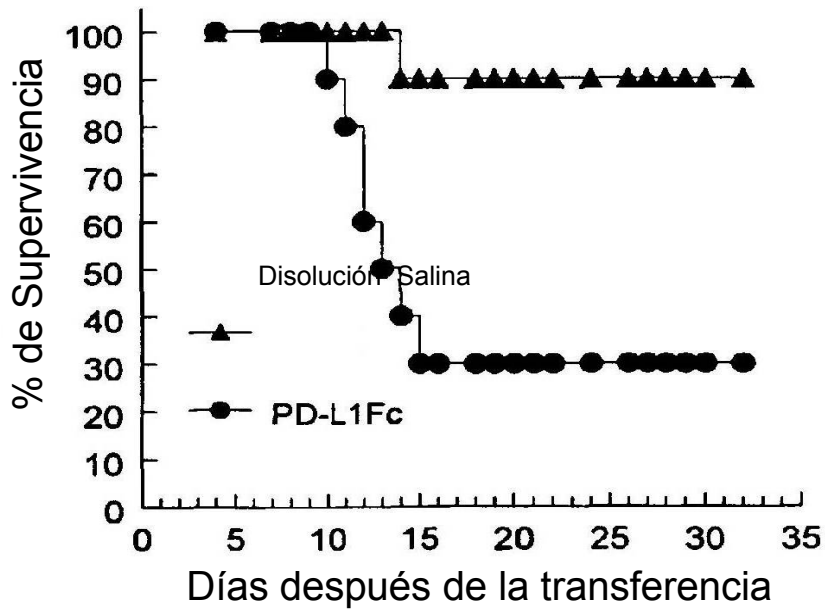
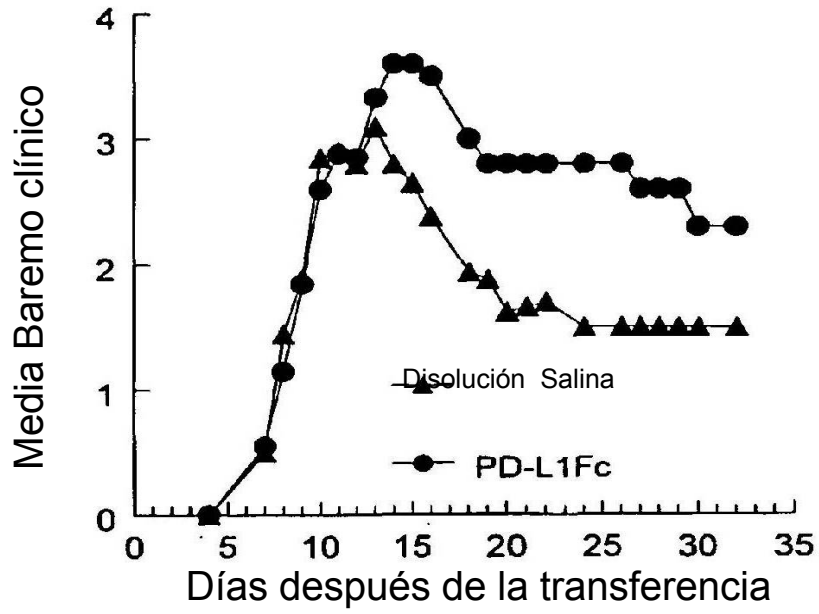


Figura 27