

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 429**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2006 E 11171236 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2399932**

54 Título: **Composiciones y métodos para modular respuestas inmunitarias**

30 Prioridad:

**12.05.2005 US 680374 P**

**13.04.2006 US 791626 P**

**26.04.2006 US 795005 P**

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

**20.04.2017**

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)  
Route 206 & Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**LEVIN, STEVEN D.;  
BILSBOROUGH, JANINE;  
WEST, JAMES W.;  
BRANDT, CAMERON;  
RAMSDALL, FREDERICK J.;  
HOWARD, EDWARD D.;  
CHADWICK, ERIC M. y  
GAO, ZEREN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 609 429 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## Composiciones y métodos para modular respuestas inmunitarias

5 Las señales coestimulantes positivas y negativas desempeñan papeles críticos en la modulación de la actividad de células T, y se ha demostrado que las moléculas que median en estas señales son dianas eficaces para agentes inmunomoduladores. Se requiere coestimulación positiva, además de implicación del receptor de células T (TCR), para activación óptima de células T no tratadas previamente, mientras que se cree que se requiere coestimulación negativa para la adquisición de auto tolerancia inmunológica, así como la terminación de funciones de células T efectoras. Tras la interacción con B7-1 o B7-2 en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC), CD28, la molécula coestimulante de células T prototípica, emite señales que promueven la proliferación y diferenciación de células T en respuesta a implicación de TCR, mientras que el homólogo de CD28 antígeno de linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4) media en la inhibición de la proliferación de linfocitos T y funciones efectoras (Chambers *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 19: 565-594, 2001; Egen *et al.*, Nature Immunol., 3: 611-618, 2002).

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

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

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

30 Finalmente, B7-H3 y B7-H4, ambos homólogos de B7 recién identificados, se unen con un contrarreceptor o contrarreceptores aún desconocidos en la actualidad en células T activadas, y se ha indicado que potencian la proliferación de células T auxiliares CD4+ (Th) y linfocitos T citotóxicos (CTL o Tc) CD8+ y potencian selectivamente la expresión de IFN- $\gamma$ . (Chapoval *et al.*, Nat. Immunol., 2, 269-74, 2001, Sun *et al.*, J. Immunol., 168, 6294-7, 2002).

35 Con la excepción de contrarreceptores de PD-1, que muestran algo de expresión en tejidos no linfoides, la expresión de miembros de la familia B7 conocidos está restringida en gran medida a células linfoides. Colectivamente, estos estudios han revelado que los miembros de la familia B7 son contrarreceptores en células linfoides que interaccionan con receptores afines en linfocitos para proporcionar señales coestimulantes positivas o negativas que desempeñan papeles críticos en la regulación de respuestas inmunitarias mediadas por células.

45 En particular, se sabe que muchos trastornos autoinmunitarios implican células T autorreactivas y autoanticuerpos. Son altamente deseables agentes que sean capaces de inhibir o eliminar linfocitos autorreactivos sin comprometer la capacidad del sistema inmunitario para defender contra patógenos. Por el contrario, muchas inmunoterapias de cáncer, tales como inmunoterapia adoptiva, expanden las poblaciones de linfocitos T específicas de tumor y las dirigen para atacar y destruir células tumorales (Dudley *et al.*, Science 298: 850-854, 2002; Pardoll, Nature Biotech., 20: 1207-1208, 2002; Egen *et al.*, Nature Immunol., 3: 611-618, 2002). Son altamente deseables agentes capaces de aumentar el ataque tumoral. Además, las respuestas inmunitarias a muchos antígenos diferentes (por ejemplo, antígenos microbianos o antígenos tumorales), aunque son detectables, son frecuentemente de magnitud insuficiente para proporcionar protección contra un proceso de enfermedad mediado por agentes (por ejemplo, microorganismos infecciosos o células tumorales) que expresan esos antígenos. Es con frecuencia deseable administrar al sujeto, junto con el antígeno, un adyuvante que actúe para potenciar la respuesta inmunitaria al antígeno en el sujeto. También es deseable inhibir respuestas inmunitarias normales al antígeno en ciertas circunstancias. Por ejemplo, es deseable la supresión de respuestas inmunitarias normales en un paciente que recibe un trasplante, y son altamente deseables agentes que muestren dicha actividad inmunosupresora.

50 Las señales coestimulantes, particularmente señales coestimulantes positivas, también desempeñan un papel en la modulación de la actividad de células B. Por ejemplo, la activación de células B y la supervivencia de células B de centro germinal requieren señales derivadas de células T además de estimulación por antígeno. El contrarreceptor de CD40 presente en la superficie de células T auxiliares interacciona con CD40 en la superficie de células B, y

media en muchos de dichos efectos dependientes de células T en células B. Resulta interesante que no se han identificado receptores coestimulantes negativos análogos de CTLA-4 en células B. Esto sugiere que pueden existir diferencias fundamentales en el modo en que se inducen células T y células B para responder a antígeno, lo que tiene implicaciones para mecanismos de autotolerancia así como en la inhibición de funciones efectoras de células B, tales como producción de anticuerpos. Si se encontrara una molécula de tipo CTLA funcional en células B, el hallazgo cambiaría drásticamente el entendimiento de los mecanismos de la estimulación de células B. Además, la identificación de dichos receptores podría proporcionar el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos capaces de modular la activación de células B y producción de anticuerpos, y útiles en la modulación de respuestas inmunológicas.

En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de identificación de miembros de la familia B7 adicionales, sus contrarceptores y moléculas derivadas de los mismos, que tienen uno o ambos de una actividad coestimulante de células T y/o una actividad coestimulante de células B. Esta necesidad se basa en gran medida en su importancia biológica fundamental y el potencial terapéutico de agentes capaces de afectar a su actividad. Dichos agentes capaces de modular señales coestimulantes encontrarían uso significativo en la modulación de respuestas inmunitarias, y son altamente deseables.

Baury B. *et al.*, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, Vol 309(1), 12 de septiembre de 2003, páginas 175-182, describe la identificación de isoformas de CD155 secretadas.

Nobis P. *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1985) Vol. 66, páginas 2563-2569, describe la producción de un anticuerpo monoclonal contra un epítipo en células HeLa que es el sitio de unión a poliovirus funcional. El documento WO01/94413 describe ácidos nucleicos relacionados con B7 y polipéptido y sus usos para inmunomodulación.

Seth S. *et al.*, *Immunobiology*, Vol. 210 (6-8), 2005, página 542, indica que el receptor de Polivirus/CD 155 es un modulador potencial de la respuesta de células T.

Freeman G *et al.*, *J. Exp. Medicine*, vol. 192 (7), 2 de octubre de 2000, páginas 1027-1034, indica que la implicación del receptor inmunoinhibidor de PD-1 por un receptor de miembro de la familia B7 conduce a regulación negativa de la activación de linfocitos.

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

## Descripción detallada

### 1. Visión de conjunto

La presente memoria descriptiva se dirige a la identificación y la caracterización de zB7R1, un nuevo receptor linfocítico inhibidor, y al descubrimiento de su capacidad para unirse con CD 155 (PVR). Por lo tanto, la presente memoria descriptiva proporciona un receptor B7 recién identificado que es una molécula de tipo PD-1 y se expresa en linfocitos T. El nuevo receptor desvelado en el presente documento se denomina "zB7R1" y es distinto de CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 y zB7R1. También se proporcionan métodos y composiciones para modular la señalización de linfocitos mediada por zB7R1 tal como, por ejemplo, modular la interacción natural de zB7R1 y su contrarceptor, que tienen múltiples aplicaciones terapéuticas para tolerancia inmunológica, autoinmunidad, inmunosupresión e inmunoterapia incluyendo inmunoterapia de cáncer.

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

CD155 (PVR) se identificó como la contraestructura para zB7R1. Se ha indicado que CD155 es la contraestructura para al menos otros 2 receptores incluyendo CD226 (DNAM-1) y CD96 (Tactile). Se ha mostrado que CD226 y CD96 son receptores activadores expresados en células T y células NK y CD155 puede desencadenar la activación mediante estas moléculas. Se ha indicado que CD155 se expresa ampliamente en tejidos no hematopoyéticos y puede sobreexpresarse en un gran número de tumores y tipos celulares transformados. El papel de CD155 en respuestas de células T a estos tumores es en su mayoría la interacción con CD155 de zB7R1 que suprime respuestas de células T y NK al tumor. Por lo tanto, un reactivo que bloquea la interacción de zB7R1-CD155, incluyendo anticuerpos de bloqueo para una de las moléculas, o formas solubles de una de las proteínas, facilitará respuestas de células T y NK al tumor eliminando o minimizando la señal inhibidora mediante zB7R1. Debido al efecto inhibidor demostrado de la interacción de zB7R1 en células T con anticuerpos agonistas como se muestra en el presente documento, los anticuerpos agonistas anti zB7R1 o receptores solubles son candidatos adecuados para suprimir las respuestas de células T en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias mediadas por células T.

En consecuencia, la presente memoria descriptiva proporciona nuevos usos para moduladores de zB7R1, tales como agonistas o antagonistas de zB7R1. Estos moduladores podrían ser un receptor soluble o anticuerpos para zB7R1 o su contrarreceptor, es decir, CD155. La presente memoria descriptiva también proporciona fragmentos polipeptídicos y proteínas de fusión de zB7R1 solubles, para su uso en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias humanas. Estos anticuerpos de zB7R1 y receptores de zB7R1 solubles desvelados en el presente documento, pueden usarse para modular, agonizar, bloquear, aumentar, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1 o su contrarreceptor o sus contrarreceptores (es decir CD155) en el tratamiento de enfermedades humanas específicas tales como cáncer, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis y otras afecciones inflamatorias desveladas en el presente documento.

Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica zB7R1 humano (también conocido indistintamente como zB7R1x1) la proporciona la SEQ ID NO: 1; el polipéptido codificado se muestra en SEQ ID NO: 2. zB7R1 es un receptor de B7 que se une con otro miembro de la familia B7 más, o contrarreceptor. El análisis de un clon de ADNc humano que codificaba zB7R1 (SEQ ID NO: 1) reveló una fase de lectura abierta que codificaba 244 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprendía un dominio extracelular de aproximadamente 125 restos de aminoácidos (restos 16-140 de SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3), un dominio transmembrana de aproximadamente 23 restos de aminoácidos (restos 141-163 de SEQ ID NO: 2), y un dominio intracelular de aproximadamente 81 restos de aminoácidos (restos 164 a 244 de SEQ ID NO: 2). zB7R1 también tiene un dominio IgV de aproximadamente 96 restos de aminoácidos (restos 32-127 de SEQ ID NO: 2).

Dentro de zB7R1, hay dos dominios ITIM, YFNV (restos de aminoácidos 225-228 de SEQ ID NO: 2) e YRSL (restos de aminoácidos 231-234). La presencia de un dominio ITIM es un indicio de que zB7R1 puede tener un efecto inhibidor. Dentro de zB7R1, hay dos dominios de unión a SH-3-quinasa, PSAP (restos de aminoácidos 191-194 de SEQ ID NO: 2) y PSPP (restos de aminoácidos 194-197).

zB7R1 también tiene un polimorfismo en el polinucleótido 289 de SEQ ID NO: 1, indicado como n, en el que n puede ser C o T. zB7R1 también tiene al menos un segundo polimorfismo en el polinucleótido 359 de SEQ ID NO: 1, indicado como n, en el que n puede ser A o G, y en el que la conversión de A a G conduce a un cambio en el resto de aminoácido 117 de SEQ ID NO: 2 (indicado como Xaa) de Thr a Ala.

Otra secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica un zB7R1 humano variante (también conocido indistintamente como zB7R1x2) se proporciona por SEQ ID NO: 5; el polipéptido codificado se muestra en SEQ ID NO: 6. zB7R1x2 es un receptor de B7 que se une con otro miembro de la familia B7 más, o contrarreceptor. El análisis de un clon de ADNc humano que codificaba zB7R1x2 (SEQ ID NO: 5) reveló una fase abierta de lectura que codificaba 311 aminoácidos (SEQ ID NO: 6) que comprendía un dominio extracelular de aproximadamente 182 restos de aminoácidos (restos 27-208 de SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7), un dominio transmembrana de aproximadamente 22 restos de aminoácidos (restos 209-230 de SEQ ID NO: 6), y un dominio intracelular de aproximadamente 81 restos de aminoácidos (restos 231 a 311 de SEQ ID NO: 6).

Se proporciona una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica un zB7R1 murino en SEQ ID NO: 8; el polipéptido codificado se muestra en SEQ ID NO: 9. El dominio extracelular se muestra en SEQ ID NO: 10.

Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica CD155 humano (también conocido indistintamente como PVR) se proporciona en SEQ ID NO: 17; el polipéptido codificado se muestra en SEQ ID NO: 18. Se ha mostrado que CD155 se une con zB7R1 y por lo tanto es un contrarreceptor para este miembro de la familia de B7. El análisis de un clon de ADNc humano que codificaba zB7R1 (SEQ ID NO: 17) reveló una fase abierta de lectura que codificaba 417 aminoácidos (SEQ ID NO: 18) que comprendía un dominio extracelular de aproximadamente 316 restos de aminoácidos (restos 28-343 de SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19), un dominio transmembrana de aproximadamente 24 restos de aminoácidos (restos 344 a 367 de SEQ ID NO: 18), y un dominio intracelular de aproximadamente 50 restos de aminoácidos (restos 368-417 de SEQ ID NO: 18).

Una secuencia de nucleótidos ilustrativa que codifica un CD155 murino se proporciona en SEQ ID NO: 20; el polipéptido codificado se muestra en SEQ ID NO: 21. El dominio extracelular se muestra en SEQ ID NO: 22. El análisis de un clon de ADNc que codificaba CD155 murino reveló una fase abierta de lectura que codificaba 408 aminoácidos (SEQ ID NO: 21) que comprendía un dominio extracelular de aproximadamente 319 restos de aminoácidos (restos 29-347 de SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22), un dominio transmembrana de aproximadamente 20 restos de aminoácidos (restos 348-367 de SEQ ID NO: 21) y un dominio intracelular de aproximadamente 40 restos de aminoácidos (restos 368-408 de SEQ ID NO: 21).

En consecuencia, en un aspecto de la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de zB7R1, que son útiles en la modulación de la actividad de linfocitos T y en el tratamiento de trastornos inmunitarios, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, inflamación, psoriasis, EII, colitis ulcerosa y LES.

La presente memoria descriptiva también proporciona polipéptidos y epítopos aislados que comprenden al menos 15

restos de aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3. Los polipéptidos ilustrativos incluyen polipéptidos que comprenden o consisten en SEQ ID NO: 3, un epítipo antigénico de los mismos, o un fragmento de unión a zB7R1 funcional del mismo. Además, la presente memoria descriptiva también proporciona polipéptidos aislados como se ha desvelado anteriormente que son agonistas de, se unen con, bloquean, inhiben, reducen, aumentan, antagonizan o neutralizan la actividad de zB7R1.

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente con polipéptidos de zB7R1 como se define en las reivindicaciones. A este respecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido de zB7R1, en el que dicho polipéptido de zB7R1 consiste en: (i) una secuencia de restos de aminoácidos que tienen al menos 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2; (ii) una secuencia de restos de aminoácidos que tienen al menos 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 27-208 de SEQ ID NO: 6; o (iii) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7; en el que dicho anticuerpo estimula la señalización mediada por zB7R1. Los anticuerpos desvelados en el presente documento incluyen anticuerpos agonistas, anticuerpos neutralizantes, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos humanizados derivados de anticuerpos monoclonales murinos y anticuerpos monoclonales humanos. Los fragmentos de anticuerpo ilustrativos incluyen F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv, y unidades de reconocimiento mínimas. Los anticuerpos neutralizantes se unen preferentemente con zB7R1 de modo que su interacción con su contrarreceptor o contrarreceptores se bloquee, inhiba, reduzca, antagonice o neutralice; también se desvelan en el presente documento anticuerpos neutralizantes anti zB7R1 de modo que su interacción con su contrarreceptor o sus contrarreceptores se bloquee, inhiba, reduzca, antagonice o neutralice. La presente memoria descriptiva incluye además composiciones que comprenden un vehículo y un péptido, polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento.

Se proporcionan antagonistas de señalización de zB7R1 para aumentar la activación de células T, y posiblemente la activación de linfocitos B. Dichos antagonistas pueden comprender agentes de bloqueo capaces de interferir con la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor o sus contrarreceptores, inhibiendo de este modo la señalización negativa mediada por zB7R1 y dando como resultado un aumento de la activación y proliferación de linfocitos y la función efectora.

Se proporcionan agonistas de la señalización de zB7R1 para inhibir la activación de células T, y posiblemente la activación de células B. Dichos agentes bioactivos pueden comprender agentes miméticos capaces de unirse con zB7R1 e imitar y/o aumentar la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor o sus contrarreceptores, dando como resultado de este modo la inhibición de la activación de células T (posiblemente células B) y proliferación y función efectora.

Se proporcionan agentes bioactivos y métodos para aumentar y/o regular positivamente la actividad de células B y T. Dichos agentes bioactivos pueden comprender antagonistas de la señalización mediada por zB7R1. Dichos agentes bioactivos pueden comprender agentes de bloqueo como se describen en el presente documento, y pueden específicamente ser capaces de interferir con la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor. Se proporcionan composiciones adyuvantes utilizando zB7R1 y/o sus agentes de bloqueo de contrarreceptores y otros antagonistas de señalización mediada por zB7R1.

Se proporcionan agentes bioactivos y métodos para inhibir y/o regular negativamente la actividad de linfocitos B y T. Dichos agentes bioactivos pueden comprender agonistas de señalización mediada por zB7R1. Dichos agentes bioactivos pueden comprender agentes miméticos como se describe en el presente documento, que pueden específicamente ser capaces de reemplazar y/o incrementar la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor. Se proporcionan composiciones inmunosupresoras que utilizan zB7R1 y/o sus agentes miméticos de contrarreceptores y otros agonistas de la señalización mediada por zB7R1.

Se proporcionan métodos y composiciones para modular la producción de inmunoglobulina por linfocitos B.

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento encontrarán uso ventajoso en inmunoterapia, incluyendo, por ejemplo, autoinmunidad, inmunosupresión, inmunoterapia de cáncer y adyuvantes inmunitarios.

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

La presente memoria descriptiva también contempla anticuerpos anti idiotípicos, o fragmentos de anticuerpos anti idiotípicos, que se unen específicamente con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 6 o un fragmento de la misma. Un anticuerpo anti idiotípico a modo de ejemplo se une con un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 3 o 7.

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

5 La presente memoria descriptiva se refiere a una proteína de zB7R1 multimérica, así como a un método para preparar dicha proteína multimérica, preferentemente una proteína tetramérica, que comprende cultivar una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) y una proteína heteróloga, tal como  
10 zB7R1 o CD 155. Específicamente, la parte de zB7R1 o CD 155 que se incluye en la proteína de fusión es el dominio extracelular de esa proteína (es decir SEQ ID NO: 3 o 7 para zB7R1, o SEQ ID NO: 22 para CD155), y la proteína de fusión resultante es soluble. En una realización adicional de la divulgación, la proteína de fusión comprende una secuencia enlazadora. En otra realización más de la divulgación, el dominio VASP puede usarse para identificar secuencias que tienen patrones de estructuras proteicas similares y esos dominios similares se usan  
15 para preparar una proteína de fusión que multimeriza una proteína heteróloga o un dominio proteico.

Una realización adicional de la presente memoria descriptiva es un método para preparar una proteína de zB7R1 o CD155 soluble, homo o heterotetramérica cultivando una célula hospedadora transformada o transfectada con al menos uno, pero hasta cuatro vectores de expresión diferentes que codifican una proteína de fusión que comprende  
20 un dominio VASP y una proteína heteróloga tal como zB7R1 o CD 155 o dominio proteico de las mismas. En esta realización de la divulgación, los cuatro dominios VASP forman preferentemente un homo o heterotetrámero. Este cultivo puede producirse en las mismas células hospedadoras o en células hospedadoras diferentes. Los dominios VASP pueden ser iguales o diferentes y la proteína de fusión puede comprender además una secuencia enlazadora. La presente memoria descriptiva también abarca secuencias de ADN, vectores de expresión y células hospedadoras transformadas utilizadas en el presente método y proteínas de fusión producidas por el presente método.  
25

La presente invención también proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen con polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de zB7R1 como se define en las reivindicaciones, tales como receptores monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos, incluyendo receptores solubles.  
30

En otro aspecto, se proporcionan métodos para modular la actividad linfocítica que comprenden poner en contacto un linfocito B y/o T con un agente bioactivo capaz de modular la actividad de zB7R1. En una realización de la divulgación, el agente bioactivo comprende un antagonista de la actividad de zB7R1 tal como, por ejemplo, un agente de bloqueo de zB7R1 o contrarreceptor de zB7R1 (es decir CD155) que da como resultado una regulación  
35 positiva o aumento de la actividad linfocítica evitando la señalización mediada por zB7R1 negativa. En una realización alternativa, el agente bioactivo comprende un agonista de actividad de zB7R1 tal como, por ejemplo, un agente mimético de zB7R1 o de contrarreceptor de zB7R1, dando como resultado la regulación negativa de la actividad linfocítica reemplazando o incrementando la señalización negativa mediada por zB7R1.

40 En un aspecto adicional, se proporcionan métodos para modular la actividad linfocítica que comprende poner en contacto un linfocito B y/o T con un agente bioactivo capaz de modular la interacción de zB7R1 con un contrarreceptor de zB7R1. En una realización de la divulgación, se emplea un agente bioactivo capaz de interferir con la interacción natural de zB7R1 y un contrarreceptor de zB7R1 (es decir CD 155) para aumentar la actividad y proliferación de linfocitos tal como, por ejemplo, un antagonista de zB7R1 tal como un contrarreceptor de zB7R1  
45 soluble o un agente bloqueante de zB7R1. En una realización alternativa, se emplea un agente bioactivo capaz de incrementar o reemplazar la interacción natural de zB7R1 y un contrarreceptor de zB7R1 (es decir CD155) para inhibir la actividad y proliferación de linfocitos.

Pueden seleccionarse agentes de bloqueo de zB7R1 adecuados del grupo que comprende o consiste en polipéptidos y proteínas de fusión de zB7R1 solubles, anticuerpos anti zB7R1 capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de zB7R1 e interferir con la señalización mediada por zB7R1, moléculas pequeñas  
50 inhibitorias de la interacción del receptor zB7R1 con sus ligandos, y similares. Los antagonistas de zB7R1 alternativos incluyen además oligonucleótidos antisentido dirigidos a la secuencia de ácido nucleico de zB7R1, secuencias de ARN inhibitorias, moléculas pequeñas inhibitorias de la expresión de zB7R1 y/o señalización intracelular, y similares.  
55

De forma similar, pueden seleccionarse agentes de bloqueo de contrarreceptores de zB7R1 o antagonistas adecuados del grupo que comprende o consiste en anticuerpos anti contrarreceptor de zB7R1 capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de un contrarreceptor de zB7R1 (es decir CD155; SEQ ID NO: 22) e  
60 interferir con la interacción de un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, moléculas pequeñas inhibitorias de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, polipéptidos y proteínas de fusión de contrarreceptor a zB7R1 solubles que tienen secuencias de aminoácidos de contrarreceptor a zB7R1 modificadas para interferir con la integración de un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1 e incapaces de activar la señalización mediada por zB7R1, y similares. Los antagonistas de contrarreceptores de zB7R1 alternativos incluyen oligonucleótidos antisentido dirigidos a la secuencia de ácido nucleico de contrarreceptor de zB7R1 (es decir CD155; SEQ ID NO: 20), moléculas  
65 de ARN inhibitorias, moléculas pequeñas inhibitorias de la expresión de un contrarreceptor de zB7R1, y similares.

Pueden seleccionarse agentes miméticos o agonistas de zB7R1 adecuados del grupo que comprende o consiste en anticuerpos anti zB7R1 activadores de función ("anticuerpos agonistas") capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3 o 7) y estimular la señalización mediada por zB7R1, vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas de zB7R1 funcionales de forma intracelular, moléculas pequeñas potenciadoras de la expresión de zB7R1 y/o señalización mediada por zB7R1, y similares. De forma similar, pueden seleccionarse agentes miméticos de contrarreceptores de zB7R1 adecuados del grupo que comprende o consiste en polipéptidos de contrarreceptores a zB7R1 solubles, tales como CD155, y proteínas de fusión capaces de activar la señalización mediada por zB7R1, moléculas pequeñas potenciadoras de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1 así como potenciadores de la expresión de un contrarreceptor de zB7R1, vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas de contrarreceptor de zB7R1 funcionales de forma intracelular, y similares.

Por lo tanto, en una realización más específica de la divulgación, se proporcionan métodos para estimular, aumentar y/o mejorar la actividad de linfocitos que comprende poner en contacto un linfocito B o T con un antagonista de señalización mediada por zB7R1, comprendiendo dicho antagonista al menos un agente bioactivo seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos de zB7R1 solubles, proteínas de fusión de zB7R1 solubles, anticuerpos anti zB7R1 capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de zB7R1 e interferir con la señalización mediada por zB7R1, moléculas pequeñas inhibidoras de la expresión de zB7R1 y/o señalización mediada por zB7R1, anticuerpos anti contrarreceptores de zB7R1 capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de un contrarreceptor de zB7R1 e interferir con la interacción de un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, moléculas pequeñas inhibidoras de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, polipéptidos de contrarreceptor de zB7R1 solubles y proteínas de fusión de contrarreceptor de zB7R1 incapaces de activar la señalización mediada por zB7R1 y secuencias de ARN de interferencia.

En una realización particularmente preferida de la divulgación, se proporcionan métodos para aumentar una respuesta inmunitaria del hospedador a la estimulación antigénica, que comprenden la administración al hospedador de al menos uno de los antagonistas anteriormente mencionados de señalización mediada por zB7R1. Convenientemente, la estimulación antigénica puede ser de antígenos patógenos, antígenos de vacuna y/o antígenos tumorales.

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

En una realización específica adicional de la divulgación, se proporcionan métodos para inhibir, atenuar y/o reducir la actividad de linfocitos que comprende poner en contacto un linfocito B o T con un agonista de señalización mediada por zB7R1, seleccionándose dicho agonista del grupo que consiste en polipéptidos de contrarreceptor de zB7R1 solubles y proteínas de fusión de contrarreceptor de zB7R1 capaces de activar la señalización mediada por zB7R1, anticuerpos anti zB7R1 activadores de función capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de zB7R1 y estimular la señalización mediada por zB7R1, vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas de zB7R1 funcionales intracelularmente, moléculas pequeñas potenciadoras de la expresión de zB7R1 y/o señalización mediada por zB7R1, moléculas pequeñas potenciadoras de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, moléculas pequeñas potenciadoras de la expresión de contrarreceptor a zB7R1 y vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas de contrarreceptor a zB7R1 funcionales intracelularmente. La invención proporciona un método *in vitro* para reducir la actividad de linfocitos T, que comprende poner en contacto un linfocito T positivo para zB7R1 con un agonista de zB7R1, en el que dicho agonista comprende un anticuerpo anti zB7R1 como se define en las reivindicaciones, y en el que dicho contacto aumenta la atenuación de al menos una actividad de linfocito T mediada por señalización de zB7R1.

En una realización particularmente preferida de la divulgación, se proporcionan métodos para suprimir una respuesta inmunitaria del hospedador a estimulación antigénica, que comprende la administración al hospedador de al menos uno de los agonistas anteriormente mencionados de señalización mediada por zB7R1. Convenientemente, la estimulación antigénica puede ser de autoantígenos en el contexto de enfermedad autoinmunitaria o de antígenos donantes presentes en órganos y tejidos trasplantados.

En un aspecto alternativo de la divulgación, la presente memoria descriptiva proporciona agentes bioactivos y métodos para modular la interacción de una célula que expresa contrarreceptor de zB7R1 y un linfocito que expresa zB7R1. Se proporcionan agentes bioactivos y métodos para interferir con la interacción de células tumorales positivas para contrarreceptor a zB7R1 con células T, dando como resultado la inhibición de la señalización mediada por zB7R1 negativa. La célula T puede ser una célula CD4+ o una célula CD8+. La célula T CD4+ puede ser una célula Th1.

En otra realización preferida de la divulgación, se proporcionan agentes bioactivos y métodos para imitar o potenciar

la interacción de un contrarreceptor de zB7R1/ células no linfoides no tumorales positivas para CD155 con células T positivas para zB7R1, reduciendo de este modo la actividad de células T. La célula T puede ser una célula T CD4+ o una célula T CD8+. La célula T CD4+ puede ser una célula Th1.

5 En un aspecto adicional de la divulgación, se proporcionan métodos para tratar cánceres caracterizados por la presencia de células tumorales que expresan un contrarreceptor a zB7R1. En una realización de la divulgación, estos métodos comprenden administrar a un sujeto mamífero al menos uno de los antagonistas de señalización mediada por zB7R1 desvelada en el presente documento, bien sola o bien junto con protocolos de inmunoterapia, quimioterapia y/o radioterapia de cáncer alternativos. En una realización preferida, se administra al menos un antagonista de zB7R1 o antagonista de CD155 a un sujeto que tiene células tumorales positivas para un contrarreceptor a zB7R1, en el que dicho agente de bloqueo es capaz de interferir con la interacción de zB7R1 y un contrarreceptor de zB7R1 e inhibir la señalización mediada por zB7R1. Preferentemente, la administración de dichos agentes de bloqueo es eficaz para aumentar la actividad de células T dirigida contra antígenos tumorales distintos de un contrarreceptor de zB7R1 en las células tumorales, y en particular, para aumentar la actividad de células T citotóxicas. Aún más preferentemente, la administración de los antagonistas objeto es eficaz para inhibir el crecimiento de las células tumorales que expresan contrarreceptor de zB7R1.

También se contempla que el zB7R1 objeto y/o un contrarreceptor de zB7R1/bloqueo de CD155 proporcionados en el presente documento puedan encontrar combinación sinérgica con bloqueo de CTLA-4 como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.855.887; 5.811.097 y 6.051.227, y publicación internacional WO 00/32231.

En un aspecto adicional, se proporcionan métodos para tratar trastornos autoinmunitarios caracterizados por la expresión ausente o aberrante de un contrarreceptor de zB7R1 en células hospedadoras no linfoides no tumorales sometidas a ataque autoinmunitario. En una realización de la divulgación, estos métodos comprenden administrar a un sujeto mamífero al menos uno de los agonistas de señalización mediada por zB7R1 desvelados en el presente documento, bien solos o bien junto con protocolos de inmunoterapia y/o inmunosupresores alternativos. En una realización preferida de la divulgación, se administra al menos un agonista de zB7R1 o CD15 a un sujeto que tiene linfocitos positivos para zB7R1 autorreactivos, en el que dicho agonista es capaz de reemplazar y/o aumentar la interacción de zB7R1 y CD155 y reemplazar o aumentar la señalización mediada por zB7R1. Preferentemente, la administración de dichos agonistas es eficaz en la reducción de la actividad de linfocitos autorreactivos dirigidos contra células hospedadoras no linfoides no tumorales, y particularmente actividad de CTL CD8+ y Th1 CD4+ autorreactivos, y actividad de células B.

En un aspecto adicional más, se proporcionan métodos para mejorar el resultado de trasplantes de órganos y tejidos y prolongar la supervivencia de injertos. En una realización de la divulgación, estos métodos comprenden administrar a un receptor de trasplante al menos un agente de los agonistas o antagonistas de señalización mediada por zB7R1 desvelados en el presente documento, bien solos o bien junto con protocolos de inmunoterapia y/o inmunosupresores alternativos. En una realización preferida de la divulgación, se administra al menos un agente mimético de zB7R1 (por ejemplo, un receptor soluble que bloquea la unión de un zB7R1 de superficie celular con su contrarreceptor, o un anticuerpo agonista que se une con zB7R1 e induce la señalización) al receptor de trasplante, en el que dicho agente mimético es capaz de reemplazar y/o aumentar la interacción de zB7R1 y un contrarreceptor de zB7R1 y reemplazar o aumentar la señalización mediada por zB7R1. Preferentemente, la administración de dichos agentes miméticos es eficaz para reducir la respuesta inmunitaria del receptor contra antígenos donantes presentes en el injerto, particularmente la respuesta de CTL citolítica y la respuesta de células B. Aún más preferentemente, la administración de los agentes miméticos objeto es eficaz para desplazar a la respuesta de células T auxiliares de una respuesta de tipo Th-1 desfavorable a una respuesta de tipo Th-2 más favorable, como se describe en más detalle en el presente documento.

#### Tratamiento de enfermedad autoinmunitaria

La presente memoria descriptiva también proporciona composiciones y métodos para inhibir respuestas autoinmunitarias. En una realización preferida, se proporcionan composiciones y métodos para inhibir la actividad de células T y B autorreactivas que reconocen específicamente autoantígenos. Convenientemente, estas composiciones y métodos pueden usarse para inhibir la destrucción de células no tumorales mediadas por uno o más autoantígenos.

Las composiciones preferidas para uso en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria comprenden agentes que median en la señalización de zB7R1 descritos en el presente documento incluyendo, por ejemplo, los agentes miméticos, agonistas o antagonistas anteriormente descritos. Los agentes especialmente preferidos incluyen fragmentos de proteína de zB7R1 que comprenden el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3 o 7), o una parte del mismo; proteínas de fusión zB7R1-Ig que comprenden el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3), o una parte del mismo; anticuerpos anti zB7R1 o CD155 activadores de función; péptidos que imitan zB7R1 o su contrarreceptor, CD155 (miméticos); y composiciones químicas de moléculas pequeñas que imitan la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor. También se prefieren composiciones capaces de unirse con zB7R1, bien de una manera reticulada o bien como mezclas policlonales.

También se contemplan en la presente memoria descriptiva enfoques genéticos para enfermedades autoinmunitarias. Particularmente, puede usarse terapia génica para aumentar el nivel de la expresión de zB7R1 en células T y/o aumentar el nivel de expresión de su contrarreceptor en células no linfoides que se someten a ataque por linfocitos autorreactivos. También se contempla el uso de isoformas o variantes de zB7R1 que muestran actividad específica elevada, siendo el objeto de cada método potenciar la señalización que es supresora de la activación de células T.

La presente memoria descriptiva también proporciona composiciones y métodos para tratar el cáncer, y en particular, para aumentar la actividad de linfocitos positivos para zB7R1 contra células tumorales positivas para B7. Convenientemente, estas composiciones y métodos pueden usarse para inhibir el crecimiento de células tumorales capaces de expresar un miembro de la familia B7.

Son composiciones preferidas para uso en el tratamiento de cáncer los antagonistas de señalización mediada por zB7R1 descritos en el presente documento incluyendo, por ejemplo, agentes de bloqueo de zB7R1. Los agentes especialmente preferidos incluyen anticuerpos anti zB7R1; fragmentos proteicos que comprenden el dominio extracelular zB7R1, o una parte del mismo; proteínas de fusión de zB7R1-Ig que comprenden el dominio extracelular de BTLA, o una parte del mismo; anticuerpos anti zB7R1 de bloqueo de función; péptidos que imitan zB7R1 (miméticos); y composiciones químicas de moléculas pequeñas que interfieren con la interacción natural de zB7R1 y su contrarreceptor.

También se contemplan en la presente memoria descriptiva enfoques genéticos para el tratamiento de cáncer. Particularmente, puede usarse terapia génica para reducir el nivel de expresión de zB7R1 en células T, y/o reducir el nivel de expresión de zB7R1 o su contrarreceptor (es decir CD155) en células tumorales. También se contempla el uso de isoformas de zB7R1 que muestran actividad negativa dominante, siendo el objeto de cada método inhibir la señalización que es normalmente supresora de activación de células T. Los enfoques genéticos pueden implicar el uso de promotores específicos de tejido y célula para dirigir la expresión de variantes negativas dominantes de zB7R1, ácidos nucleicos antisentido o ARN inhibidores pequeños a células T y células tumorales, respectivamente. Los métodos pueden implicar adicionalmente el uso de virus dirigidos a tumores, u otros vehículos de suministro que reconocen específicamente células tumorales. Los métodos pueden implicar adicionalmente el uso de virus dirigidos a células T, u otros vehículos de suministro que reconocen específicamente células T.

Particularmente se prefieren agentes que pueden dirigirse selectivamente a células tumorales, y efectuar una reducción de la expresión de zB7R1 en células tumorales sin reducir el nivel de expresión de zB7R1 en células no tumorales hasta niveles deletéreos. Se prefieren en gran medida agentes que tengan una forma precursora. Estos "profármacos" se convierten en su forma activa en la cercanía del tejido tumoral normalmente mediante una actividad enzimática que está restringida en su distribución a las cercanías del tumor.

También se prefieren en gran medida agentes que pueden combinarse con restos de dirección que suministran selectivamente el agente a un tumor. Estos restos de dirección proporcionan una concentración local alta del agente en la cercanía del tejido tumoral, y reducen la cantidad de agente que debe administrarse para efectuar la respuesta deseada.

También se contempla en la presente memoria descriptiva el uso de terapia de combinación para tratar cáncer, como se ha descrito anteriormente.

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

En un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona un medicamento para el tratamiento de cáncer.

La presente memoria descriptiva también proporciona composiciones y métodos para modular respuestas inmunitarias normales pero indeseadas que implican actividad de células T y B. En una realización preferida, se proporcionan composiciones y métodos para inhibir la respuesta de linfocitos del hospedador a tejidos y órganos trasplantados. Convenientemente, estas composiciones y métodos pueden usarse para prolongar la supervivencia del tejido injertado. Las composiciones preferidas para uso en la prevención de rechazo de injerto agudo y/o crónico comprenden los agonistas de señalización mediada por zB7R1 descrita en el presente documento incluyendo, por ejemplo, los agentes miméticos anteriormente descritos. Los agentes especialmente preferidos incluyen polipéptidos de zB7R1 que comprenden el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3 o 7), o una parte del mismo; proteínas de fusión de zB7R1-Ig que comprenden el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3 o 7), o una parte del mismo; anticuerpos anti BTLA activadores de función; péptidos que imitan su contrarreceptor (es decir CD155) (miméticos); y composiciones químicas de moléculas pequeñas que imitan la interacción natural de zB7R1 y su contrarreceptor. Además de su utilidad en estrategias inmunosupresoras generales, los agonistas objeto de

señalización mediada por zB7R1 descritos en el presente documento también pueden tener implicaciones importantes para la inducción de tolerancia en trasplante de tejidos y órganos, desviando la respuesta inmunitaria de células T auxiliares receptoras lejos de una respuesta de tipo Th-1 desfavorable y hacia una respuesta de tipo Th-2 más favorable.

5 En un aspecto, la presente memoria descriptiva proporciona un medicamento para uso en trasplante e inmunosupresión.

10 También se proporcionan composiciones adyuvantes que comprenden al menos uno de los zB7R1 y/o CD155 anteriormente descritos u otros agentes de bloqueo de contrarreceptor de zB7R1 así como otros antagonistas de la señalización mediada por zB7R1. También se proporcionan composiciones inmunosupresoras que comprenden al menos uno de los zB7R1 y/o agentes miméticos de un contrarreceptor de zB7R1 anteriormente descritos así como otros agonistas de señalización mediada por zB7R1.

15 Se contempla además que las composiciones y métodos objeto pueden combinarse sinérgicamente con inmunoterapias basadas en modulación de otras rutas coestimulantes de células T, y con modulación de ICOS, PD-1, CTLA-4 y/o BTLA en particular.

20 En un aspecto alternativo, la presente memoria descriptiva proporciona métodos para cribar con respecto a agentes bioactivos que son útiles para modular la activación de células T. Pueden usarse agentes bioactivos identificados por los métodos de el cribado proporcionados en el presente documento para reaccionar con células que expresan un contrarreceptor a zB7R1 o células que expresan zB7R1 para interferir con la interacción entre células B y/o T que expresan zB7R1 y células no linfoides que expresan un contrarreceptor a zB7R1, y antagonizar de este modo la función de la interacción de zB7R1/ contrarreceptor a zB7R1. Como alternativa, pueden usarse agentes bioactivos para reaccionar con células que expresan contrarreceptor a zB7R1 o células que expresan zB7R1 para imitar la interacción de contrarreceptor de zB7R1/ zB7R1, efectuando inhibición de células T en ausencia de interacción de zB7R1/ contrarreceptor de zB7R1. Como alternativa, pueden usarse agentes bioactivos para modificar la interacción de zB7R1/ CD155 natural (o zB7R1 con otro contrarreceptor de zB7R1) de alguna manera, por ejemplo, aumentar la asociación y aumentar la señal inhibidora.

30 En un aspecto alternativo, la memoria descriptiva proporciona vectores de expresión que comprenden las secuencias de ácido nucleico de zB7R1 y/o contrarreceptor a zB7R1 aisladas desveladas en el presente documento (es decir CD155; SEQ ID NO: 20), células hospedadoras recombinantes que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes desveladas en el presente documento y métodos para producir polipéptidos de zB7R1 y/o contrarreceptor de zB7R1 que comprenden cultivar las células hospedadoras y opcionalmente aislar el polipéptido producido por las mismas.

40 En un aspecto adicional de la divulgación, se proporcionan mamíferos no humanos transgénicos que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína de zB7R1, CD155 y/u otro contrarreceptor de zB7R1 como se desvela en el presente documento. Se introducen los nucleótidos de zB7R1, CD155 u otro contrarreceptor de zB7R1 en el animal de manera que permita aumentar la expresión de niveles de un zB7R1 un polipéptido de contrarreceptor a zB7R1, que pueden incluir niveles en circulación aumentados. Como alternativa, pueden usarse los fragmentos de ácido nucleico de zB7R1, CD155 o contrarreceptor a zB7R1 para dirigirse a alelos de zB7R1 endógeno, CD155 o contrarreceptor a zB7R1 para prevenir la expresión de ácidos nucleicos de zB7R1 endógeno o contrarreceptor a zB7R1 (es decir genera un animal transgénico que posee una desactivación génica de proteína de zB7R1 o contrarreceptor a zB7R1). El animal transgénico es preferentemente un mamífero, y más preferentemente un roedor, tal como una rata o un ratón.

50 Estos y otros aspectos de la divulgación resultarán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada. Además, se identifican posteriormente diversas referencias.

## 2. Definiciones

55 En la descripción a continuación, se usan extensivamente varios términos. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de la invención.

60 Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fragmentos generados por cualquiera de ligamiento, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden componerse de monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas  $\alpha$ -enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases pirimidínicas o purínicas. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o pueden funcionalizarse azúcares como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar completo puede reemplazarse con estructuras estérica y electrónicamente similares,

- tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Los ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden unirse por enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosfordiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoanilidato, fosforoamidato y similares. La expresión “molécula de ácido nucleico” también incluye los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácido nucleico de origen natural o modificadas unidas a una cadena principal de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.
- 5
- 10 La expresión “complemento de una molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia.
- 15 La expresión “secuencia de nucleótidos degradada” indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degradados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degradados contienen tripletes diferentes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).
- 20 La expresión “gen estructural” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se transcribe a ARN mensajero (ARNm), que después se traduce a una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.
- 25 Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.
- 30 Una “construcción de molécula de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico, bien mono o bien bicatenaria, que se ha modificado mediante intervención humana para contener segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición no existente en la naturaleza.
- 35 “ADN lineal” indica moléculas de ADN no circular que tienen extremos 5' y 3' libres. Puede prepararse ADN lineal a partir de moléculas de ADN circular cerrado, tales como plásmidos, mediante digestión enzimática o rotura física.
- 40 “ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de un molde de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Normalmente, se emplea un cebador complementario de partes de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los expertos en la materia también usan el término “ADNc” para hacer referencia a una molécula de ADN bicatenario que consiste en dicha molécula de ADN monocatenario y su cadena de ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de un molde de ARN.
- 45 Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente, un promotor se localiza en la región no codificante 5' de un gen, próximo al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de promotores que actúan en el inicio de la transcripción se caracterizan con frecuencia por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSEs; McGehee *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 7:551 (1993)), elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta de suero (SREs; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1: 47 (1990)), elementos de respuesta de glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 19938 (1992)), AP2 (Ye *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 25728 (1994)), SP1, proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3: 253 (1993)) y factores octaméricos (véase, en general Watson *et al.*, eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre y Rousseau, *Biochem. J.* 303: 1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, entonces la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores reprimibles.
- 50
- 55
- 60 Un “promotor central” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función promotora, incluyendo la caja TATA y el inicio de transcripción. Por esta definición, un promotor central puede tener o no actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica de tejido.
- 65 Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares que permiten la transcripción exclusiva o preferentemente en células, tejidos u orgánulos particulares. Estos tipos de elementos reguladores están asociados normalmente con genes que se expresan de una manera “específica de

célula”, “específica de tejido” o “específica de orgánulo”.

Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficacia de transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

5 "ADN heterólogo" se refiere a una molécula de ADN, o una población de moléculas de ADN, que no existe de forma natural dentro de una célula hospedadora dada. Las moléculas de ADN heterólogas de una célula hospedadora particular pueden contener ADN derivado de la especie celular hospedadora (es decir, ADN endógeno) siempre que ese ADN del hospedador se combina con ADN no de hospedador (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una  
10 molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no de hospedador que codifica un polipéptido unido operativamente con un segmento de ADN del hospedador que comprende un promotor de la transcripción se considera una molécula de ADN heteróloga. Por el contrario, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen endógeno unido operativamente con un promotor exógeno. Como otra ilustración, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula de tipo silvestre se considera ADN heterólogo si esa molécula de ADN se  
15 introduce en una célula mutante que carece del gen de tipo silvestre.

Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, bien producidos de forma natural o bien de forma sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan habitualmente “péptidos”.

20 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos de carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento con respecto a sus estructuras de cadena  
25 principal de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos de carbohidrato en general no se especifican, pero pueden no obstante estar presentes.

Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no de hospedador es un péptido o polipéptido “heterólogo”.

30 Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tienen la capacidad de replicar de forma autónoma en una célula hospedadora. Los vectores de clonación normalmente contienen uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinable sin pérdida de una función  
35 biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores normalmente incluyen genes que proporcionan resistencia a tetraciclina o resistencia a ampicilina.

Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula hospedadora. normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica se sitúa habitualmente bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen está “unido operativamente” al promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central están unidos operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

45 Un “hospedador recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heteróloga, tal como un vector de clonación o vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un hospedador recombinante es una célula que produce zB7R1 de un vector de expresión. Por el contrario, zB7R1 puede producirse por una célula que es una “fuente natural” de zB7R1, y que carece de un vector de expresión.

50 Los "transformantes integradores" son células hospedadoras recombinantes, en las que se ha integrado ADN heterólogo en el ADN genómico de las células.

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

El término "receptor" indica una proteína asociada a célula que se une con una molécula bioactiva denominada un  
60 “contrarreceptor”. Esta interacción media en el efecto del contrarreceptor en la célula. Los receptores pueden estar unidos a membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de hormona estimulante del tiroides, receptor beta adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de hormona del crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura multidominio que comprende un dominio  
65 de unión a contrarreceptor extracelular y un dominio efector intracelular que está implicado normalmente en la transducción de señal. En ciertos receptores unidos a membrana, el dominio de unión a contrarreceptor extracelular

y el dominio efector intracelular están localizados en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

En general, la unión del contrarreceptor con el receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra molécula u otras moléculas en la célula, lo que a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que están con frecuencia ligados a interacciones de receptor- contrarreceptor incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos de la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos.

Un "receptor soluble" es un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son más habitualmente polipéptidos de unión a contrarreceptor que carecen de dominios transmembrana y citoplasmáticos, y otro enlace a la membrana celular tal como mediante glicosfosfoinositol (gpi). Los receptores solubles pueden comprender restos de aminoácidos adicionales, tales como marcadores de afinidad que posibilitan la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para unión del polipéptido a un sustrato, o secuencias de región constante de inmunoglobulina. Muchos receptores de superficie celular tienen homólogos de origen natural, solubles, que se producen por proteólisis o se traducen a partir de ARNm de corte y empalme alternativo. Los receptores solubles pueden ser monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos, no comprendiendo los receptores multiméricos en general más de 9 subunidades, preferentemente no más de 6 subunidades y más preferentemente no más de 3 subunidades. Se dice que los polipéptidos de receptores están sustancialmente libres de segmentos polipeptídicos transmembrana e intracelulares cuando carecen de suficientes partes de estos segmentos para proporcionar anclaje de membrana o transducción de señal, respectivamente. Por ejemplo, los receptores solubles representativos de zB7R1 incluyen, por ejemplo, el receptor soluble como se muestra en la SEQ ID NO: 3 o 7. Está dentro del nivel de un experto en la materia describir qué secuencias de un miembro de la familia B7 conocido comprenden el dominio extracelular y libre de un dominio transmembrana y dominio intracelular. Además, un experto en la materia usando el código genético puede determinar fácilmente polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos de receptor soluble.

La expresión "secuencia señal secretora" indica una secuencia de ADN que codifica un péptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido mayor, dirige el polipéptido mayor a través de una ruta secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido mayor se escinde habitualmente para retirar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como impurezas de carbohidratos, lípidos u otras proteínas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Normalmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente 80 % pura, al menos aproximadamente 90 % pura, al menos aproximadamente 95 % pura, más de 95 % pura, tal como 96 %, 97 % o 98 % o más pura, o más de 99 % pura. Un modo de mostrar que una preparación proteica particular contiene un polipéptido aislado es por la aparición de una única banda después de electroforesis en gel de poli(acrilamida)-dodecilsulfato sódico (SDS) de la preparación proteica y tinción del gel con azul brillante de Coomassie. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas glucosiladas o derivatizadas de forma alternativa.

Las expresiones "amino terminal" y "carboxilo terminal" se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando el contexto lo permita, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia particular o parte de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada carboxilo terminal de una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está localizada próxima al extremo carboxilo terminal de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo terminal del polipéptido completo.

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

La expresión "variante de corte y empalme" se usa en el presente documento para indicar formas alternativas de ARN transcrito a partir de un gen. La variación de corte y empalme surge de forma natural mediante el uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o menos habitualmente entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede dar como resultado varios ARNm transcritos a partir del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante de corte y empalme se usa también en el presente documento para indicar un polipéptido codificado por una variante de corte y empalme de un ARNm transcrito a partir de un gen.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunomodulador" incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfoquinas, moléculas coestimulantes, factores hematopoyéticos, y similares, y análogos sintéticos de estas moléculas.

- La expresión "par de complemento/anticomplemento" indica restos no idénticos que forman un par estable asociado de forma no covalente en condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros pares de complemento/anticomplemento a modo de ejemplo incluyen pares de receptor/contrarceptor, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos con sentido/antisentido y similares. Cuando sea deseable la disociación posterior del par de complemento/anticomplemento, el par de complemento/anticomplemento preferentemente tiene una afinidad de unión de menos de  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .
- Un "anticuerpo antiidiotípico" es un anticuerpo que se une con el dominio de región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo antiidiotípico se une con la región variable de un anticuerpo anti zB7R1, y por lo tanto, un anticuerpo antiidiotípico imita un epítipo de zB7R1.
- Un "fragmento de anticuerpo" es una parte de un anticuerpo tal como  $\text{F(ab')}_2$ ,  $\text{F(ab)}_2$ , Fab', Fab, y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti zB7R1 se une con un epítipo de zB7R1.
- La expresión "fragmento de anticuerpo" también incluye un polipéptido modificado genéticamente o uno sintético que se une con un antígeno específico, tal como polipéptidos que consisten en la región variable de cadena ligera, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas monocatenarias recombinantes en las que se conectan regiones variables ligera y pesada por un enlazador peptídico ("proteínas scFv"), y unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.
- Un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinantes de complementariedad derivadas de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.
- Los "anticuerpos humanizados" son proteínas recombinantes en las que se han transferido regiones determinantes de complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal desde cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano. La construcción de anticuerpos humanizados para uso terapéutico en seres humanos que derivan de anticuerpos murinos, tales como los que se unen con o neutralizan una proteína humana, está dentro de la experiencia de un experto en la materia.
- Como se usa en el presente documento un "agente terapéutico" es una molécula o un átomo que se conjuga con un resto de anticuerpo para producir un conjugado que es útil para terapia. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes y radioisótopos.
- Un "marcador detectable" es una molécula o un átomo que puede conjugarse con un resto de anticuerpo para producir una molécula útil para diagnóstico. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.
- La expresión "marcador de afinidad" se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse con un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para unión del segundo polipéptido con un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para el que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico puede usarse como un marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen un tramo de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, EMBO J. 4: 1075 (1985); Nilsson *et al.*, Methods Enzymol. 198: 3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31 (1988)), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp *et al.*, Biotechnology 6: 1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al.*, Protein Expression and Purification 2: 95 (1991). Están disponibles moléculas de ADN que codifican marcadores de afinidad de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).
- Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo completo, a diferencia de un fragmento de anticuerpo, que no se conjuga con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como ciertos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "componente de anticuerpo" incluye tanto un anticuerpo completo como un fragmento de anticuerpo.
- Un "inmunoconjugado" es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o un marcador detectable.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de fusión de anticuerpo" se refiere a una molécula

recombinante que comprende un componente de anticuerpo y un componente polipeptídico de zB7R1. Los ejemplos de una proteína de fusión de anticuerpo incluyen una proteína que comprende un dominio extracelular de zB7R1, y un dominio Fc o una región de unión a antígeno.

5 Un "polipéptido diana" o un "péptido diana" es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un epítipo, y que se expresa en una célula diana, tal como una célula tumoral, o una célula que porta un antígeno de agente infeccioso. Las células T reconocen epítopos peptídicos presentados por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad a un polipéptido diana o péptido diana y normalmente lisan la célula diana o reclutan otras células inmunitarias al sitio de la célula diana, destruyendo de este modo la célula diana.

10 Un "péptido antigénico" es un péptido que se unirá con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad para formar un complejo de MHC-péptido que se reconoce por una célula T, induciendo de este modo una respuesta de linfocitos citotóxicos tras la presentación a la célula T. Por lo tanto, los péptidos antigénicos son capaces de unirse con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad apropiada e inducir una respuesta de células T citotóxicas, tales como lisis celular o liberación de citocinas específicas contra la célula diana que se une con o expresa el antígeno. El péptido antigénico puede unirse en el contexto de una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II, en una célula presentadora de antígeno o en una célula diana.

15 En eucariotas, la ARN polimerasa II cataliza la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Una molécula de ácido nucleico puede diseñarse para contener un molde de ARN polimerasa II en el que el transcrito de ARN tiene una secuencia que es complementaria de la de un ARNm específico. El transcrito de ARN se denomina "ARN antisentido" y una molécula de ácido nucleico que codifica el ARN antisentido se denomina "gen antisentido". Las moléculas de ARN antisentido son capaces de unirse con moléculas de ARNm, dando como resultado una inhibición de la traducción de ARNm.

20 Un "oligonucleótido antisentido específico para zB7R1" o un "oligonucleótido antisentido de zB7R1" es un oligonucleótido que tiene una secuencia (a) capaz de formar una triple cadena estable con una parte del gen de zB7R1, o (b) capaz de formar una doble cadena estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen de zB7R1.

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

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

35 La expresión "gen de zB7R1 variante" se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de SEQ ID NO: 2 (es decir SEQ ID NO: 6). Dichas variantes incluyen polimorfismos de origen natural de genes de zB7R1, así como genes sintéticos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Son formas variables adicionales de genes de zB7R1 moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o supresiones de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Puede identificarse un gen de zB7R1 variante, por ejemplo, determinando si el gen hibrida con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o su complemento, en condiciones rigurosas.

40 Como alternativa, pueden identificarse genes de zB7R1 variantes por comparación de secuencias. Dos secuencias de aminoácidos tienen "100 % de identidad de secuencia de aminoácidos" si los restos de aminoácidos de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia. De forma similar, dos secuencias de nucleótidos tienen "100 % de identidad de secuencia de nucleótidos" si los restos de nucleótidos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia. Pueden realizarse comparaciones de secuencia usando programas de software convencionales tales como los incluidos en el conjunto de bioinformática LASERGENE, que produce DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos determinando el alineamiento óptimo son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997), Wu *et al.* (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), y Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing*, 2ª edición (Academic Press, Inc. 1998)). Se describen posteriormente métodos particulares para determinar la identidad de secuencia.

45 Independientemente del método particular usado para identificar un gen de zB7R1 variante o polipéptido de zB7R1 variante, un gen variante o polipéptido codificado por un gen variante puede caracterizarse funcionalmente por la capacidad para unirse específicamente con un anticuerpo anti zB7R1. Un gen de zB7R1 variante o polipéptido de zB7R1 variante puede también caracterizarse funcionalmente por la capacidad para unirse con su contrarreceptor o sus contrarreceptores, usando un ensayo biológico o bioquímico descrito en el presente documento.

La expresión “variante alélica” se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Surge variación alélica de forma natural mediante mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

El término “ortólogo” indica un polipéptido o una proteína obtenido de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o una proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre ortólogos son el resultado de especiación.

Los “parálogos” son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas hechas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen mediante duplicación génica. Por ejemplo,  $\alpha$ -globina,  $\beta$ -globina y mioglobina son parálogos entre sí.

Como se usa en el presente documento, la expresión “respuesta inmunitaria” incluye respuestas de células T y/o B, es decir, respuestas inmunitarias celulares y/o humorales. En una realización, las composiciones y métodos desvelados en el presente documento pueden usarse para reducir o potenciar respuestas de células T auxiliares (Th), y más preferentemente, respuestas de células Th1. En otra realización, las composiciones y métodos desvelados en el presente documento pueden usarse para reducir o potenciar las respuestas de células T citotóxicas (Tc). Los métodos reivindicados pueden usarse para reducir o potenciar las respuestas inmunitarias tanto primarias como secundarias y la función efectora (por ejemplo, actividad citolítica, producción de citocinas y anticuerpos y presentación de antígenos). La respuesta inmunitaria de un sujeto puede determinarse fácilmente por el experto en la materia usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayando con respecto a la producción de anticuerpos, proliferación de células inmunitarias, la liberación de citocinas, la expresión de marcadores de superficie celular, citotoxicidad, etc.

Por “señalización de zB7R1”, “señalización mediada por zB7R1”, “señalización negativa mediada por zB7R1” y variaciones de las mismas se entiende señalización intracelular en linfocitos provocada por la unión y/o activación del receptor de zB7R1 por su ligando o sus ligandos correspondientes dando como resultado la atenuación y/o regulación negativa de la actividad de linfocitos. En un aspecto, la señalización mediada por zB7R1 comprende activación de SHP-1 y/o SHP-2.

La “actividad de linfocitos” como se usa en el presente documento se refiere a los procesos inmunológicos de activación de células B y T, proliferación, diferenciación y supervivencia, así como funciones inmunitarias efectoras asociadas en células linfocíticas incluyendo actividad citolítica (células Tc), producción de citocinas (células Th), producción de anticuerpos (células B) y presentación de antígenos (células B). Como se ha indicado anteriormente, hay numerosos ensayos bien conocidos por los expertos en la materia para detectar y/o supervisar dichos procesos, incluyendo pero sin limitación los ensayos descritos en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente bloqueante” incluye los agentes que interfieren con la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor y/o que interfieren con la capacidad del contrarreceptor para inhibir la actividad de linfocitos, por ejemplo, como se mide por producción de citocinas y/o proliferación. La expresión “agente de bloqueo” incluye además agentes que inhiben la capacidad de zB7R1 para unirse con un ligando natural y/o que interfieren con la capacidad de zB7R1 para inhibir la actividad de células T. Los agentes a modo de ejemplo incluyen anticuerpos de bloqueo de función, así como péptidos que bloquean la unión de zB7R1 con su contrarreceptor pero que no consiguen estimular la señalización mediada por zB7R1 en un linfocito (por ejemplo, proteínas de fusión de zB7R1), peptidomiméticos, moléculas pequeñas y similares. Los agentes de bloqueo preferidos incluyen agentes capaces de inhibir la asociación inducible de zB7R1 con SHP-1 y/o SHP-2, o la transducción de señal que deriva de la interacción de SHP-1 y/o SHP-2 con zB7R1.

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente mimético” incluye los agentes que imitan la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor y/o que aumentan, potencian o mejoran la capacidad de zB7R1 y/o su contrarreceptor para inhibir la actividad de linfocitos. Los agentes a modo de ejemplo incluyen anticuerpos activadores de función, así como péptidos que incrementan o potencian la capacidad de zB7R1 para unirse con su contrarreceptor o sustituyen el papel del contrarreceptor en la estimulación de la señalización mediada por zB7R1 (por ejemplo, proteínas de fusión de su contrarreceptor), peptidomiméticos, moléculas pequeñas y similares.

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

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

### 10 3. Producción de polinucleótidos o genes de zB7R1

Pueden obtenerse moléculas de ácido nucleico que codifican un gen de zB7R1 humano explorando una biblioteca de ADNc o genómica humana usando sondas polinucleotídicas basadas en SEQ ID NO: 1 o 5. Estas técnicas son convencionales y bien establecidas, y pueden conseguirse usando kits de clonación disponibles de proveedores comerciales. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición, John Wiley & Sons 1995; Wu *et al.*, Methods in Gene Biotechnology, CRC Press, Inc. 1997; Aviv y Leder, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 1408 (1972); Huynh *et al.*, "Constructing and Screening cDNA Libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11," en DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I, Glover (ed.), página 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) en las páginas 47-52.

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

### 40 4. Producción de polinucleótidos y variantes génicas de zB7R1 y CD155

La presente memoria descriptiva proporciona diversas moléculas de ácido nucleico, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos de zB7R1 desvelados en el presente documento. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que, a la vista de la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencia considerable entre estas moléculas polinucleotídicas. Además, la presente memoria descriptiva también proporciona polipéptidos del receptor monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos solubles aislados que comprenden al menos una subunidad del receptor zB7R1 que es sustancialmente homóloga del polipéptido del receptor de SEQ ID NO: 2 o 5. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva contempla moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de zB7R1 que comprenden nucleótidos degradados de SEQ ID NO: 1 y sus equivalentes de ARN.

La Tabla 1 expone los códigos de una letra para indicar posiciones de nucleótidos degeneradas. "Resoluciones" son los nucleótidos indicados por una letra del código. "Complemento" indica el código para el nucleótido o los nucleótidos complementarios. Por ejemplo, el código Y indica C o T, y su complemento R indica A o G, siendo A complementaria de T, y siendo G complementaria de C.

Tabla 1

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T

K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	D G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

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

5

Tabla 2

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

Un experto en la materia apreciará que se introduce algo de ambigüedad en la determinación de un codón degenerado, que es representativo de todos los posibles codones que codifican un aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR) y el codón degenerado de arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre codones que codifican fenilalanina y leucina. Por lo tanto, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto habitual en la materia puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Las secuencias variantes pueden ensayarse fácilmente con respecto a funcionalidad como se describe en el presente documento.

Diferentes especies pueden mostrar "uso codónico preferente". En general, véase, Grantham *et al.*, Nucl. Acids Res. 8: 1893 (1980), Haas *et al.* Curr. Biol. 6: 315 (1996), Wain-Hobson *et al.*, Gene 13:355 (1981), Grosjean y Fiers, Gene 18: 199 (1982), Holm, Nuc. Acids Res. 14: 3075 (1986), Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573 (1982), Sharp y Matassi, Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 851 (1994), Kane, Curr. Opin. Biotechnol. 6: 494 (1995), y Makrides, Microbiol. Rev. 60: 512 (1996). Como se usa en el presente documento, la expresión "uso codónico preferente" o "codones preferentes" es una expresión de la técnica que se refiere a codones de traducción de proteínas que se usan más frecuentemente en células de una cierta especie, favoreciendo por lo tanto uno o algunos representantes de los codones posibles que codifican cada aminoácido (véase Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede codificarse por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamífero ACC es el codón más habitualmente usado; en otras especies, por ejemplo, células de insecto, levadura, virus o bacterias, pueden preferirse diferentes codones de Thr. Pueden introducirse codones preferentes para una especie particular en los polinucleótidos desvelados en el presente documento por diversos métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias codónicas preferentes en ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína haciendo la traducción

de proteínas más eficaz dentro de un tipo celular o especie particular. Por lo tanto, las secuencias codónicas degradadas desveladas en el presente documento sirven como un molde para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos celulares y especies habitualmente usados en la técnica y desvelados en el presente documento. Las secuencias que contienen codones preferentes pueden ensayarse y optimizarse para expresión en diversas especies, y ensayarse con respecto a funcionalidad como se desvela en el presente documento.

Puede aislarse ADNc que codifica zB7R1 por diversos métodos, tal como explorando con un ADNc humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degradadas basadas en las secuencias desveladas. También puede clonarse un ADNc usando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores diseñados a partir de las secuencias de zB7R1 humanas representativas desveladas en el presente documento. Además, puede usarse una biblioteca de ADNc para transformar o transfectar células hospedadoras, y puede detectarse expresión del ADNc de interés con un anticuerpo para el polipéptido de zB7R1.

Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia desvelada en SEQ ID NO: 1 representa un único alelo de zB7R1 humano, y que se espera que se produzca variación alélica y corte y empalme alternativo (es decir SEQ ID NO: 5). Pueden clonarse variantes alélicas de esta secuencia explorando ADNc o bibliotecas genómicas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento, incluyendo las que contienen mutaciones silenciosas y en las que las mutaciones dan como resultado cambios de secuencias de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente divulgación, como lo están proteínas que sean variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento. Se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación moléculas de ADNc generadas a partir de ARNm con corte y empalme alternativo, que conservan las propiedades del polipéptido de zB7R1, así como polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y variantes de corte y empalme de estas secuencias pueden clonarse explorando ADNc o bibliotecas genómicas de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Usando los métodos analizados anteriormente, un experto en la materia puede preparar diversos polipéptidos que comprenden un receptor zB7R1 soluble que es sustancialmente homólogo de SEQ ID NO: 2 o 5, o que codifica aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 o 6, o variantes alélicas de los mismos y conservan las propiedades de unión a contrarreceptor del receptor zB7R1 de tipo silvestre. Dichos polipéptidos pueden incluir también segmentos polipeptídicos adicionales como se desvela en general en el presente documento.

Dentro de ciertas realizaciones de la divulgación, las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden hibridar en condiciones rigurosas con moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento. Por ejemplo, dichas moléculas de ácido nucleico pueden hibridar en condiciones rigurosas con moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria de SEQ ID NO: 1, o fragmentos de las mismas.

En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5 °C más bajas que el punto térmico de fusión ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (a la fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Después de la hibridación, las moléculas de ácido nucleico pueden lavarse para retirar moléculas de ácido nucleico no hibridadas en condiciones rigurosas, o en condiciones altamente rigurosas. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 227 (1990)). Software de análisis de secuencia tal como OLIGO 6.0 (LSR, Long Lake, MN) y *Primer Premier 4.0* (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA), así como sitios de Internet, son herramientas disponibles para analizar una secuencia dada y calcular la  $T_m$  basándose en los criterios definidos por el usuario. Está dentro de las capacidades de un experto en la materia adaptar las condiciones de hibridación y lavado para uso con un híbrido polinucleotídico particular.

La presente memoria descriptiva también proporciona polipéptidos de zB7R1 aislados que tienen una identidad de secuencia sustancialmente similar con los polipéptidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6 o 7, o sus ortólogos. La expresión "identidad de secuencia sustancialmente similar" se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que tienen al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 % o más de 95 % de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 3, o sus ortólogos. Por ejemplo, pueden usarse receptores zB7R1 variantes y ortólogos para generar una respuesta inmunitaria e inducir anticuerpos de reacción cruzada para zB7R1 humano. Dichos anticuerpos pueden humanizarse, y modificarse como se describe en el presente documento, y usarse terapéuticamente para tratar psoriasis, artritis psoriásica, EII, colitis, endotoxemia así como en otras aplicaciones terapéuticas descritas en el presente documento.

La presente memoria descriptiva también contempla moléculas de ácido nucleico variantes de zB7R1 que pueden identificarse usando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y un ensayo de hibridación. Dichas variantes de zB7R1 incluyen moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las que la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,5x - 2x con SDS 0,1 % a 55 - 65 °C, y (2) que codifican un polipéptido que tiene al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más del 95 % tal como 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Como alternativa, pueden caracterizarse variantes de zB7R1 como moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 (o su complemento) en condiciones de lavado altamente rigurosas, en las que la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,1x - 0,2x con SDS 0,1 % a 50 - 65 °C, y (2) que codifican un polipéptido que tiene al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más de 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El porcentaje de identidad de secuencia se determina por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, Bull. Math. Bio. 48: 603 (1986), y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992). Brevemente, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (misma referencia) como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican por los códigos de una letra convencionales). El porcentaje de identidad se calcula después como:  $([\text{Número total de coincidencias idénticas}] / [\text{longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias}]) \times 100$ .

Tabla 3

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

Los expertos en la materia aprecian que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una variante de zB7R1 potencial. El algoritmo FASTA se describe en Pearson y Lipman, Proc. Acad Nat. Sci. USA 85: 2444 (1988), y en

Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990). Brevemente, FASTA caracteriza en primer lugar la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia de consulta (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) y una secuencia de ensayo que tiene la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup = 2), sin considerar sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos conservativas. Las diez regiones con la mayor densidad de identidades se vuelven a puntuar después comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos y los extremos de las regiones se "recortan" para incluir solamente los restos que contribuyen a la mayor puntuación. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor de "punto de corte" (calculado por una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor ktup), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones de mayor puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970) Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)), que permite inserciones y supresiones de aminoácidos. Son parámetros ilustrativos para análisis de FASTA: ktup=1, penalización de apertura de hueco=10, penalización de extensión de hueco=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

FASTA también puede usarse para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una relación como se ha desvelado anteriormente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar entre uno y seis, preferentemente de tres a seis, más preferentemente tres, con otros parámetros ajustados como se ha descrito anteriormente.

La presente memoria descriptiva incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene un cambio de aminoácido conservativo, en comparación con una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento. Por ejemplo, pueden obtenerse variantes que contienen una o más sustituciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en las que un alquil aminoácido sustituye un alquil aminoácido en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido aromático sustituye un aminoácido aromático en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido que contiene azufre sustituye un aminoácido que contiene azufre en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido que contiene hidroxilo sustituye un aminoácido que contiene hidroxilo en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido ácido sustituye un aminoácido ácido en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, un aminoácido básico sustituye un aminoácido básico en una secuencia de aminoácidos de zB7R1, o un aminoácido monocarboxílico dibásico sustituye un aminoácido monocarboxílico dibásico en una secuencia de aminoácidos de zB7R1. Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, se ilustra una "sustitución de aminoácidos conservativa" por una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina y (6) lisina, arginina e histidina. La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineamientos múltiples locales de segmentos de secuencia proteica, que representan regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)). En consecuencia, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 pueden usarse para definir sustituciones de aminoácidos conservativas que pueden introducirse en las secuencias de aminoácidos de la presente divulgación. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basándose solamente en propiedades químicas (como se ha analizado anteriormente), la expresión "sustitución de aminoácido conservativa" preferentemente se refiere a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 de más de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservativa si la sustitución se caracteriza por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2 o 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones de aminoácidos conservativas preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservativas más preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 o 3). Las variantes particulares de zB7R1 se caracterizan por tener al menos 70 %, al menos 80 %, al menos el 90 %, al menos 95 % o más del 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos correspondiente (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 6 o 7), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos se debe a una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

Pueden introducirse cambios de aminoácidos conservativos en un gen de zB7R1, por ejemplo, sustituyendo los nucleótidos enumerados en SEQ ID NO: 1 o 5 por otros nucleótidos. Dichas variantes de "aminoácidos conservativos" pueden obtenerse por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, mutagénesis de el cribado de enlazador, mutagénesis que usa la reacción en cadena de la polimerasa y similares (véase Ausubel (1995); McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991)). Puede identificarse un polipéptido de zB7R1 variante por la capacidad de unirse específicamente con anticuerpos anti zB7R1.

Las proteínas desveladas en el presente documento también pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxioprolina, *trans*-4-hidroxioprolina, *N*-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, ácido tiazolidincarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen varios métodos en la técnica para incorporar restos de aminoácidos de origen no

natural en proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido usando ARNt supresores aminoacilados químicamente. Se conocen en la técnica métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se realiza normalmente en un sistema sin células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 113: 2722 (1991), Ellman *et al.*, Methods Enzymol. 202: 301 (1991), Chung *et al.*, Science 259: 806 (1993), y Chung *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 10145 (1993).

En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en oocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores aminoacilados químicamente (Turcatti *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 19991 (1996)). Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a reemplazarse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o los aminoácidos de origen no natural deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide *et al.*, Biochem. 33: 7470 (1994). Los restos de aminoácidos de origen natural pueden convertirse en especies de origen no natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida para expandir adicionalmente la variedad de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2: 395 (1993)).

Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales pueden sustituir restos de aminoácidos de zB7R1.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente divulgación pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis de el cribado de alanina (Cunningham y Wells, Science 244: 1081 (1989), Bass *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88: 4498 (1991), Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering," en Proteins: Analysis and Design, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En esta última técnica, se introducen mutaciones de alanina individuales en cada resto en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se ensayan con respecto a actividad biológica para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 4699 (1996).

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

Pueden realizarse múltiples sustituciones de aminoácidos y ensayarse usando métodos conocidos de mutagénesis y el cribado, tales como los desvelados en Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241: 53 (1988)) o Bowie y Sauer (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 2152 (1989)). Brevemente, estos autores desvelan métodos para seleccionar aleatoriamente de forma simultánea dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y después secuenciar los polipéptidos mutados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, Biochem. 30: 10832 (1991), Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409, Huse, publicación internacional n.º WO 92/06204 y mutagénesis dirigida (Derbyshire *et al.*, Gene 46:145 (1986), y Ner *et al.*, DNA 7:127, (1988)). Además, puede usarse zB7R1 marcado con biotina o FITC para clonación de expresión de contrarreceptores de zB7R1.

También pueden generarse variantes de las secuencias de nucleótidos y polipeptídicas de zB7R1 desveladas mediante redistribución de ADN como se desvela en Stemmer, Nature 370: 389 (1994), Stemmer, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91: 10747 (1994), y la publicación internacional n.º WO 97/20078. Brevemente, se generan moléculas de ADN variantes mediante recombinación homóloga *in vitro* mediante fragmentación aleatoria de un ADN precursor seguido de reensamblaje usando PCR, que da como resultado mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica puede modificarse usando una familia de moléculas de ADN precursoras, tales como variantes alélicas o moléculas de ADN de diferentes especies, para introducir variabilidad adicional en el proceso. La selección o el el cribado con respecto a la actividad deseada, seguida de iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayo proporciona "evolución" rápida de secuencias seleccionando mutaciones deseables seleccionando simultáneamente contra cambios perjudiciales.

Los métodos de mutagénesis como se desvelan en el presente documento pueden combinarse con métodos de el cribado automática de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos clonados, mutados, en células hospedadoras. Pueden recuperarse moléculas de ADN mutadas que codifican polipéptidos biológicamente activos, o polipéptidos que se unen con anticuerpos anti zB7R1, de las células hospedadoras y secuenciarse rápidamente usando equipamiento moderno. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

La presente memoria descriptiva también incluye “fragmentos funcionales” de polipéptidos de zB7R1 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Pueden realizarse análisis de supresión rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de zB7R1. Como ilustración, las moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 5 pueden digerirse con nucleasa *Bal31* para obtener una serie de supresiones anidadas. Los fragmentos después se insertan en vectores de expresión en fase de lectura apropiada, y las polipéptidos expresados se aíslan y se ensayan con respecto a la capacidad para unirse con anticuerpos anti zB7R1. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es usar mutagénesis dirigida a oligonucleótido para introducir supresiones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un gen de zB7R1 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

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

La presente memoria descriptiva también contempla fragmentos funcionales de un gen de zB7R1 que tienen cambios de aminoácidos, en comparación con una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento. Puede identificarse un gen de zB7R1 variante basándose en la estructura determinando el nivel de identidad con secuencias de aminoácidos y nucleótidos desveladas, como se ha analizado anteriormente. Un enfoque alternativo para identificar un gen variante basándose en la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de zB7R1 variante potencial puede hibridar con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como SEQ ID NO: 1 o 5.

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

La presente memoria descriptiva también proporciona fragmentos polipeptídicos o péptidos que comprenden una parte portadora de epítipo de un polipéptido de zB7R1 descrito en el presente documento. Dichos fragmentos o péptidos pueden comprender un “epítipo inmunogénico”, que es una parte de una proteína que induce una respuesta de anticuerpo cuando la proteína completa se usa como un inmunógeno. Pueden identificarse péptidos portadores de epítopos inmunogénicos usando métodos convencionales (véase, por ejemplo, Geysen *et al.*, *Proc. Nat. Ac., Sci. USA* 81: 3998 (1983)).

Por el contrario, los fragmentos polipeptídicos o péptidos pueden comprender un “epítipo antigénico”, que es una región de una molécula proteica con la que se puede unir específicamente un anticuerpo. Ciertos epítopos consisten en un tramo lineal o contiguo de aminoácidos, y la antigenicidad de dicho epítipo no se ve alterada por agentes desnaturizantes. Se conoce en la técnica que péptidos sintéticos relativamente cortos que pueden imitar epítopos de una proteína pueden usarse para estimular la producción de anticuerpos contra la proteína (véase, por ejemplo, Sutcliffe *et al.*, *Science* 219: 660 (1983)). En consecuencia, péptidos que portan epítopos antigénicos, péptidos antigénicos, epítopos y polipéptidos de la presente divulgación son útiles para inducir anticuerpos que se unen con los polipéptidos descritos en el presente documento, así como para identificar y cribar anticuerpos monoclonales anti zB7R1 que son neutralizantes, y que pueden actuar como agonistas, unirse con, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de su contrarreceptor. Dichos anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente divulgación pueden unirse con epítipo antigénico de zB7R1. Pueden usarse perfiles de hidrofilia de Hopp/Woods para determinar regiones que tienen el mayor potencial antigénico dentro de SEQ ID NO: 3 (Hopp *et*

*al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.78: 3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986 y Triquier *et al.*, Protein Engineering 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis restos deslizante. Se ignoraron los restos G, S y T internados y los restos H, Y y W expuestos. En zB7R1 estas regiones pueden determinarse por un experto en la materia. Además, los epítomos antigénicos de zB7R1 dentro de SEQ ID NO: 2 como se predice por una representación de Jameson-Wolf, por ejemplo, usando el programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madison, WI) actúan como epítomos antigénicos preferidos, y pueden determinarse por un experto en la materia. Dichos epítomos antigénicos incluyen (1) restos de aminoácidos 80 a 86 de SEQ ID NO: 2; (2) restos de aminoácidos 163 a 170 de SEQ ID NO: 2; (3) restos de aminoácidos 163 a 190 de SEQ ID NO: 2; (4) restos de aminoácidos 175 a 190 de SEQ ID NO: 2; y (5) restos de aminoácidos 211 a 221 de SEQ ID NO: 2. En realizaciones preferidas de la divulgación, los epítomos antigénicos con los que se unen los anticuerpos neutralizantes desvelados en el presente documento contendrían restos de SEQ ID NO: 2 (y restos correspondientes de SEQ ID NO: 3) que son importantes para la unión de contrarreceptor-receptor.

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

Para cualquier polipéptido de zB7R1, incluyendo variantes y proteínas de fusión, un experto habitual en la materia puede generar fácilmente una secuencia polinucleotídica completamente degradada que codifica esa variante usando la información expuesta en las Tablas 1 y 2 anteriores. Además, los expertos en la materia pueden usar software convencional para idear variantes de zB7R1 basadas en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas en el presente documento.

##### 5. Producción de polipéptidos de zB7R1 y CD155

Los polipéptidos desvelados en el presente documento, incluyendo polipéptidos de longitud completa; receptores solubles monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos y multiméricos; receptores de longitud completa; fragmentos de receptores (por ejemplo fragmentos de unión a contrarreceptor y epítomos antigénicos), fragmentos funcionales y proteínas de fusión, pueden producirse en células hospedadoras recombinantes siguiendo técnicas convencionales. Para expresar un gen de zB7R1 o CD155, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido debe unirse operativamente con secuencias reguladoras que controlan la expresión de la transcripción en un vector de expresión y después introducirse en una célula hospedadora. Además de secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras de la traducción y un gen marcador que es adecuado para selección de células que portan el vector de expresión.

Los vectores de expresión que son adecuados para producción de una proteína ajena en células eucariotas normalmente contienen (1) elementos de ADN procarióticos que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibióticos para proporcionar el crecimiento y selección del vector de expresión en un hospedador bacteriano; (2) elementos de ADN eucariota que controlan el inicio de la transcripción tales como un promotor; y (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de transcritos, tales como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación. Como se ha analizado anteriormente, los vectores de expresión también pueden incluir secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia secretora que dirige el polipéptido heterólogo a la ruta secretora de una célula hospedadora. Por ejemplo, un vector de expresión de zB7R1 puede comprender un gen de zB7R1 y una secuencia secretora derivada de cualquier gen secretado.

Pueden expresarse en células de mamífero proteínas de zB7R1 o CD 155 de la presente divulgación. Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero, ATCC CRL 1587), células de riñón embrionario humano (293-HEK, ATCC CRL 1573), células de riñón de cría de hámster (BHK-21, BHK-570, ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34), células de ovario de hámster chino (CHO-K1, ATCC CCL61, CHO DG44 (Chasin *et al.*, Som. Cell Molec.)), células de hipófisis de rata (GH1, ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rata (H-4-II-E, ATCC CRL 1548), células de riñón de mono transformadas con SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) y células embrionarias murinas (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

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

virales de mamífero, por ejemplo, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de simio o similares, en los que las señales reguladoras se asocian con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. También pueden obtenerse secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción adecuadas a partir de genes de mamífero, por ejemplo, genes de actina, colágeno, miosina y metalotioneína.

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

15 Como alternativa, puede usarse un promotor procariótico tal como el promotor de la ARN polimerasa T3 de bacteriófago, para controlar la expresión génica de zB7R1 en células de mamífero si el promotor procariota se regula por un promotor eucariota (Zhou *et al.*, Mol. Cell. Biol. 10: 4529 (1990), y Kaufman *et al.*, Nucl. Acids Res. 19:4485 (1991)).

20 En ciertas realizaciones, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de receptor soluble zB7R1, un fragmento de polipéptido de zB7R1, un receptor soluble de CD155 o un fragmento de un polipéptido de CD 155 está unido operativamente con otros elementos genéticos requeridos para su expresión, que incluyen en general un promotor y terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá habitualmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la materia reconocerán que dentro de ciertos sistemas pueden proporcionarse marcadores seleccionables en vectores separados, y puede proporcionarse replicación del ADN exógeno por integración en el genoma de la célula hospedadora. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es un problema de diseño rutinario dentro del nivel de la experiencia habitual en la técnica. Muchos de dichos elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de proveedores comerciales. Pueden cotransfectarse múltiples componentes de un complejo de receptor soluble en vectores de expresión individuales o pueden estar contenidos en un único vector de expresión. Dichas técnicas de expresión de múltiples componentes de complejos proteicos se conocen bien en este campo.

35 Un vector de expresión puede introducirse en células hospedadoras usando diversas técnicas convencionales incluyendo transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas, suministro mediado por microproyectiles, electroporación y similares. Las células transfectadas pueden seleccionarse y propagarse para proporcionar células hospedadoras recombinantes que comprenden el vector de expresión integrado de forma estable en el genoma de la célula hospedadora. Se describen técnicas para introducir vectores en células eucariotas y técnicas para seleccionar dichos transformantes estables usando un marcador seleccionable dominante en Ausubel (1995) y en Murray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991).

45 Por ejemplo, un marcador seleccionable adecuado es un gen que proporciona resistencia al antibiótico neomicina. En este caso, la selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similares. También pueden usarse sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un proceso denominado "amplificación". La amplificación se lleva a cabo cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y aumentando después la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que produzcan altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable adecuado es dihidrofolato reductasa (DHFR), que confiere resistencia a metotrexato. También pueden usarse otros genes de resistencia farmacológica (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a multifármaco, puomicina acetiltransferasa). Como alternativa, pueden usarse marcadores que introducen un fenotipo alterado, tal como proteína verde fluorescente, o proteínas de superficie celular tales como CD4, CD8, MHC de Clase I, fosfatasa alcalina placentaria para clasificar células transfectadas con respecto a células no transfectadas por medios tales como clasificación por FACS o tecnología de separación por perlas magnéticas.

55 También pueden producirse polipéptidos de zB7R1 mediante células de mamífero cultivadas usando un sistema de suministro viral. Los virus a modo de ejemplo para este fin incluyen adenovirus, retrovirus, herpes virus, virus vaccinia y virus adenoasociado (AAV). El adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es actualmente el vector de transferencia génica mejor estudiado para suministro de ácido nucleico heterólogo (para una revisión, véase Becker *et al.*, Meth. Cell Biol. 43:161 (1994), y Douglas y Curiel, Science & Medicine 4: 44 (1997)). Las ventajas del sistema de adenovirus incluyen la acomodación de insertos de ADN relativamente grandes, la capacidad de crecer hasta alto título, la capacidad de infectar una amplia serie de tipos celulares de mamífero y la flexibilidad que permite el uso con un gran número de vectores disponibles que contienen diferentes promotores.

65 Suprimiendo partes del genoma del adenovirus, pueden acomodarse insertos mayores (hasta 7 kb) de ADN heterólogo. Estos insertos pueden incorporarse en el ADN viral mediante ligamiento directo o mediante recombinación homóloga con un plásmido cotransfectado. Una opción es suprimir el gen *E1* esencial del vector viral,

lo que da como resultado la incapacidad de replicar a no ser que el gen *E1* se proporcione por la célula hospedadora. Pueden cultivarse, por ejemplo, células 293 humanas infectadas por vector de adenovirus (ATCC n.º CRL-1573, 45504, 45505), como células adherentes o en cultivo en suspensión a densidad celular relativamente alta para producir cantidades significativas de proteína (véase Garnier *et al.*, Cytotechnol. 15: 145 (1994)).

5 zB7R1 o CD155 también pueden expresarse en otras células eucariotas superiores, tales como células aviares, fúngicas, de insecto, de levadura o vegetales. El sistema de baculovirus proporciona un medio eficaz para introducir genes de zB7R1 clonados en células de insecto. Los vectores de expresión adecuados se basan en el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), y contienen promotores bien conocidos tales como  
 10 promotor de proteína de choque térmico (*hsp*) 70 de *Drosophila*, promotor del gen inmediato temprano del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (*ie-1*) y el promotor 39K temprano retardado, promotor p10 de baculovirus y el promotor de metalotioneína de *Drosophila*. Un segundo método para preparar baculovirus recombinante utiliza un sistema basado en transposón descrito por Luckow (Luckow *et al.*, J. Virol., 67: 4566 (1993)). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia, se vende en el kit de BAC-to-BAC (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, PFASTBAC (Life Technologies) que contiene un transposón  
 15 Tn7 para mover el ADN que codifica el polipéptido de zB7R1 a un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande denominado un "bácmido". Véase, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71: 971 (1990), Bonning *et al.*, J. Gen. Virol. 75: 1551 (1994), y Chazenbalk, y Rapoport, J. Biol. Chem. 270: 1543 (1995). Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en fase con ADN que codifica un marcador epitópico en el extremo C o N terminal del polipéptido de zB7R1 expresado, por ejemplo, un marcador epitópico Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, Proc. Acad. Sci. 82: 7952 (1985)). Usando una técnica conocida en este campo, un vector de transferencia que contiene un gen de zB7R1 se transforma en *E. coli* y se explora con respecto a bácmidos que contienen un gen *lacZ* interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El ADN de bácmido que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla después usando técnicas comunes.

25 El vector PFASTBAC ilustrativo puede modificarse en un grado considerable. Por ejemplo, el promotor de poliedrina puede retirarse y sustituirse con el promotor de proteína básica de baculovirus (también conocido como promotor *Pcor*, p6.9 o MP) que se expresa más temprano en la infección de baculovirus, y se ha mostrado que es ventajoso para expresar proteínas secretadas (véase, por ejemplo, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71: 971 (1990), Bonning, *et al.*, J. Gen. Virol. 75: 1551 (1994), y Chazenbalk y Rapoport, J. Biol. Chem. 270: 1543 (1995)). En dichas construcciones de vector de transferencia, puede usarse una versión corta o larga del promotor de proteína básica. Además, pueden construirse vectores de transferencia que reemplazan las secuencias señal secretoras de zB7R1  
 30 nativas con secuencias señal secretoras derivadas de proteínas de insecto. Por ejemplo, una secuencia señal secretora de Ecdisteroide Glucosiltransferasa (EGT), Melitina de abeja melífera (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), o gp67 de baculovirus (PharMingen: San Diego, CA) puede usarse en construcciones para reemplazar la secuencia señal secretora de zB7R1 nativa.

El virus o bácmido recombinante se usa para transfectar células hospedadoras. Las células hospedadoras de insecto adecuadas incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-*Sf*-21, una línea celular ovárica de pupa de  
 40 *Spodoptera frugiperda*, tal como *Sf9* (ATCC CRL 1711), *Sf21AE* y *Sf21* (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila*, y la línea celular HIGH FIVEO (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente de Estados Unidos n.º 5.300.435). Pueden usarse medios sin suero disponibles en el mercado para cultivar y mantener las células. Los medios adecuados son Sf900 II™ (Life Technologies) o ESF 921™ (Expression Systems) para las células Sf9; y ExcellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO™ (Life Technologies) para las células *T. ni*. Cuando se usa virus recombinante, las células se cultivan normalmente a partir de una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10<sup>5</sup> células hasta una densidad de 1-2 x 10<sup>6</sup> células momento en el cual se añade una reserva viral recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más normalmente cerca de 3.

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

60 También pueden usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura, para expresar los genes descritos en el presente documento. Las especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Los promotores adecuados para expresión en levadura incluyen promotores de *GAL1* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato quinasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *AOX1* (alcohol oxidasa), *HIS4* (histidinol deshidrogenasa) y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levadura y están fácilmente disponibles. Estos vectores incluyen vectores basados en Ylp, tales como Ylp5, vectores de YRp, tales como YRp17, vectores de YEp tales como YEp13 y vectores de YCp, tales como YCp19. Se desvelan métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir del  
 65

mismo, por ejemplo, en Kawasaki, Patente de Estados Unidos n.º 4.599.311, Kawasaki *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.931.373, Brake, Patente de Estados Unidos n.º 4.870.008, Welch *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.037.743, y Murray *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.845.075. Se seleccionan células transformadas por fenotipo determinado por el marcador seleccionable, habitualmente resistencia a fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector adecuado para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector *POT1* desvelado en Kawasaki *et al.* (Patente de Estados Unidos n.º 4.931.373), que permite seleccionar células transformadas por crecimiento en medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados adicionales para uso en levadura incluyen los de genes de enzimas glucolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, Patente de Estados Unidos n.º 4.599.311, Kingsman *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.615.974, y Bitter, Patente de Estados Unidos n.º 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véase también Patentes de Estados Unidos n.º 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454.

Se conocen en la técnica sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véase, por ejemplo, Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132: 3459 (1986), y Cregg, Patente de Estados Unidos n.º 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* de acuerdo con los métodos de McKnight *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.935.349. Se desvelan métodos para transformar *Acromonium chrysogenum* en Sumino *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.162.228. Se desvelan métodos para transformar *Neurospora* en Lambowitz, Patente de Estados Unidos n.º 4.486.533.

Por ejemplo, se desvela el uso de *Pichia methanolica* como hospedador para la producción de proteínas recombinantes en Raymond, Patente de Estados Unidos n.º 5.716.808, Raymond, Patente de Estados Unidos n.º 5.736.383, Raymond *et al.*, Yeast 14: 11-23 (1998), y en las publicaciones internacionales n.º WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Se prepararon habitualmente moléculas de ADN para uso en la transformación de *P. methanolica* como plásmidos bicatenarios, circulares, que preferentemente se linealizan antes de la transformación. Para producción de polipéptidos en *P. methanolica*, el promotor y terminador en el plásmido puede ser el de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma hospedador, se prefiere que tenga el segmento de expresión completo del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN del hospedador. Un marcador seleccionable adecuado para su uso en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *P. methanolica*, que codifica fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC, EC 4.1.1.21) y que permite que las células hospedadoras *ade2* crezcan en ausencia de adenina. Para procesos industriales a gran escala en los que sea deseable minimizar el uso de metanol, pueden usarse células hospedadoras en las que se han suprimido ambos genes de utilización de metanol (*AUG1* y *AUG2*). Para producción de proteínas secretadas, las células hospedadoras pueden ser deficientes en genes de proteasa vacuolar (*PEP4* y *PRB1*). Se usa electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en células *P. methanolica*. Las células *P. methanolica* pueden transformarse por electroporación usando un campo eléctrico pulsado, con desintegración exponencial que tiene una fuerza de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferentemente aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, más preferentemente aproximadamente 20 milisegundos.

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

Como alternativa, pueden expresarse genes de zB7R1 en células hospedadoras procarióticas. Los expertos habituales en la materia conocen bien promotores adecuados que pueden usarse para expresar polipéptidos de zB7R1 en un hospedador procariótico y estos incluyen promotores capaces de reconocer las polimerasas T4, T3, Sp6 y T7, los promotores P<sub>R</sub> y P<sub>L</sub> de bacteriófago lambda, los promotores *trp*, *recA*, de choque térmico, *lacUV5*, *lac*, *lpp-lacSpr*, *phoA* y *lacZ* de *E. coli*, promotores de *B. subtilis*, los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus*, promotores de *Streptomyces*, el promotor *int* de bacteriófago lambda, El promotor *bla* de pBR322 y el promotor CAT del gen de cloranfenicol acetil transferasa. Se han revisado promotores procariotas en Glick, J. Ind. Microbiol. 1: 277 (1987), Watson *et al.*, Molecular Biology of the Gene, 4ª ed. (Benjamin Cummins 1987), y en Ausubel *et al.* (1995).

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

Cuando se expresa un polipéptido de zB7R1 en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede estar conservado

en el citoplasma, normalmente como gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado puede después replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como por diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis frente a una solución salina tamponada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo las células (por ejemplo, mediante sonicación o choque osmótico) para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la proteína, evitando de este modo la necesidad de desnaturalizar y replegar.

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

Se proporcionan métodos convencionales para introducir vectores de expresión en células bacterianas, de levadura, de insecto y vegetales, por ejemplo, en Ausubel (1995).

- 20 Se proporcionan métodos generales para expresar y recuperar proteína ajena producida por un sistema celular de mamífero, por ejemplo, en Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), páginas 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Se proporcionan técnicas convencionales para recuperar proteína producida por un sistema bacteriano, por ejemplo, en Grisshammer *et al.*, "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells," en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover *et al.* (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995). Se describen métodos establecidos para aislar proteínas recombinantes de un sistema de baculovirus en Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995).

- 30 Como alternativa, pueden sintetizarse polipéptidos de la presente divulgación mediante síntesis de fase sólida exclusiva, métodos de fase sólida parciales, condensación de fragmentos o síntesis de solución clásica. Estos métodos de síntesis se conocen bien por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 (1963), Stewart *et al.*, "Solid Phase Peptide Synthesis" (2ª Edición), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3: 3 (1986), Atherton *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press 1989), Fields *et al.*, "Solid-Phase Peptide Synthesis," *Methods in Enzymology Volumen 289* (Academic Press 1997), y Lloyd-Williams *et al.*, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins* (CRC Press, Inc. 1997)). Las variaciones de estrategias de síntesis químicas totales, tales como "ligamiento químico nativo" y "ligamiento proteico expresado" también son convencionales (véase, por ejemplo, Dawson *et al.*, *Science* 266: 776 (1994), Hackeng *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94: 7845 (1997), Dawson, *Methods Enzymol.* 287: 34 (1997), Muir *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 6705 (1998), y Severinov y Muir, *J. Biol. Chem.* 273: 16205 (1998)).

- 40 Los péptidos y polipéptidos de la presente divulgación comprenden al menos seis, al menos nueve o al menos 15 restos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2. Como ilustración, los polipéptidos pueden comprender al menos seis, al menos nueve o al menos 15 restos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2. Dentro de ciertas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos comprenden 20, 30, 40, 50, 100 o más restos contiguos de estas secuencias de aminoácidos. Las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos péptidos y polipéptidos son útiles como cebadores y sondas de reacción en cadena de la polimerasa.

- Además, los polipéptidos de zB7R1 o CD155 y fragmentos de los mismos pueden expresarse como monómeros, homodímeros, heterodímeros, tetrámeros (analizados posteriormente) o multímeros dentro de células eucariotas superiores. Dichas células pueden usarse para producir polipéptidos de receptor zB7R1 o CD15 monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos, tetrámeros y multiméricos que comprenden al menos un polipéptido de zB7R1 o CD155 ("receptores que comprenden zB7R1", "polipéptidos de receptores que comprenden zB7R1", "receptores que comprenden CD155" o "polipéptidos de receptores que comprenden CD155"), o pueden usarse como células de ensayo en sistemas de cribado. Dentro de un aspecto de la presente divulgación, un polipéptido de la presente divulgación que comprende el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3 o 7) se produce por una célula cultivada, y la célula se usa para cribar con respecto a contrarreceptores para el receptor, incluyendo un contrarreceptor natural, así como agonistas y antagonistas del contrarreceptor natural. Para resumir este enfoque, se combina un ADNc o gen que codifica el receptor con otros elementos genéticos requeridos para su expresión (por ejemplo, un promotor de la transcripción) y el vector de expresión resultante se inserta en una célula hospedadora. Las células que expresan el ADN y producen receptor funcional se seleccionan y usan dentro de diversos sistemas de cribado. Cada componente del complejo de receptor monomérico, homodimérico, heterodimérico y multimérico puede expresarse en la misma célula. Además, los componentes del complejo de receptor monomérico, homodimérico, heterodimérico y multimérico también pueden fusionarse con un dominio transmembrana u otro resto de fusión de membrana para permitir el ensamblaje de complejo y el cribado de transfectantes como se ha descrito anteriormente.

## 6. Polinucleótidos tetraméricos de zB7R1 y CD155, polipéptidos y métodos para prepararlos

- La presente memoria descriptiva también abarca métodos para producir polipéptidos de zB7R1 o CD155 multiméricos, preferentemente tetraméricos. Estas proteínas se describen en más detalle en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º 60/60/791.626, presentada el 13 de abril de 2006. Estas proteínas de fusión comprenden un dominio VASP y un dominio de proteína heterólogo, tal como zB7R1 o CD155. Los dominios VASP derivan del gen de VASP presente en muchas especies. Las secuencias se seleccionan por su capacidad anticipada para formar estructura de proteína superenrollada, ya que esta estructura es importante para la capacidad de formar formas proteicas multiméricas. Se desea en particular para la presente divulgación la capacidad de proteínas superenrolladas para producir estructuras proteicas tetraméricas. Una realización particularmente preferida utiliza los aminoácidos 343 a 376 de la secuencia de VASP humana (aminoácidos 5 a 38 de SEQ ID NO: 23). La secuencia de ADN de longitud completa de esta proteína es SEQ ID NO: 24 y la secuencia polipeptídica de longitud completa de esta proteína es SEQ ID NO: 25.
- El trabajo con otros tipos de secuencias multimerizantes, por ejemplo, la cremallera de leucina, ha mostrado que pueden tolerarse con frecuencia un número limitado de sustituciones de aminoácidos conservativas (incluso en el resto **d**) en secuencias de cremallera sin la pérdida de capacidad de las moléculas para multimerizar (Landschultz *et al.*, (1989), mencionado anteriormente). Por lo tanto, se contemplan cambios conservativos de la secuencia nativa para el dominio VASP dentro del alcance de la divulgación. La Tabla 4 muestra los cambios conservativos que se anticipa que se toleren por la estructura superenrollada.

Tabla 4

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

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

- El dominio VASP puede ponerse en el extremo N o C terminal de la proteína heteróloga de interés, basándose en consideraciones de función (es decir si la proteína heteróloga es una proteína de membrana de tipo I o tipo II) y facilidad de construcción de la construcción. Adicionalmente, el dominio VASP puede localizarse en el medio de la proteína, creando eficazmente una proteína de fusión doble con una secuencia heteróloga, un dominio VASP y una segunda secuencia heteróloga. Las dos secuencias heterólogas para la proteína de fusión doble pueden ser iguales o diferentes.

- Específicamente, zB7R1 o CD155 pueden unirse directamente con otra proteína para formar una proteína de fusión; como alternativa, las proteínas pueden separarse por una distancia suficiente para asegurar que las proteínas formen una estructura secundaria y terciaria apropiada necesaria para la actividad biológica. Las secuencias enlazadoras adecuadas adoptarán una conformación extendida flexible y no mostrarán propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que pudiera interactuar con los dominios de función de las proteínas de fusión, y tendrán mínimo carácter hidrófobo o con carga que también podría interferir con la función de dominios de fusión. Deberían construirse secuencias enlazadoras con la repetición de 15 restos en mente, ya que puede no ser lo mejor para producir una proteína biológicamente activa restringir estrechamente el extremo N o C terminal de la secuencia heteróloga. Aparte de estas consideraciones, la longitud de la secuencia enlazadora puede variar sin afectar significativamente a la actividad biológica de la proteína de fusión. Pueden usarse secuencias enlazadoras entre todos y cada uno de los componentes de la proteína de fusión (o construcción de expresión) incluyendo marcadores de afinidad y péptidos señal. Un enlazador a modo de ejemplo es la secuencia GSGG (SEQ ID NO: 26).

- Un componente adicional de la proteína de fusión puede ser un marcador de afinidad. Dichos marcadores no alteran la actividad biológica de las proteínas de fusión, son altamente antigénicos, y proporcionan un epítipo que puede unirse de forma reversible con una molécula de unión específica, tal como un anticuerpo monoclonal, que permite la

detección rápida y purificación de una proteína de fusión expresada. Los marcadores de afinidad también pueden transmitir resistencia a degradación intracelular si se producen proteínas en bacterias, como *E. coli*. Un marcador de afinidad a modo de ejemplo es el Marcador FLAG (SEQ ID NO: 27) o el Marcador HIS<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 28). Se describen métodos para producir proteínas de fusión que utilizan este marcador de afinidad para purificación en la Patente de Estados Unidos n.º 5.011.912.

Un componente adicional más de la proteína de fusión puede ser una secuencia señal o secuencia líder. Estas secuencias se utilizan en general para permitir la secreción de la proteína de fusión de la célula hospedadora durante la expresión y también se conocen como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre. La secuencia de señal secretora puede ser la de la proteína heteróloga que se produce, si tiene dicha secuencia, o puede derivar de otra proteína secretada (por ejemplo t-PA) o sintetizarse de novo. La secuencia señal secretora está unida operativamente con secuencia de ADN de proteína de fusión, es decir, las dos secuencias se unen en la fase de lectura correcta y se sitúan para dirigir el polipéptido de nueva síntesis a la ruta secretora de la célula hospedadora. Las secuencias señal secretoras se sitúan habitualmente 5' de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal pueden situarse en otra parte de la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.037.743; Holland *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.143.830).

Por lo tanto, las composiciones de ácido nucleico de la presente memoria descriptiva encuentran uso en la preparación de todas o una parte de las proteínas de fusión VASP-zB7R1 o VASP-CD155, como se ha descrito anteriormente. Los polinucleótidos objeto (incluyendo ADNc o el gen de longitud completa) pueden usarse para expresar un producto génico parcial o completo. Pueden generarse de forma sintética construcciones que comprenden los polinucleótidos objeto. Como alternativa, se describe ensamblaje de una única etapa de un gen y plásmido completo de números grandes de oligodesoxirribonucleótidos, por ejemplo, en Stemmer *et al.*, Gene (Ámsterdam) (1995) 164 (1): 49-53. En este método, se describe PCR de ensamblaje (la síntesis de secuencias de ADN largas a partir de números grandes de oligodesoxirribonucleótidos (oligos)). El método deriva de redistribución de ADN (Stemmer, Nature (1994) 370: 389-391), y no se basa en ADN ligasa, sino que en su lugar se basa en la ADN polimerasa para construir fragmentos de ADN crecientemente mayores durante el proceso de ensamblaje. Se purifican construcciones polinucleotídicas apropiadas usando técnicas de ADN recombinante convencionales como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., y según las regulaciones actuales descritas en United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) Guidelines for Recombinant DNA Research.

Se propagan moléculas polinucleotídicas que comprenden una secuencia polinucleotídica proporcionada en el presente documento colocando la molécula en un vector. Se usan vectores virales y no virales, incluyendo plásmidos. La elección del plásmido dependerá del tipo de célula en el que se desee la propagación y el fin de la propagación. Ciertos vectores son útiles para amplificar y preparar grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión en células en cultivo. Otros vectores más son adecuados para transferencia y expresión en células en un animal o una persona completos. La elección del vector apropiado está dentro de la experiencia de la técnica. Muchos vectores tales están disponibles en el mercado. El polinucleótido parcial o de longitud completa se inserta en un vector normalmente por medio de unión por ADN ligasa a un sitio de enzima de restricción escindido en el vector. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos deseada puede insertarse por recombinación homóloga *in vivo*. Normalmente esto se consigue uniendo regiones de homología con el vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada. Se añaden regiones de homología por ligamiento de oligonucleótidos, o mediante reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores que comprenden tanto la región de homología como una parte de la secuencia de nucleótidos deseada, por ejemplo.

Para expresión, puede emplearse un casete o sistema de expresión. El producto génico codificado por un polinucleótido de la divulgación se expresa en cualquier sistema de expresión conveniente, incluyendo, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levadura, de insectos, anfibios y de mamífero. Los vectores adecuados y células hospedadoras se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.654.173. En el vector de expresión, el polinucleótido que codifica proteína heteróloga (tal como el dominio extracelular de zB7R1; es decir SEQ ID NO: 3 o 7) está unido a una secuencia reguladora según sea apropiado para obtener las propiedades de expresión deseadas. Estos pueden incluir promotores (unidos bien en el extremo 5' de la cadena con sentido o bien en el extremo 3' de la cadena antisentido), potenciadores, terminadores, operadores, represores e inductores. Los promotores pueden estar regulados o ser constitutivos. En algunas situaciones puede ser deseable usar promotores activos de forma condicional, tales como promotores específicos de tejido o específicos de estadio del desarrollo. Estos se unen con la secuencia de nucleótidos deseada usando las técnicas descritas anteriormente para enlace a vectores. Puede usarse cualquier técnica conocida en este campo. En otras palabras, el vector de expresión proporcionará una región de inicio de la transcripción y la traducción, que puede ser inducible o constitutiva, en la que la región codificante está unida operativamente bajo el control transcripcional de la región de inicio de la transcripción, y una región de terminación de la transcripción y la traducción. Estas regiones de control pueden ser nativas para el ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga de VASP, o pueden derivar de fuentes exógenas.

Los vectores de expresión en general tienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para posibilitar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas heterólogas. Puede

estar presente un marcador seleccionable operativo en el hospedador de expresión. Pueden usarse vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión, en los que el péptido de fusión exógeno proporciona funcionalidad adicional, es decir síntesis proteica aumentada, estabilidad, reactividad con antisueros definidos, un marcador enzimático, por ejemplo  $\beta$ -galactosidasa, etc.

5 Pueden prepararse casetes de expresión que comprenden una región de inicio de la transcripción, el gen o fragmento del mismo, y una región de terminación de la transcripción. Es de particular interés el uso de secuencias que permiten la expresión de epítomos o dominios funcionales, habitualmente de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, más habitualmente de al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, hasta  
10 aproximadamente 25 aminoácidos, y hasta la fase abierta de lectura completa del gen. Después de la introducción del ADN, las células que contienen la construcción pueden seleccionarse por medio de un marcador seleccionable, las células expandirse y después usarse para expresión.

15 Pueden expresarse proteínas de fusión heterólogas de VASP en procariotas o eucariotas de acuerdo con modos convencionales, dependiendo del fin de la expresión. Para producción de la proteína a gran escala, puede usarse un organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de insecto en combinación con vectores de baculovirus, o células de un organismo superior tales como vertebrados, particularmente mamíferos, por ejemplo células COS 7, HEK 293, CHO, Oocitos de *Xenopus*, etc., como las células hospedadoras de expresión. En algunas  
20 situaciones, es deseable expresar una molécula de ácido nucleico de VASP polimórfica en células eucariotas, en las que la proteína VASP polimórfica se beneficiará del plegamiento nativo y las modificaciones postraduccionales. También pueden sintetizarse péptidos pequeños en el laboratorio. Pueden usarse polipéptidos que son subconjuntos de la secuencia de VASP completa para identificar e investigar partes de la proteína importantes para la función.

25 Los sistemas de expresión específicos de interés incluyen sistemas de expresión derivados de células bacterianas, de levadura, de insecto y células de mamíferos. Se proporcionan posteriormente sistemas representativos de cada una de estas categorías: Bacterias. Los sistemas de expresión en bacterias incluyen los descritos en Chang *et al.*, Nature (1978) 275: 615; Goeddel *et al.*, Nature (1979) 281: 544; Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res. (1980) 8: 4057; documento EP 0 036.776; Patente de Estados Unidos n.º 4.551.433; DeBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1983) 80: 21-25; y Siebenlist *et al.*, Cell (1980) 20: 269. Levadura. Los sistemas de expresión en levadura incluyen  
30 los descritos en Hinnen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1978) 75: 1929; Ito *et al.*, J. Bacteriol. (1983) 153: 163; Kurtz *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1986) 6: 142; Kunze *et al.*, J. Basic Microbiol. (1985)25: 141; Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. (1986) 132: 3459; Roggenkamp *et al.*, Mol. Gen. Genet. (1986) 202: 302; Das *et al.*, J. Bacteriol. (1984) 158: 1165; De Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol. (1983) 154: 737; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology (1990)8: 135; Kunze *et al.*, J. Basic Microbiol. (1985)25: 141; Cregg *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1985) 5: 3376; Patentes de Estados Unidos n.º 4.837.148 y 4.929.555; Beach y Nurse, Nature (1981) 300: 706; Davidow *et al.*, Curr. Genet. (1985) 10: 380; Gaillardin *et al.*, Curr. Genet. (1985) 10: 49; Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 112: 284-289; Tilburn *et al.*, Gene (1983) 26: 205-221; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1984) 81: 1470-1474; Kelly y Hynes, EMBO J. (1985) 4: 475479; documentos EP 0 244.234; y WO 91/00357. Células de insecto. La expresión de genes heterólogos en insectos se consigue como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.745.051;  
40 Friesen *et al.*, "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", en: The Molecular Biology Of Baculoviruses (1986) (W. Doerfler, ed.); EP 0 127.839; EP 0 155.476; y Vlak *et al.*, J. Gen. Virol. (1988) 69: 765-776; Miller *et al.*, Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42: 177; Carbonell *et al.*, Gene (1988) 73: 409; Maeda *et al.*, Nature (1985) 315: 592-594; Lebacqz-Verheyden *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1988) 8: 3129; Smith *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1985) 82: 8844; Miyajima *et al.*, Gene (1987) 58: 273; y Martin *et al.*, DNA (1988) 7: 99. Numerosas cepas de baculovirus y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores se describen en Luckow *et al.*, Bio/Technology (1988) 6: 47-55, Miller *et al.*, Generic Engineering (1986) 8: 277-279, y Maeda *et al.*, Nature (1985) 315: 592-594. Células de mamífero. Se consigue expresión de mamífero como se describe en Dijkema *et al.*, EMBO J. (1985) 4: 761, Gorman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1982) 79: 6777, Boshart *et al.*, Cell (1985) 41: 521 y Patente de Estados Unidos n.º 4.399.216. Se facilitan otras características de la expresión de mamíferos como se describe en Ham y Wallace, Meth. Enz. (1979) 58: 44, Barnes y Sato, Anal. Biochem. (1980) 102: 255, Patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, WO 90/103430, WO 87/00195 y Patente de Estados Unidos n.º RE 30.985.

55 Cuando se usa cualquiera de las células hospedadoras anteriores, u otras células u organismos hospedadores apropiados para replicar y/o expresar los polinucleótidos o ácidos nucleicos desvelados en el presente documento, el ácido nucleico replicado resultante, ARN, proteína o polipéptido expresado, están dentro del alcance de la divulgación como producto de la célula o el organismo hospedador. El producto se recupera por cualquier medio apropiado conocido en la técnica.

60 Una vez que el gen correspondiente a un polinucleótido seleccionado se ha identificado, su expresión puede regularse en la célula para la que el gen es nativo. Por ejemplo, un gen endógeno de una célula puede regularse por una secuencia reguladora exógena insertada en el genoma de la célula en una localización suficiente para al menos potenciar la expresión del gen en la célula. La secuencia reguladora puede diseñarse para integrar en el genoma mediante recombinación homóloga, como se desvela en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.641.670 y 5.733.761,  
65 o pueden diseñarse para integrar en el genoma mediante recombinación no homóloga, como se describe en el documento WO 99/15650.

La memoria descriptiva proporciona además vectores recombinantes y células hospedadoras que comprenden polinucleótidos desvelados en el presente documento. En general, se aíslan vectores recombinantes y células hospedadoras de la divulgación; sin embargo, una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la divulgación puede ser parte de un animal modificado genéticamente.

5 La presente memoria descriptiva proporciona además vectores recombinantes (“construcciones”) que comprenden un polinucleótido desvelado en el presente documento. Los vectores recombinantes incluyen vectores usados para la propagación de un polinucleótido de la divulgación, y vectores de expresión. Los vectores útiles para introducción del polinucleótido incluyen plásmidos y vectores virales, por ejemplo vectores basados en retrovirus, vectores de adenovirus, etc. que se mantienen de forma transitoria o estable en células de mamífero. Puede emplearse una amplia diversidad de vectores para transfección y/o integración del gen en el genoma de las células. Como alternativa, puede emplearse microinyección, fusión o similares para la introducción de genes en una célula hospedadora adecuada.

15 Los vectores de expresión tienen en general sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas heterólogas. Puede estar presente un marcador seleccionable operativo en el hospedador de expresión. Pueden usarse vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión, en los que el péptido de fusión exógeno proporciona funcionalidad adicional, es decir síntesis de proteínas aumentada, estabilidad, reactividad con antisueros definidos, un marcador enzimático, por ejemplo  $\beta$ -galactosidasa, etc.

25 Pueden prepararse casetes de expresión que comprenden una región de inicio de la transcripción, el gen o fragmento del mismo, y una región de terminación de la transcripción. Es de particular interés el uso de secuencias que permiten la expresión de epítomos funcionales o dominios, habitualmente de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, más habitualmente de al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 45 aminoácidos de longitud, y hasta la fase abierta de lectura completa del gen. Después de la introducción del ADN, las células que contienen la construcción pueden seleccionarse por medio de un marcador seleccionable, las células expandirse y después usarse para expresión.

30 Los casetes de expresión pueden introducirse en diversos vectores, por ejemplo plásmido, BAC, YAC, bacteriófago tal como lambda, P1, M13, etc., virus animales o vegetales, y similares, en los que los vectores se caracterizan normalmente por la capacidad para proporcionar selección de células que comprenden los vectores de expresión. Los vectores pueden proporcionar mantenimiento extracromosómico, particularmente como plásmidos o virus, o para integración en el cromosoma hospedador. Cuando se desea el mantenimiento extracromosómico, se proporciona una secuencia de origen para la replicación del plásmido, que puede ser de un número de copias bajo o alto. Están disponibles para selección una amplia diversidad de marcadores, particularmente los que protegen contra toxinas, más particularmente contra antibióticos. El marcador particular que se elige se selecciona de acuerdo con la naturaleza del hospedador, en el que en algunos casos, puede emplearse complementación con hospedadores auxotróficos. La introducción de la construcción de ADN puede usar cualquier método conveniente, por ejemplo conjugación, transformación bacteriana, ADN precipitado con calcio, electroporación, fusión, transfección, infección con vectores virales, biolística, etc.

45 La presente memoria descriptiva proporciona además células hospedadoras, que pueden ser células hospedadoras aisladas, que comprenden moléculas de ácido nucleico de VASP polimórficas desveladas en el presente documento. Las células hospedadoras adecuadas incluyen procariotas tales como *E. coli*, *B. subtilis*, eucariotas, incluyendo células de insecto en combinación con vectores de baculovirus, células de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, o células de un organismo superior tal como vertebrados, incluyendo anfibios (por ejemplo, oocitos de *Xenopus laevis*) y mamíferos, particularmente seres humanos, por ejemplo células COS, células CHO, células HEK293 y similares, pueden usarse como las células hospedadoras. Pueden usarse células hospedadoras para los fines de propagar una molécula de ácido nucleico de VASP polimórfica, para la producción de un polipéptido de VASP polimórfico, o en métodos basados en células para identificar agentes que modulan un nivel de ARNm de VASP y/o proteína y/o actividad biológica en una célula.

55 Pueden modificarse células celulares primarias o clonadas y líneas celulares mediante la introducción de vectores que comprenden un ADN que codifica el polimorfismo o los polimorfismos de proteínas de fusión heterólogas de VASP. La molécula de ácido nucleico de VASP polimórfica aislada puede comprender una o más secuencias variantes, por ejemplo, un haplotipo de combinaciones que aparecen habitualmente. En una realización de la divulgación, se proporciona un panel de dos o más líneas celulares modificadas genéticamente, comprendiendo cada línea celular un polimorfismo de VASP para ensayos de sustrato y/o expresión. El panel puede comprender además células genéticamente modificadas con otras secuencias genéticas, incluyendo polimorfismos, particularmente otras secuencias de interés para el cribado farmacogenético, por ejemplo otros genes/mutaciones génicas asociados con obesidad, varios de los cuales se conocen en la técnica.

65 Los ácidos nucleicos objeto pueden usarse para generar animales no humanos modificados genéticamente o modificaciones génicas específicas de sitio en líneas celulares. Se pretende que el término “transgénico” abarque

animales modificados genéticamente que tengan la adición de ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga de VASP o que tengan un ADN exógeno que codifique la proteína de fusión heteróloga de VASP que se transmite de forma estable en las células hospedadoras. Pueden realizarse animales transgénicos mediante recombinación homóloga. Como alternativa, se integra aleatoriamente en el genoma una construcción de ácido nucleico. Los  
 5 vectores para integración estable incluyen plásmidos, retrovirus y otros virus animales, YAC y similares. Son de interés mamíferos transgénicos, por ejemplo vacas, cerdos, cabras, caballos, etc., y particularmente roedores, por ejemplo ratas, ratones, etc.

Las construcciones de ADN para recombinación homóloga comprenderán al menos una parte del ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga de VASP e incluirán regiones de homología con el locus diana. Convenientemente,  
 10 se incluyen marcadores para selección positiva y negativa. Se conocen en la técnica métodos para generar células que tengan modificaciones génicas diana mediante recombinación homóloga. Para diversas técnicas para transfectar células de mamífero, véase Known *et al.* (1990) *Methods in Enzymology* 185: 527 – 537.

Para células madre embrionarias (ES), puede emplearse una línea celular de ES, o pueden obtenerse células ES de nuevo de un hospedador, por ejemplo ratón, rata, cobaya, etc. Dichas células se cultivan en una capa alimentadora de fibroblastos apropiada o se cultivan en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF). Cuando se han transformado células ES, se pueden usar para producir animales transgénicos. Después de la transformación, las células se siembran en una capa alimentadora en un medio apropiado. Pueden detectarse células que contienen la construcción empleando un medio selectivo. Después de tiempo suficiente para que crezcan las colonias, estas se seleccionan y analizan con respecto a la aparición de recombinación homóloga. Las colonias que muestran recombinación homóloga pueden después usarse para manipulación embrionaria e inyección de blastocistos. Se obtienen blastocistos de hembras superovuladas de 4 a 6 semanas de edad. Las células ES se tripsinizan, y las células modificadas se inyectan en el blastocelo del blastocisto. Después de inyección, los blastocistos se devuelven a cada cuerno uterino de hembras pseudoembarazadas. Después se permite a las hembras llegar a término y se exploran las camadas resultantes con respecto a células mutantes que tengan la construcción. Proporcionando un fenotipo diferente del blastocisto y las células ES, se puede detectar fácilmente la descendencia quimérica. Los animales quiméricos se exploran con respecto a la presencia del ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga de VASP y se aparean machos y hembras que tengan la modificación para producir descendencia homocigótica.  
 15  
 20  
 25  
 30 Los animales transgénicos pueden ser cualquier mamífero no humano, tales como animales de laboratorio, animales domésticos, etc. Los animales transgénicos pueden usarse para determinar el efecto de un fármaco candidato en un ambiente *in vivo*.

La presente memoria descriptiva proporciona un método para preparar una proteína soluble, homo o hetero-trimérica cultivando una célula hospedadora transformada o transfectada con al menos uno o hasta cuatro vectores de expresión diferentes que codifican una proteína de fusión que comprende un dominio VASP y una proteína heteróloga. Para producir una proteína con función biológica, los cuatro dominios VASP forman preferentemente homo- o hetero-tetrameros. El cultivo también puede realizarse en la misma célula hospedadora, si puede mantenerse la producción eficaz, y se aíslan después proteínas homo- o hetero-tetraméricas del medio. Idealmente,  
 35  
 40 las cuatro proteínas heterólogas se marcan diferencialmente con diversas secuencias marcadoras (es decir, marcador de His, marcador de FLAG y marcador de Glu-Glu) para permitir el análisis de la composición o purificación de las moléculas resultantes. Como alternativa, los cuatro componentes pueden producirse por separado y combinarse en relaciones deliberadas para dar como resultado las moléculas hetero-tetraméricas deseadas. Los dominios VASP utilizados en la preparación de estas moléculas hetero-triméricas pueden ser iguales o diferentes y la proteína o las proteínas de fusión pueden comprender además una secuencia enlazadora. En una realización particular, la proteína heteróloga usada para usar la proteína homo-tetramérica es el dominio soluble de zB7R1.  
 45

Un resultado del uso del dominio de tetramerización VASP de la presente divulgación es la capacidad de aumentar la afinidad y avidéz de la proteína heteróloga por su ligando o compañero de unión mediante la formación de la forma tetramérica. Por avidéz se entiende la fuerza de unión de múltiples moléculas con una molécula mayor, una situación ejemplificada pero sin limitación, por la unión de un antígeno complejo con un anticuerpo. Dicha característica se mejoraría o formaría para muchas proteínas heterólogas, por ejemplo, mediante la formación de múltiples sitios de unión para su ligando o sus ligandos mediante la tetramerización del receptor heterólogo usando el dominio VASP. Por afinidad se entiende la fuerza de unión de un sistema de receptor-ligando sencillo. Dicha característica se mejoraría para un subconjunto de proteínas heterólogas usando el dominio de tetramerización de la presente divulgación, por ejemplo, formando un sitio de unión con mejores características de unión para un único ligando mediante la tetramerización del receptor. La avidéz y afinidad puede medirse usando ensayos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, los métodos descritos en los ejemplos posteriores. Se produce una mejora de la afinidad o avidéz cuando el valor de afinidad o avidéz (por ejemplo, constante de afinidad o  $K_a$ ) para la fusión de proteína heteróloga-dominio de tetramerización y su ligando es mayor que para la proteína heteróloga sola y su ligando. Un medio alternativo para medir estas características es la constante de equilibrio ( $K_d$ ) en la que se observaría una reducción con la mejora de afinidad o avidéz usando el dominio de tetramerización VASP de la presente divulgación.  
 50  
 55  
 60  
 65

La actividad biológica de proteínas de fusión heterólogas de VASP recombinantes está mediada por la unión de la

proteína de fusión recombinante con una molécula afín, tal como un receptor o receptor cruzado. Una molécula afín se define como una molécula que se une con la proteína de fusión recombinante en una interacción no covalente basada en la conformación apropiada de la proteína de fusión recombinante y la molécula afín. Por ejemplo, para una proteína de fusión recombinante que comprende una región extracelular de un receptor, la molécula afín comprende un ligando que se une con la región extracelular del receptor. Por el contrario, para una proteína de fusión soluble recombinante que comprende un ligando, la molécula afín comprende un receptor (o proteína de unión) que se une con el ligando.

La unión de una proteína de fusión recombinante con una molécula afín es un marcador para actividad biológica. Dicha actividad de unión puede determinarse, por ejemplo, mediante competición por la unión con el dominio de unión de la molécula afín (es decir ensayos de unión competitiva). Una configuración de un ensayo de unión competitiva para una proteína de fusión recombinante que comprende un ligando usa un receptor radiomarcado, soluble, y células intactas que expresan una forma nativa del ligando. De forma similar, un ensayo de competición para una proteína de fusión recombinante que comprende un receptor usa un ligando radiomarcado, soluble, y células intactas que expresan una forma nativa del receptor. Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 3. En lugar de células intactas que expresan una forma nativa de la molécula afín, se podría sustituir la molécula afín purificada unida a una fase sólida. Pueden realizarse ensayos de unión competitiva usando metodología convencional. Pueden obtenerse resultados cualitativos o semicuantitativos mediante ensayos de unión en placas autorradiográficas competitiva, o separación de células activadas por fluorescencia, o representaciones de Scatchard para generar resultados cuantitativos.

También puede medirse la actividad biológica usando bioensayos que se conocen en la técnica, tales como un ensayo de proliferación celular. Se describe un bioensayo a modo de ejemplo en el Ejemplo 4. El tipo de ensayo de proliferación celular usado dependerá de la proteína de fusión soluble recombinante. Por ejemplo, un bioensayo para una proteína de fusión soluble recombinante que en su forma nativa actúa sobre células T utilizará células T purificadas obtenidas por métodos que se conocen en la técnica. Dichos bioensayos incluyen ensayos de coestimulación en los que las células T purificadas se incuban en presencia de la proteína de fusión soluble recombinante y un nivel subóptimo de un mitógeno tal como Con A o PHA. De forma similar, se usarán células B purificadas para una proteína de fusión soluble recombinante que en su forma nativa actúa sobre células B. Otros tipos de células también pueden seleccionarse basándose en el tipo celular sobre el que actúa la forma nativa de la proteína de fusión soluble recombinante. La proliferación se determina midiendo la incorporación de una sustancia radiomarcada, tal como una timidina  $^3\text{H}$ , de acuerdo con métodos convencionales.

Otro tipo más de ensayo para determinar la actividad biológica es la inducción de secreción de moléculas secundarias. Por ejemplo, ciertas proteínas inducen la secreción de citocinas por células T. Las células T se purifican y estimulan con una proteína de fusión soluble recombinante en las condiciones requeridas para inducir secreción de citocinas (por ejemplo, en presencia de un comitógeno). La inducción de secreción de citocinas se determina por bioensayo, midiendo la proliferación de una línea celular dependiente de citocinas. De forma similar, la inducción de secreción de inmunoglobulina se determina midiendo la cantidad de inmunoglobulina secretada por células B purificadas estimuladas con una proteína de fusión soluble recombinante que actúa sobre células B en su forma nativa, usando un ensayo cuantitativo (o semi-cuantitativo) tal como un inmunoensayo enzimático.

Si el compañero de unión para una proteína heteróloga particular es desconocido, la proteína de fusión de VASP puede usarse en un ensayo de unión para buscar ese compañero de unión. Un método para hacer esto, denominado un ensayo de trampa de secreción, se describe en el Ejemplo 5, aunque un experto en la materia conocerá bien otros métodos para usar una proteína de fusión de VASP para identificar compañeros de unión.

Para ensayar los polipéptidos y anticuerpos agonistas y/o antagonistas de zB7R1 desvelados en el presente documento, las células de mamífero adecuadas para uso en la expresión de receptores que comprenden zB7R1 y transducción de una señal mediada por receptor incluyen células que expresan otras subunidades de receptores que pueden formar un complejo funcional con zB7R1 (o zB7R1RA). Dentro de una realización preferida, la célula depende de un factor de crecimiento hematopoyético proporcionado de forma exógena para su proliferación. Son líneas celulares preferidas de este tipo la línea celular TF-1 humana (número de ATCC RL-2003) y la línea celular AML-193 (número de ATCC CRL-9589), que son líneas celulares leucémicas humanas dependientes de GM-CSF y BaF3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, (1985)) que es una línea de pre-células B murinas dependientes de IL-3. Otras líneas celulares incluyen células BHK, COS-1 y CHO. Las células hospedadoras adecuadas pueden modificarse técnicamente para producir las subunidades de receptor necesarias u otro componente celular necesario para la respuesta celular deseada. Este enfoque es ventajoso porque pueden modificarse técnicamente líneas celulares para expresar subunidades de receptor de cualquier especie, superando de este modo las limitaciones potenciales que surgen de la especificidad de especie. Los ortólogos de especie del ADNc de receptor humano pueden clonarse y usarse dentro de líneas celulares de la misma especie, tales como un ADNc de ratón en la línea celular BaF3.

Se usan células que expresan receptor funcional dentro de ensayos de cribado. Se conocen en la técnica diversos ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en una célula diana. Uno de dichos ensayos es un ensayo de proliferación celular. Se cultivan células en presencia o ausencia de un

compuesto de ensayo, y se detecta proliferación celular, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o mediante ensayo colorímetro basado en la degradación metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, (1983)). Un formato de ensayo alternativo usa células que se modifican técnicamente adicionalmente para expresar un gen indicador. El gen indicador se une a un elemento promotor que es sensible a la ruta ligada a receptor, y el ensayo detecta activación de la transcripción del gen indicador. Un elemento promotor preferido a este respecto es un elemento de respuesta de suero o SRE. Véase, por ejemplo, Shaw *et al.*, Cell 56: 563-572, (1989). Un gen indicador tal preferido es un gen de luciferasa (de Wet *et al.*, Mol. Cell. Biol. 7: 725, (1987)). Se detecta la expresión del gen de luciferasa mediante luminiscencia usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Baumgartner *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 29094-29101, (1994); Schenborn y Goiffin, Promega\_Notes 41: 11, 1993). Los kits de ensayo de actividad luciferasa están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Promega Corp., Madison, WI. Pueden usarse líneas celulares diana de este tipo para cribar bibliotecas de productos químicos, medios de cultivo acondicionados a las células, caldos fúngicos, muestras de suelo, muestras de agua y similares. Por ejemplo, puede ensayarse un banco de muestras de medio acondicionado a células en una célula diana para identificar células que producen contrarreceptor. Después se usan células positivas para producir una biblioteca de ADNc en un vector de expresión de mamífero, que se divide en grupos, se transfecta a células hospedadoras y se expresa. Después se ensayan muestras de medio de las células transfectadas, con división posterior de grupos, re-transfección, subcultivo y re-ensayo de células positivas para aislar un ADNc clonado que codifica el contrarreceptor.

Se conocen en la técnica o pueden construirse varias líneas celulares sensibles a zB7R1, por ejemplo, la línea celular Baf3/DIRS1/cytoR11 (Publicación de WIPO n.º WO 02/072607). Además se conocen varias líneas celulares sensibles a IL-22 (Dumontier *et al.*, J. Immunol. 164: 1814-1819, 2000; Dumoutier, L. *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000; Xie MH *et al.*, J. Biol. Chem. 275: 31335-31339, 2000; Kotenko SV *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 2725-2732, 2001), así como las que expresan la subunidad del receptor de IL-22 zB7R1. Por ejemplo, las siguientes células son sensibles a IL-22: TK-10 (Xie MH *et al.*, mencionado anteriormente) (carcinoma renal humano); SW480 (ATCC n.º CCL-228) (adenocarcinoma de colon humano); HepG2 (ATCC n.º HB-8065) (hepatoma humano); PC12 (ATCC n.º CRL-1721) (modelo de célula neuronal murina; feocromocitoma de rata); y MES13 (ATCC n.º CRL-1927) (línea celular mesangial de riñón murino). Además, algunas líneas celulares que expresan zB7R1 (receptor de IL-22) también son candidatas para líneas celulares sensibles a IL-22: A549 (ATCC n.º CCL-185) (carcinoma de pulmón humano); G-361 (ATCC n.º CRL-1424) (melanoma humano); y Caki-1 (ATCC n.º HTB-46) (carcinoma renal humano). Además, pueden construirse líneas celulares sensibles a IL-22, por ejemplo, la línea celular Baf3/cytoR11/CRF2-4 descrita en el presente documento (Publicación de WIPO n.º WO 02/12345). Estas células pueden usarse en ensayos para evaluar la funcionalidad de zB7R1 como un antagonista de zB7R1 o IL-22 o factor antiinflamatorio.

#### 7. Producción de proteínas de fusión y conjugados de ZB7R1 o CD155

Una clase general de análogos de zB7R1 o CD155 son variantes que tienen una secuencia de aminoácidos que es una mutación de la secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento. Otra clase general de análogos de zB7R1 o CD155 se proporciona por anticuerpos anti-idiotípicos, y fragmentos de los mismos, como se describe posteriormente. Además, pueden usarse anticuerpos recombinantes que comprenden dominios variables anti-idiotípicos como análogos (véase, por ejemplo, Monfardini *et al.*, Proc. Assoc. Am. Physicians 108: 420 (1996)). Ya que los dominios variables de anticuerpos anti-idiotípicos de zB7R1 imitan zB7R1, estos dominios pueden proporcionar la actividad de unión a zB7R1. Los expertos en la materia conocen métodos para producir anticuerpos catalíticos anti-idiotípicos (véase, por ejemplo, Joron *et al.*, Ann. N Y Acad. Sci. 672: 216 (1992), Friboulet *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol. 47: 229 (1994), y Avalle *et al.*, Ann. N Y Acad. Sci. 864: 118 (1998)).

Otro enfoque para identificar análogos de zB7R1 o CD155 se proporciona por el uso de bibliotecas combinatorias. Se proporcionan métodos para construir y cribar bibliotecas de presentación en fagos y otras combinatorias, por ejemplo, en Kay *et al.*, Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press 1996), Verdine, Patente de Estados Unidos n.º 5.783.384, Kay, *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.747.334 y Kauffman *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.723.323.

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

Pueden usarse proteínas de fusión de zB7R1 para expresar zB7R1 en un hospedador recombinante, y para aislar el zB7R1 producido. Como se describe posteriormente, las proteínas de fusión de zB7R1 particulares también tienen usos en el diagnóstico y la terapia. Un tipo de proteína de fusión comprende un péptido que guía un polipéptido de zB7R1 de una célula hospedadora recombinante. Para dirigir un polipéptido de zB7R1 a la ruta secretora de una célula hospedadora eucariota, se proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como un péptido señal, una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión de zB7R1. Aunque la secuencia señal secretora puede derivar de zB7R1, una secuencia señal adecuada también puede derivar de otra proteína secretada o sintetizada *de novo*. La secuencia señal secretora está unida operativamente con una secuencia codificante de zB7R1 de modo que las dos secuencias se unen en la fase de lectura correcta y se sitúan

para dirigir el polipéptido de nueva síntesis a la ruta secretora de la célula hospedadora. Las secuencias señal secretoras se sitúan habitualmente 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal secretoras pueden situarse en otra parte en la secuencia de nucleótidos de interés (véase, por ejemplo, Welch *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.037.743; Holland *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.143.830).

Aunque la secuencia señal secretora de zB7R1 u otra proteína producida por células de mamífero (por ejemplo, secuencia señal activadora de plasminógeno de tipo tisular, como se describe, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos n.º 5.641.655) es útil para expresión de zB7R1 en hospedadores de mamífero recombinantes, se prefiere una secuencia señal de levadura para expresión en células de levadura. Son ejemplos de secuencia señal de levadura adecuadas las derivadas de factor  $\alpha$  de feromona de apareamiento de levadura (codificada por el gen *MF $\alpha$ 1*), invertasa (codificada por el gen *SUC2*) o fosfatasa ácida (codificada por el gen *PHO5*). Véase, por ejemplo, Romanos *et al.*, "Expression of Cloned Genes in Yeast", en *DNA Cloning 2: A Practical Approach*, 2ª Edición, Glover y Hames (eds.), páginas 123-167 (Oxford University Press 1995).

Pueden prepararse polipéptidos de receptor soluble zB7R1 expresando un ADN truncado que codifica el dominio extracelular, por ejemplo, un polipéptido que contiene SEQ ID NO: 2 o 5, o la región correspondiente de un receptor no humano. Se prefiere que los polipéptidos de dominio extracelular se preparen de una forma sustancialmente libre de segmentos polipeptídicos transmembrana e intracelulares. Para dirigir la exportación del dominio receptor de la célula hospedadora, el ADN receptor se liga a un segundo segmento de ADN que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor t-PA. Para facilitar la purificación del dominio del receptor secretado, está disponible una extensión C-terminal, tal como un marcador de polihistidina, sustancia P, péptido Flag™ (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6: 1204-1210, (1988); disponible de Eastman Kodak Co., New Haven, CT) u otro polipéptido o proteína para el que está disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico, puede fusionarse con el polipéptido receptor. Además, también se preparan epítomos antigénicos de zB7R1 de los dominios de unión a citocinas extracelulares como se ha descrito anteriormente.

En un enfoque alternativo, un dominio extracelular del receptor de zB7R1 u otro componente de receptor de B7 puede expresarse como una fusión con regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina, normalmente un fragmento F<sub>c</sub>, que contiene dos dominios de región constante y una región bisagra pero carece de la región variable (Véase, Sledziewski, AZ *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 6.018.026 y 5.750.375). Los polipéptidos de zB7R1 solubles desvelados en el presente documento incluyen dichas fusiones. Dichas fusiones se secretan normalmente como moléculas multiméricas en las que las partes F<sub>c</sub> están unidas por enlace disulfuro entre sí y se disponen dos polipéptidos receptores en proximidad estrecha entre sí. Pueden usarse fusiones de este tipo para purificar por afinidad el contrarreceptor afin de la solución, como una herramienta de ensayo *in vitro*, para bloquear, inhibir o reducir señales *in vitro* valorando específicamente el contrarreceptor, y como antagonistas *in vivo* administrándolos parenteralmente para unirse al contrarreceptor en circulación y eliminarlo de la circulación. Para purificar el contrarreceptor, se añade una quimera de zB7R1-Ig a una muestra que contiene el contrarreceptor (por ejemplo, extractos de medio de cultivo acondicionado a células o tejido) en condiciones que facilitan la unión del receptor-contrarreceptor (normalmente temperatura, pH y fuerza iónica cercanos a los fisiológicos). El complejo de quimera-contrarreceptor se separa después por la mezcla usando proteína A, que se inmoviliza en un soporte sólido (por ejemplo, perlas de resina insolubles). El contrarreceptor se eluye después usando técnicas químicas convencionales, tales como con una sal o gradiente de pH. Como alternativa, la quimera en sí misma puede unirse con un soporte sólido, con unión y elución llevadas a cabo como anteriormente. Las quimeras pueden usarse *in vivo* para regular las respuestas inflamatorias incluyendo respuestas de fase aguda tales como amiloide de suero A (SAA), proteína C reactiva (CRP) y similares. Se administran quimeras con alta afinidad de unión por vía parenteral (por ejemplo, por inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa). Las moléculas en circulación se unen con el contrarreceptor y se eliminan de la circulación por procesos fisiológicos normales. Para su uso en ensayos, las quimeras se unen a un soporte mediante la región F<sub>c</sub> y se usan en un formato de ELISA.

Para ayudar en el aislamiento de anti-zB7R1 y compañeros de unión de la presente divulgación, puede emplearse provechosamente un sistema de ensayo que usa un receptor de unión a contrarreceptor (o un anticuerpo, un miembro de un par de complemento/anti-complemento) o un fragmento de unión del mismo, y un instrumento biosensor disponible en el mercado (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Dicho receptor, anticuerpo, miembro de un par de complemento/anti-complemento o fragmento se inmoviliza en la superficie de una microplaca receptora. Se desvela uso de este instrumento en Karlsson, J. *Immunol. Methods* 145: 229-40, 1991 y Cunningham y Wells, J. *Mol. Biol.* 234: 554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento se une covalentemente, usando química de amina o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que están unidas con película de oro dentro de la celda de flujo. Se pasa muestra de ensayo a través de la celda. Si está presente en la muestra una contrarreceptor, epítomo o miembro opuesto del par de complemento/anti-complemento, este se unirá con el receptor inmovilizado, anticuerpo o miembro, respectivamente, provocando un cambio en el índice refractario del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón superficial en la película de oro. Este sistema permite la determinación de velocidades de asociación y disociación, a partir de las que puede calcular la afinidad de unión, y evaluación de estequiometría de unión. Como alternativa, puede analizarse de unión contrarreceptor/receptor usando tecnología SELDI(TM) (Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA). Además, puede usarse tecnología BIACORE, descrita anteriormente, para usar en experimentos de competición para determinar si diferentes anticuerpos

monoclonales se unen con el mismo o diferentes epítomos en el polipéptido de zB7R1, y como tal, usarse para ayudar al mapeo de epítomos de anticuerpos de la presente invención.

También pueden usarse polipéptidos de unión a contrarreceptor (es decir CD 155) dentro de otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen análisis de Scatchard para determinación de la afinidad de unión (véase Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham *et al.*, Science 253: 545-48, 1991; Cunningham *et al.*, Science 245: 821-25, 1991).

La presente memoria descriptiva proporciona además otras diversas fusiones polipeptídicas adicionales y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, puede prepararse un receptor zB7R1 soluble como una fusión con una proteína dimerizante como se desvela en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas dimerizantes preferidas a este respecto incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG $\gamma$ 1, y la cadena ligera  $\kappa$  humana. Pueden expresarse fusiones de zB7R1 soluble-inmunoglobulina en células modificadas por ingeniería genética para producir diversos análogos de receptor zB7R1 multiméricos. Pueden fusionarse dominios auxiliares con el receptor zB7R1 soluble para dirigirlos a células específicas, tejidos o macromoléculas (por ejemplo, colágeno, o células que expresan los contrarreceptores de zB7R1). Un polipéptido de zB7R1 puede fusionarse con dos o más restos, tales como un marcador de afinidad para purificación y un dominio de dirección. Las fusiones polipeptídicas también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan *et al.*, Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996.

En células bacterianas, es con frecuencia deseable expresar una proteína heteróloga como una proteína de fusión para reducir la toxicidad, aumentar la estabilidad y para potenciar la recuperación de la proteína expresada. Por ejemplo, puede expresarse zB7R1 como una proteína de fusión que comprende un polipéptido de glutatión S-transferasa. Las proteínas de fusión de glutatión S-transferasa son normalmente solubles, y fácilmente purificables de lisados de *E. coli* en columnas de glutatión inmovilizado. En enfoques similares, una proteína de fusión de zB7R1 que comprende un polipéptido de proteína de unión a maltosa puede aislarse con una columna de resina de amilosa, mientras que una proteína de fusión que comprende el extremo C terminal de un gen de Proteína A truncado puede purificarse usando IgG-Sepharose. Se describen técnicas establecidas para expresar un polipéptido heterólogo como una proteína de fusión en una célula bacteriana, por ejemplo, en Williams *et al.*, "Expression of Foreign Proteins in *E. coli* Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies", en DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2ª Edición, Glover y Hames (Eds.), páginas 15-58 (Oxford University Press 1995). Además, están disponibles sistemas de expresión disponibles en el mercado. Por ejemplo, el sistema de purificación de proteínas PINPOINT Xa (Promega Corporation; Madison, WI) proporciona un método para aislar una proteína de fusión que comprende un polipéptido que se biotinila durante la expresión con una resina que comprende avidina.

Los marcadores peptídicos que son útiles para aislar polipéptidos heterólogos expresados por células procariontas o eucariotas incluyen marcadores de poliHistidina (que tienen afinidad por resina quelante de níquel), marcadores *c-myc*, proteína de unión a calmodulina (aislada con cromatografía de afinidad de calmodulina), sustancia P, el marcador RYIRS (que se une con anticuerpos anti-RYIRS), el marcador Glu-Glu y el marcador FLAG (que se une con anticuerpos anti-FLAG). Véase, por ejemplo, Luo *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 329: 215 (1996), Morganti *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem. 23: 67 (1996) y Zheng *et al.*, Gene 186: 55 (1997). Están disponibles moléculas de ácido nucleico que codifican dichos marcadores peptídicos, por ejemplo, de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO).

Otra forma de proteína de fusión comprende un polipéptido de zB7R1 y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, normalmente un fragmento F<sub>c</sub> que contiene dos o tres dominios de región constante y una región bisagra pero carece de la región variable. Como ilustración, Chang *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.723.125, describen una proteína de fusión que comprende un interferón humano y un fragmento F<sub>c</sub> de inmunoglobulina humana. El extremo C terminal del interferón se une al extremo N terminal del fragmento F<sub>c</sub> por un resto de enlazador peptídico. Un ejemplo de un enlazador peptídico es un péptido que comprende principalmente una secuencia inerte de células T que está inmunológicamente inerte. En esta proteína de fusión, un resto F<sub>c</sub> ilustrativo es una cadena  $\gamma$ 4 humana, que es estable en solución y tiene poca o ninguna actividad activadora del complemento. En consecuencia, la presente memoria descriptiva contempla una proteína de fusión de zB7R1 que comprende un resto de zB7R1 y un fragmento F<sub>c</sub> humano, en el que el extremo C terminal del resto de zB7R1 se une al extremo N terminal del fragmento F<sub>c</sub> mediante un enlazador peptídico. El resto de zB7R1 puede ser una molécula de zB7R1 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender el aminoácido de SEQ ID NO: 3 y un fragmento F<sub>c</sub> (por ejemplo, un fragmento F<sub>c</sub> humano).

En otra variación, una proteína de fusión de zB7R1 comprende una secuencia de IgG, un resto de zB7R1 unido covalentemente con el extremo amino terminal de la secuencia de IgG, y un péptido señal que está unido covalentemente con el extremo amino terminal del resto de zB7R1, en el que la secuencia de IgG consiste en los siguientes elementos en el siguiente orden: una región bisagra, un dominio CH<sub>2</sub> y un dominio CH<sub>3</sub>. En consecuencia, la secuencia de IgG carece de un dominio CH<sub>1</sub>. El resto de zB7R1 presenta una actividad de zB7R1, como se describe en el presente documento, tal como la capacidad para unirse con un contrarreceptor de zB7R1. Este enfoque general para producir proteínas de fusión que comprenden partes tanto de anticuerpo como no de anticuerpo se ha descrito en LaRochelle *et al.*, documento EP 742830 (WO 95/21258).

Pueden usarse proteínas de fusión que comprenden un resto de zB7R1 y un resto de Fc, por ejemplo, como una herramienta de ensayo *in vitro*. Por ejemplo, la presencia de un contrarreceptor de zB7R1 en una muestra biológica puede detectarse usando una proteína de fusión de inmunoglobulina de zB7R1, en la que el resto de zB7R1 se usa para unirse con el contrarreceptor y una macromolécula tal como Proteína A o anticuerpo anti Fc, se usa para unir la proteína de fusión con un soporte sólido. Dichos sistemas pueden usarse para identificar agonistas y antagonistas que interfieren con la unión de zB7R1 con su contrarreceptor.

Otros ejemplos de proteínas de fusión de anticuerpos incluyen polipéptidos que comprenden un dominio de unión a antígeno y un fragmento de zB7R1 que contiene un dominio extracelular de zB7R1. Dichas moléculas pueden usarse para dirigirse a tejidos particulares para el beneficio de la actividad de unión de zB7R1.

La presente memoria descriptiva proporciona además otras diversas fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, parte de o todo un dominio o dominios que confieren una función biológica pueden intercambiarse entre zB7R1 de la presente divulgación con el dominio o los dominios funcionalmente equivalentes de otro miembro de la familia del receptor de citocinas. Las fusiones polipeptídicas pueden expresarse en células hospedadoras recombinantes para producir diversos análogos de fusión de zB7R1. Un polipéptido de zB7R1 puede fusionarse con dos o más restos o dominios, tales como un marcador de afinidad para purificación y un dominio de dirección. Las fusiones polipeptídicas también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, por ejemplo, Tuan *et al.*, *Connective Tissue Research* 34: 1 (1996).

Pueden prepararse proteínas de fusión por métodos conocidos por los expertos en la materia preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolos químicamente. Como alternativa, un polinucleótido que codifica ambos componentes de la proteína de fusión en la fase de lectura apropiada puede generarse usando técnicas conocidas y expresarse por los métodos descritos en el presente documento. Se describen métodos generales para escisión enzimática y química de proteínas de fusión, por ejemplo, en Ausubel (1995) en las páginas 16-19 a 16-25.

Los dominios de unión a zB7R1 pueden caracterizarse adicionalmente por análisis físico de estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje de fotoafinidad, junto con mutación de aminoácidos de sitio de contacto potencial de agonistas de contrarreceptor de zB7R1. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255: 306 (1992), Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224: 899 (1992), y Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309: 59 (1992).

La presente memoria descriptiva también contempla composiciones de zB7R1 modificadas químicamente, en las que un polipéptido de zB7R1 está unido con un polímero. Son polipéptidos de zB7R1 ilustrativos polipéptidos solubles que carecen de un dominio transmembrana funcional, tal como un polipéptido que consiste en los restos de aminoácidos SEQ ID NO: 3. normalmente, el polímero es soluble en agua de modo que el conjugado de zB7R1 no precipita en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación, o un aldehído para alquilación. De esta manera, puede controlarse el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es polietilenglicol propionaldehído, o mono (C1-C10) alcoxi, o derivados de ariloxi de los mismos (véase, por ejemplo, Harris, *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.252.714). El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Además, puede usarse una mezcla de polímeros para producir conjugados de zB7R1.

Los conjugados de zB7R1 usados para terapia pueden comprender restos poliméricos solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-(C1-C10)alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinilpirrolidona)PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, *bis*-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. El PEG adecuado puede tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado de zB7R1 también puede comprender una mezcla de dichos polímeros solubles en agua.

Un ejemplo de un conjugado de zB7R1 comprende un resto de zB7R1 y un resto de óxido de polialquilo unido al extremo N terminal del resto de zB7R1. PEG es un óxido de polialquilo adecuado. Como ilustración, zB7R1 puede modificarse con PEG, un proceso conocido como "PEGilación". Puede llevarse a cabo PEGilación de zB7R1 por cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, documento EP 0 154 316, Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249 (1992), Duncan y Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27: 290 (1994), y Francis *et al.*, *Int J Hematol* 68: 1 (1998)). Por ejemplo, puede realizarse PEGilación por una reacción de acilación o por una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En un enfoque alternativo, se forman conjugados de zB7R1 condensando PEG activado, en el que un grupo hidroxilo o amino terminal de PEG se ha reemplazado por un enlazador activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.382.657).

La PEGilación por acilación requiere normalmente hacer reaccionar un derivado éster activo de PEG con un

polipéptido de zB7R1. Un ejemplo de un éster de PEG activado es PEG esterificado a *N*-hidroxisuccinimida. Como se usa en el presente documento, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de enlaces entre zB7R1 y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los métodos para preparar zB7R1 PEGilado por acilación normalmente comprenderán las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido de zB7R1 con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado de aldehído de PEG) en condiciones en las que uno o más grupos de PEG se unen con zB7R1 y (b) obtener el producto o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y resultados deseados. Por ejemplo, cuanto mayor sea la relación de PEG: zB7R1, mayor será el porcentaje de producto de zB7R1 poliPEGilado.

El producto de PEGilación por acilación es normalmente un producto de zB7R1 poliPEGilado, en el que los grupos de  $\epsilon$ -amino de lisina se PEGilan mediante un grupo de enlace de acilo. Un ejemplo de un enlace conector es una amida. normalmente, el zB7R1 resultante será al menos 95 % mono, di o tripegilado, aunque puede formarse algunas especies con mayores grados de PEGilación dependiendo de las condiciones de reacción. Pueden separarse especies PEGiladas de polipéptidos de zB7R1 no conjugados usando métodos de purificación convencionales, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

La PEGilación por alquilación generalmente implica hacer reaccionar un derivado de aldehído terminal de PEG con zB7R1 en presencia de un agente reductor. Pueden unirse grupos de PEG con el polipéptido mediante un grupo -CH<sub>2</sub>-NH.

Además, los anticuerpos anti zB7R1 o fragmentos de anticuerpos de la presente invención pueden PEGilarse usando métodos en la técnica y descritos en el presente documento.

La derivatización mediante alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios disponibles para derivatización. normalmente, la reacción se realiza a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos de  $\epsilon$ -amino de los restos de lisina y el grupo de  $\alpha$ -amino del resto N terminal de la proteína. Por dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído, con una proteína. La conjugación con el polímero sucede predominantemente en el extremo N terminal de la proteína sin modificación significativa de otros grupos reactivos tales como los grupos amino de cadena lateral de lisina. La presente memoria descriptiva proporciona una preparación sustancialmente homogénea de conjugados monopoliméricos de zB7R1.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de molécula de conjugado de zB7R1 monopolimérica puede comprender las etapas de: (a) hacer reaccionar un polipéptido de zB7R1 con un PEG reactivo en condiciones de alquilación reductora a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo  $\alpha$ -amino en el extremo amino terminal del zB7R1, y (b) obtener el producto o los productos de reacción. El agente reductor usado para alquilación reductora debería ser estable en solución acuosa y capaz de reducir solamente la base Schiff formada en el proceso inicial de alquilación reductora. Los agentes reductores ilustrativos incluyen borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, dimetilamino borano, trimetilamino borano y piridina borano.

Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de zB7R1 monopoliméricos, las condiciones de reacción de alquilación reductora son las que permiten la unión selectiva del resto de polímero soluble en agua con el extremo *N* terminal de zB7R1. Dichas condiciones de reacción generalmente posibilitan diferencias de pKa entre los grupos amino de lisina y el grupo  $\alpha$ -amino en el extremo *N* terminal. El pH también afecta a la relación de polímero con respecto a proteína para usar. En general, si el pH es menor, se deseará un exceso mayor de polímero con respecto a proteína porque cuanto menos reactivo sea el grupo  $\alpha$  *N* terminal, más polímero será necesario para conseguir condiciones óptimas. Si el pH es mayor, no es necesario que la relación polímero:zB7R1 sea tan grande debido a que están disponibles más grupos reactivos. normalmente, el pH quedará dentro del intervalo de 3 a 9 o de 3 a 6. Este método puede emplearse para preparar conjugados de receptores solubles homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos que comprenden zB7R1.

Otro factor a considerar es el peso molecular del polímero soluble en agua. En general, cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menor el número de moléculas poliméricas que pueden unirse a la proteína. Para reacciones de PEGilación, el peso molecular típico es de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa o de aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 25 kDa. La relación molar de polímero soluble en agua con respecto a zB7R1 estará en general en el intervalo de 1:1 a 100:1. normalmente, la relación molar de polímero soluble en agua con respecto a zB7R1 será de 1:1 a 20:1 para poliPEGilación, y de 1:1 a 5:1 para monoPEGilación.

Se conocen en la técnica métodos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y restos poliméricos solubles en agua. Véase, por ejemplo, Karasiewicz *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.382.657, Greenwald *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.738.846, Nieforth *et al.*, Clin. Pharmacol. Ther. 59: 636 (1996), Monkarsh *et al.*, Anal. Biochem. 247: 434 (1997)). Este método puede emplearse para preparar conjugados de receptores solubles homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos que comprenden zB7R1.

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

#### 8. Aislamiento de polipéptidos de zB7R1 o CD155

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden purificarse hasta al menos aproximadamente 80 % de pureza, hasta al menos aproximadamente 90 % de pureza, hasta al menos aproximadamente 95 % de pureza, o más de 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 % o más de 99 % de pureza con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libres de agentes infecciosos y pirógenos. Los polipéptidos de la presente divulgación también pueden purificarse hasta un estado farmacéuticamente puro, que es más de 99,9 % puro. En ciertas preparaciones, el polipéptido purificado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Pueden usarse métodos de fraccionamiento y/o purificación convencionales para obtener preparaciones de zB7R1 (o CD155) purificado de fuentes naturales (por ejemplo, fuentes tisulares humanas), polipéptidos de zB7R1 sintéticos y polipéptidos de zB7R1 recombinantes y polipéptidos de zB7R1 de fusión purificados a partir de células hospedadoras recombinantes. En general, puede usarse precipitación con sulfato de amonio y extracción de ácidos o caótopos para fraccionamiento de muestras. Las etapas de purificación a modo de ejemplo pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poli(acrilamida), sílices especiales y similares. Son adecuados derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los medios cromatográficos a modo de ejemplo incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Fenil-Sepharose FF (Pharmacia), butilo Toyopearl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octil-Sepharose (Pharmacia) y similares; o resinas poli(acrilicas), tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticuladas, perlas de poliestireno, resinas de poli(acrilamida) reticuladas y similares que son insolubles en las condiciones en las que se van a usar. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas con grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de carbohidrato.

Los ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación de bromuro de cianógeno, activación de N-hidroxisuccinimida, activación de epóxido, activación de sulfhidrilo, activación de hidrazida y derivados de carboxilo y amino para químicas de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos se conocen bien y se usan ampliamente en la técnica, y están disponibles de proveedores comerciales. La selección de un método particular para aislamiento y purificación de polipéptidos es un asunto de diseño rutinario y se determina en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Pharmacia LKB Biotechnology 1988), y Doonan, *Protein Purification Protocols* (The Humana Press 1996).

Pueden idearse variaciones adicionales en el aislamiento y la purificación de zB7R1 (o CD155) por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti zB7R1, obtenidos como se describe posteriormente, para aislar grandes cantidades de proteína mediante purificación de inmunoadinidad.

Los polipéptidos de la presente divulgación también pueden aislarse mediante aprovechamiento de propiedades particulares. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina, incluyendo las que comprenden marcadores de polihistidina. Brevemente, se carga en primer lugar un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelado (Sulkowski, *Trends in Biochem.*, 3: 1 (1985)). Se adsorberán proteínas ricas en histidina en esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ion metálico usado, y se eluirán mediante elución competitiva, reduciendo el pH o uso de agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen purificación de proteínas glucosiladas mediante cromatografía de afinidad por lectina y cromatografía de intercambio iónico (M. Deutscher, (ed.), *Meth. Enzymol.*, 182: 529 (1990)). Dentro de realizaciones adicionales de la divulgación, puede construirse una fusión del polipéptido de interés y un marcador de afinidad (por ejemplo, proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación. Además, las propiedades de unión a contrarreceptor de dominio extracelular de zB7R1 pueden aprovecharse para purificación, por ejemplo, de receptores solubles que comprenden zB7R1; por ejemplo, usando cromatografía de afinidad en la que el contrarreceptor apropiado está unido a una columna y el receptor que comprende zB7R1 está unido y posteriormente se eluye usando métodos de cromatografía convencionales.

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

#### 9. Producción de anticuerpos para proteínas de zB7R1

Pueden obtenerse anticuerpos para zB7R1, por ejemplo, usando el producto de un vector de expresión de zB7R1 o zB7R1 aislado de una fuente natural como un antígeno. Anticuerpos anti zB7R1 particularmente útiles “se unen específicamente” con zB7R1. Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si los anticuerpos muestran al menos una de las siguientes dos propiedades: (1) los anticuerpos se unen con zB7R1 con un nivel umbral de actividad de unión, y (2) los anticuerpos no reaccionan de forma cruzada significativa con polipéptidos relacionados con zB7R1.

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

Pueden producirse anticuerpos anti zB7R1 usando péptidos y polipéptidos portadores de epítopos de zB7R1 antigénicos. Los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos antigénicos de la presente divulgación contienen una secuencia de al menos nueve, o entre 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contenidos dentro de SEQ ID NO: 2 u otra secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una parte mayor de una secuencia de aminoácidos de la invención, que contienen de 30 a 50 aminoácidos, o cualquier longitud hasta e incluyendo la secuencia de aminoácidos completa de un polipéptido desvelado en el presente documento, también son útiles para inducir anticuerpos que se unen con zB7R1. Es deseable que la secuencia de aminoácidos del péptido portador de epítopos se seleccione para proporcionar solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye restos relativamente hidrófilos, mientras que se evitan normalmente restos hidrófobos). Además, las secuencias de aminoácidos que contienen restos de prolina también pueden ser deseables para la producción de anticuerpos.

Como ilustración, se identificaron sitios antigénicos potenciales en zB7R1 usando el método de Jameson-Wolf, Jameson y Wolf, CABIOS 4: 181, (1988), como se implementa por el programa PROTEAN (versión 3.14) de LASERGENE (DNASTAR, Madison, WI). Se usaron parámetros por defecto en este análisis.

El método de Jameson-Wolf predice determinantes antigénicos potenciales combinando seis subrutinas principales para predicción estructural de proteínas. Brevemente, el método de Hopp-Woods, Hopp *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78: 3824 (1981), se usó en primer lugar para identificar secuencias de aminoácidos que representan áreas de mayor hidrofilia local (parámetro: un promedio de siete restos). En la segunda etapa, el método de Emini, Emini *et al.*, J. Virology 55: 836 (1985), se usó para calcular probabilidades de superficie (parámetro: umbral de decisión de superficie (0,6) = 1). En tercer lugar, el método de Karplus-Schultz, Karplus y Schultz, Naturwissenschaften 72: 212 (1985), se usó para predecir flexibilidad de cadena principal (parámetro: umbral de flexibilidad (0,2) = 1). En las cuarta y quinta etapas del análisis, se aplicaron predicciones de estructura secundaria a los datos usando los métodos de Chou-Fasman, Chou, “Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition,” en Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Fasman (ed.), páginas 549-586 (Plenum Press 1990), y Garnier-Robson, Garnier *et al.*, J. Mol. Biol. 120: 97 (1978) (parámetros de Chou-Fasman: tabla de conformación = 64 proteínas, umbral de región  $\alpha$  = 103; umbral de región  $\beta$  = 105; parámetros de Garnier-Robson: constantes de decisión  $\alpha$  y  $\beta$  = 0). En la sexta subrutina, se combinaron parámetros de flexibilidad y factores de accesibilidad a disolvente/hidropatía para determinar un valor del contorno de superficie, designado como el “índice antigénico”. Finalmente, se aplicó una función de ampliación de pico al índice antigénico, que amplía los picos de superficie principales añadiendo 20, 40, 60 u 80 % del valor de pico respectivo para abarcar energía libre adicional derivada de la movilidad de regiones de superficie relativas a regiones interiores. Este cálculo no se aplicó, sin embargo, a ningún pico principal que resida en una región helicoidal, ya que las regiones helicoidales tienden a ser menos flexibles.

Los resultados de este análisis indicaron que las siguientes secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 proporcionarían péptidos antigénicos adecuados: pueden usarse perfiles de hidrofilia de Hopp/Woods para determinar regiones que tienen el máximo potencial antigénico dentro de SEQ ID NO: 3 (Hopp *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 78: 3824-3828, 1981, Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986 y Triquier *et al.*, Protein Engineering 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis restos deslizante. Se ignoraron los restos G, S y T internados y los restos H, Y y W expuestos. Además, los epítopos antigénicos de zB7R1 dentro de SEQ ID NO: 2 como se predice por una representación de Jameson-Wolf, por ejemplo, usando el programa Protean de DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI) actúan como epítopos antigénicos preferidos, y pueden determinarse por un experto en la materia. Dichos epítopos antigénicos incluyen (1) (1) restos de aminoácidos 80 a 86 de SEQ ID NO: 2; (2) restos de aminoácidos 163 a 170 de SEQ ID NO: 2; (3) restos de aminoácidos 163 a 190 de SEQ ID NO: 2; (4) restos de aminoácidos 175 a 190 de SEQ ID NO: 2; y (5) restos de aminoácidos 211 a 221 de SEQ ID NO: 2. La presente memoria descriptiva contempla el uso de uno cualquiera de los péptidos antigénicos 1 a 5 para generar anticuerpos para zB7R1 o como una herramienta para cribar o identificar anticuerpos monoclonales neutralizantes

desvelados en el presente documento. La presente memoria descriptiva contempla el uso de cualquier péptido o epítipo antigénico descrito en el presente documento para generar anticuerpos para zB7R1, así como para identificar y cribar anticuerpos monoclonales anti zB7R1 que pueden unirse, actuar como agonistas de, bloquear, inhibir, reducir, aumentar, antagonizar o neutralizar la actividad de un contrarreceptor de zB7R1.

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

20 Aunque se inducen normalmente anticuerpos policlonales en animales tales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayas, cabras u ovejas, un anticuerpo anti zB7R1 de la presente invención también puede derivar de un anticuerpo de primate subhumano. Pueden encontrarse técnicas generales para inducir anticuerpos diagnóstica y terapéuticamente útiles en babuinos, por ejemplo, en Goldenberg *et al.*, publicación de patente internacional n.º WO 91/11465 y en Losman *et al.*, *Int. J. Cancer* 46: 310 (1990).

25 Como alternativa, pueden generarse anticuerpos monoclonales anti zB7R1. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de roedores para antígenos específicos mediante métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975), Coligan *et al.* (Eds.) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley y Sons 1991) ["Coligan"], Picksley *et al.*, "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*," en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª Edición, Glover *et al.* (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)).

30 Brevemente, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales inyectando a ratones una composición que comprende un producto génico de zB7R1, verificando la presencia de producción de anticuerpos retirando una muestra de suero, retirando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen anticuerpos para el antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos para el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

40 Además, un anticuerpo anti zB7R1 de la presente invención puede derivar de un anticuerpo monoclonal humano. Se obtienen anticuerpos monoclonales humanos de ratones transgénicos que se han modificado técnicamente para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a exposición antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de cadena ligera y pesada humana en cepas de ratones derivados de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los loci de cadena pesada y cadena ligera endógena. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Se describen métodos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos, por ejemplo, en Green *et al.*, *Nature Genet.* 7: 13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856 (1994), y Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6: 579 (1994).

50 Pueden aislarse y purificarse anticuerpos monoclonales de cultivos de hibridoma por diversas técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3; Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

55 Para usos particulares, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti zB7R1. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Como ilustración, pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, patente de Estados Unidos n.º 4.331.647, Nisonoff *et al.*, *Arch Biochem. Biophys.* 89: 230 (1960), Porter, *Biochem. J.* 73: 119 (1959), Edelman *et al.*, en *Methods in Enzymology* Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967), y en Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena pesada-ligera monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan con el antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto.

Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 2659 (1972). Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse por un enlace disulfuro intermolecular o reticularse mediante productos químicos tales como glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, Crit. Rev. Biotech., 12: 437 (1992)).

Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que se conectan por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno monocatenarias (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula hospedadora, tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Se describen métodos para producir scFv, por ejemplo, en Whitlow *et al.*, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97 (1991) (véase también, Bird *et al.*, Science 242: 423 (1988), Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.946.778, Pack *et al.*, Bio/Technology 11: 1271 (1993), y Sandhu, mencionado anteriormente).

Como ilustración, puede obtenerse un scFV exponiendo linfocitos a polipéptido de zB7R1 *in vitro*, y seleccionando bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteína o péptido de zB7R1 inmovilizado o marcado). Pueden obtenerse genes que codifican polipéptidos que tienen dominios de unión a polipéptido de zB7R1 potenciales explorando bibliotecas peptídicas aleatorias presentadas en fagos (presentación en fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Pueden obtenerse secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de varias maneras, tal como mediante mutagénesis aleatoria y síntesis de polinucleótidos aleatoria. Estas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias pueden usarse para cribar con respecto a péptidos que interaccionan con un diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un contrarreceptor o receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. Se conocen en este campo técnicas para crear y cribar dichas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias (Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409, Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.946.778, Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.403.484, Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.571.698 y Kay *et al.*, Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)) y bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios y kits para cribar dichas bibliotecas están disponibles en el mercado, por ejemplo de CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Pueden cribarse bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias usando las secuencias de zB7R1 desveladas en el presente documento para identificar proteínas que se unen con zB7R1.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR). Pueden obtenerse péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable de ARN de células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick *et al.*, Method: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106, (1991), Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter *et al.* (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995), y Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch *et al.*, (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

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

Además, los anticuerpos anti zB7R1 o fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden PEGilarse usando métodos en la técnica y descritos en el presente documento.

Pueden prepararse anticuerpos anti idiotípicos policlonales inmunizando animales con anticuerpos anti zB7R1 o fragmentos de anticuerpo, usando técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Green *et al.*, "Production of Polyclonal Antisera", en *Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols*, Manson (ed.), páginas 1-12 (Humana Press 1992). Además, véase Coligan en las páginas 2.4.1-2.4.7. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti idiotípicos monoclonales usando anticuerpos anti zB7R1 o fragmentos de anticuerpo como inmunógenos con las técnicas, descritas anteriormente. Como otra alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti idiotípicos humanizados o anticuerpos anti idiotípicos de primates subhumanos usando las técnicas anteriormente descritas. Se describen métodos para producir anticuerpos anti idiotípicos, por ejemplo, en Irie, Patente de Estados Unidos n.º 5.208.146, Greene *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.637.677, y Varthakavi y Minocha, J. Gen. Virol. 77: 1875 (1996).

Un anticuerpo anti zB7R1 puede conjugarse con un marcador detectable para formar un inmunoconjugado anti zB7R1. Los marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente u oro coloidal. Los expertos en la materia conocen bien métodos para preparar y detectar dichos inmunoconjugados marcados de forma detectable, y se describen en más detalle posteriormente.

El marcador detectable puede ser un radioisótopo que se detecta por autorradiografía. Son isótopos que son particularmente útiles para el fin de la presente invención  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{14}\text{C}$ .

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

Como alternativa, pueden marcarse de forma detectable inmunoconjugados anti zB7R1 acoplado un componente de anticuerpo con un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunoconjugado marcado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscentes incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

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

Como alternativa, los inmunoconjugados anti zB7R1 pueden marcarse de forma detectable uniendo un componente de anticuerpo anti zB7R1 con una enzima. Cuando el conjugado anti zB7R1-enzima se incuba en presencia del sustrato apropiado, el resto enzimático reacciona con el sustrato para producir un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, mediante medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Los ejemplos de enzimas que pueden usarse para marcar de forma detectable inmunoconjugados poliespecíficos incluyen  $\beta$ -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. La unión de restos marcadores con anticuerpos anti zB7R1 puede conseguirse usando técnicas convencionales conocidas en este campo. Se describe metodología típica a este respecto en Kennedy *et al.*, Clin. Reclamación. Acta 70: 1 (1976), Schurs *et al.*, Clin. Chim. Acta 81: 1 (1977), Shih *et al.*, Int'l J. Cancer 46: 1101 (1990), Stein *et al.*, CancerRes. 50: 1330 (1990), *et aligan*, mencionado anteriormente.

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

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

La presente memoria descriptiva también contempla kits para realizar un ensayo de diagnóstico inmunológico para expresión génica de zB7R1. Dichos kits comprenden al menos un recipiente que comprende un anticuerpo anti

zB7R1, o fragmento de anticuerpo. Un kit también puede comprender un segundo recipiente que comprende uno o más reactivos capaces de indicar la presencia de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de zB7R1. Los ejemplos de dichos reactivos indicadores incluyen marcadores detectables tales como marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente, oro coloidal y similares. Un kit también puede comprender un medio para transmitir al usuario que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de zB7R1 se usan para detectar proteína de zB7R1. Por ejemplo, instrucciones escritas pueden indicar que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo incluido puede usarse para detectar zB7R1. El material escrito puede aplicarse directamente a un recipiente, o el material escrito puede proporcionarse en forma de un prospecto.

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

Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos útiles en el presente documento incluyen exposición *in vitro* de linfocitos a polipéptidos de receptor zB7R1 solubles o fragmentos de los mismos, tales como epítomos antigénicos, y selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en vectores de fagos o similares (por ejemplo, mediante el uso de polipéptidos de receptor de zB7R1 solubles marcados o inmovilizados o fragmentos de los mismos, tales como epítomos antigénicos). Pueden obtenerse genes que codifican polipéptidos que tienen dominios de unión potenciales tales como polipéptidos de receptor zB7R1 solubles o fragmentos de los mismos, tales como epítomos antigénicos, explorando bibliotecas de péptidos aleatorias presentadas en fagos (presentación en fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Pueden obtenerse secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de varias maneras, tal como mediante mutagénesis aleatoria y síntesis de polinucleótidos aleatoria. Estas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias pueden usarse para cribar con respecto a péptidos que interactúan con una diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un contrarreceptor (es decir CD155) o receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. Se conocen en este campo técnicas para crear y cribar dichas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias (Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.223.409, Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.946.778, Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.403.484 y Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 5.571.698) y bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias y kits para cribar dichas bibliotecas están disponibles en el mercado, por ejemplo de Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Pueden cribarse bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias usando los polipéptidos del receptor zB7R1 solubles o fragmentos de los mismos, tales como secuencias polipeptídicas epitópicas antigénicas desveladas en el presente documento para identificar proteínas que se unen con polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1. Estos "polipéptidos de unión", que interactúan con polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1, pueden usarse para marcar células; para aislar polipéptidos homólogos mediante purificación de afinidad; pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares. Estos polipéptidos de unión pueden usarse también en métodos analíticos tales como para cribar bibliotecas de expresión y para actuar como agonistas y/o neutralizar la actividad, por ejemplo, para unirse, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la interacción entre zB7R1 y su contrarreceptor. Los polipéptidos de unión también pueden usarse para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en circulación de polipéptidos de receptores que comprenden zB7R1 solubles; para detectar o cuantificar receptores que comprenden zB7R1 solubles o no solubles como marcador de patología o enfermedad subyacente. Estos polipéptidos de unión también pueden actuar como "antagonistas" para bloquear o inhibir la unión del receptor monomérico zB7R1 unido a membrana o soluble o polipéptido homodimérico, heterodimérico o multimérico de zB7R1 (por ejemplo con el contrarreceptor) y transducción de señal *in vitro* e *in vivo*. De nuevo, estos polipéptidos de unión actúan como receptor monomérico anti zB7R1 o polipéptidos homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos anti zB7R1 y son útiles para inhibir la actividad de zB7R1, así como actividad de contrarreceptor de zB7R1 o unión a proteínas. Los anticuerpos inducidos para los complejos de receptores naturales de la presente divulgación, y anticuerpos de unión a epítomo de zB7R1, y anticuerpos monoclonales neutralizantes anti zB7R1 pueden ser realizaciones preferidas, ya que pueden actuar más específicamente contra el zB7R1 y pueden inhibir su unión con su contrarreceptor. Además, la actividad agonista, antagonista y de unión de los anticuerpos desvelados en el presente documento puede ensayarse en un ensayo de proliferación de zB7R1, trampa de señal, luciferasa o unión en presencia de su contrarreceptor o cualquier otro receptor de la familia B7, y receptores solubles que comprenden zB7R1, y otros ensayos biológicos o bioquímicos descritos en el presente documento.

Pueden usarse anticuerpos para polipéptidos del receptor zB7R1 (por ejemplo, anticuerpos para SEQ ID NO: 2 o 5) o fragmentos de los mismos, tales como epítomos antigénicos para inhibir los efectos inflamatorios de zB7R1 *in vivo*, para uso terapéutico contra artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, endotoxemia, artritis, asma, EII, colitis, artritis psoriásica u otras afecciones inflamatorias inducidas por B7; marcar células que expresan receptores zB7R1; para aislar polipéptidos de receptores que comprenden zB7R1 solubles mediante purificación de afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en circulación de polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1 solubles; para detectar o cuantificar receptores que comprenden zB7R1 solubles como marcador de patología o enfermedad subyacente; en métodos analíticos que emplean FACS; para cribar bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos anti idiotípicos que pueden actuar como agonistas de zB7R1; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para unirse con, bloquear, inhibir, reducir o antagonizar la función del receptor zB7R1, o para unirse, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1 *in vitro* e *in vivo*. Los marcadores o las etiquetas directos adecuados incluyen radionúclidos,

enzimas, sustratos, cofactores, biotina, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; los marcadores o etiquetas indirectos pueden presentar el uso de biotina-avidina u otros pares de complemento/anticomplemento como intermedios. Los anticuerpos del presente documento también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados  
 5 usarse para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*. Además, pueden usarse anticuerpos para polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1 solubles, o fragmentos de los mismos, *in vitro* para detectar polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1 no desnaturalizados o desnaturalizados o fragmentos de los mismos en ensayos, por ejemplo, Transferencias de Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

10 Los anticuerpos para receptor zB7R1 soluble o polipéptidos de receptor homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos de zB7R1 solubles son útiles para marcar células que expresan los receptores correspondientes y ensayar sus niveles de expresión, para purificación de afinidad, dentro de ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en circulación de polipéptidos de receptores, métodos analíticos que emplean separación de células activadas por fluorescencia. Además, pueden usarse anticuerpos divalentes, y anticuerpos anti idiotípicos, como  
 15 agonistas para imitar el efecto de zB7R1.

Pueden conjugarse directa o indirectamente anticuerpos en el presente documento con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados usarse para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos o polipéptidos de unión que reconocen receptor zB7R1 soluble o polipéptidos  
 20 de receptor homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos de zB7R1 solubles para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una molécula anti complementaria correspondiente (es decir, un receptor soluble o unido a membrana que comprende zB7R1). Más específicamente, pueden acoplarse anticuerpos con polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1 solubles o fragmentos bioactivos o partes de los mismos, con moléculas detectables o citotóxicas y suministrarse a un mamífero que tenga células, tejidos u órganos que expresan el receptor que comprende zB7R1 tal como cánceres que expresan zB7R1.  
 25

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

En otra realización de la divulgación, pueden usarse proteínas de fusión de toxina-polipéptido de unión o proteínas de fusión de toxina-anticuerpo para inhibición o ablación celular o tisular dirigida (por ejemplo, para tratar células o tejidos cancerosos). Como alternativa, si el polipéptido de unión tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un  
 45 dominio de activación o un dominio de unión a contrarreceptor, más un dominio de dirección), una proteína de fusión que incluye solamente el dominio de dirección puede ser adecuada para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a un tipo celular o tisular de interés. En casos en los que la proteína de fusión que incluye solamente un único dominio incluye una molécula complementaria, la molécula anticomplementaria puede conjugarse con una molécula detectable o citotóxica. Dichas proteínas de fusión de  
 50 moléculas complementarias-dominio representan por lo tanto un vehículo de dirección genérico para suministro específico de célula/tejido de conjugados de moléculas citotóxicas/detectables anticomplementarias genéricas.

Como alternativa, pueden usarse polipéptidos de unión de receptor de zB7R1 o proteínas de fusión de anticuerpo descritas en el presente documento para potenciar la destrucción *in vivo* de tejidos diana estimulando directamente  
 55 una ruta apoptótica modulada por receptor zB7R1, que da como resultado la muerte celular de células hiperproliferativas que expresan receptores que comprenden zB7R1.

#### 11. Usos terapéuticos de polipéptidos que tienen actividad de zB7R1 o anticuerpos para zB7R1

60 Pueden usarse secuencias de aminoácidos que tienen actividad de zB7R1 soluble para modular el sistema inmunitario uniendo contrarreceptores de zB7R1 tales como CD155, y por lo tanto, prevenir la unión de contrarreceptor de zB7R1 con receptor zB7R1 endógeno. También pueden usarse antagonistas de zB7R1, tales como anticuerpos anti zB7R1, para modular el sistema inmunitario inhibiendo la unión del contrarreceptor de zB7R1 con el receptor zB7R1 endógeno. En consecuencia, la presente memoria desvela el uso de proteínas,  
 65 polipéptidos y péptidos que tienen actividad zB7R1 (tales como polipéptidos de zB7R1 solubles, fragmentos de polipéptidos de zB7R1, análogos de zB7R1 (por ejemplo, anticuerpos anti idiotípicos anti zB7R1) y proteínas de

fusión de zB7R1) a un sujeto que carece de una cantidad adecuada de este polipéptido, o que produce un exceso de contrarreceptor de zB7R1. Los antagonistas de zB7R1 (por ejemplo, anticuerpos anti-zB7R1) también pueden usarse para tratar un sujeto que produce un exceso de contrarreceptor de zB7R1 o zB7R1. Los sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos. Por ejemplo, dichos polipéptidos de zB7R1 y anticuerpos anti zB7R1 son útiles en la unión, el bloqueo, la inhibición, la reducción, el antagonismo o la neutralización de zB7R1 y CD 155 (bien individualmente o juntos), en el tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, artritis psoriásica, artritis, endotoxemia, asma, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis y otras afecciones inflamatorias desveladas en el presente documento.

zB7R1 puede estar implicado en la patología de psoriasis. La presente memoria descriptiva desvela en particular un método para tratar psoriasis administrando agentes que se unen con, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan o neutralizan zB7R1. Los agonistas para zB7R1 pueden ser un receptor soluble que se une con zB7R1, o anticuerpos, anticuerpos monocatenarios o fragmentos de anticuerpos que se unen con zB7R1 o al contrarreceptor de zB7R1, por ejemplo, anticuerpos anti-zB7R1. Los antagonistas prevendrán por lo tanto la activación del receptor zB7R1.

La psoriasis es una de las enfermedades dermatológicas más habituales, que afecta hasta el 1 al 2 por ciento de la población mundial. Es un trastorno cutáneo inflamatorio crónico caracterizado por pápulas eritematosas, nítidamente delimitadas y placas redondeadas, cubiertas por escamas micáceas plateadas. Las lesiones cutáneas de la psoriasis son variablemente pruríticas. Las áreas con traumatismo desarrollan con frecuencia lesiones de psoriasis. Adicionalmente, otros factores externos pueden agravar la psoriasis incluyendo infecciones, tensión y medicamentos, por ejemplo litio, betabloqueadores y medicamentos anti malaria.

La variedad más común de psoriasis se denomina tipo placa. Los pacientes con psoriasis de tipo placa tendrán placas estables, de crecimiento lento, que permanecen básicamente sin cambios durante largos periodos de tiempo. Las áreas más comunes para que aparezca la psoriasis de placas son los codos, las rodillas, la hendidura anal y el cuero cabelludo. La implicación tiende a ser simétrica. La psoriasis inversa afecta a las regiones intertriginosas incluyendo la axila, la ingle, la región submamaria y el ombligo, y también tiende a afectar al cuero cabelludo, las palmas y las plantas de los pies. Las lesiones individuales son placas nítidamente delimitadas pero pueden estar húmedas debido a su localización. La psoriasis de tipo placa generalmente se desarrolla lentamente y sigue un ciclo indolente. Pocas veces remite de forma espontánea.

La psoriasis eruptiva (psoriasis gutata) es más habitual en niños y adultos jóvenes. Se desarrolla de forma aguda en individuos sin psoriasis o en los que tienen psoriasis de placas crónica. Los pacientes presentan muchas pápulas eritematosas, escamosas, frecuentemente después de la infección del tracto respiratorio superior con estreptococos beta hemolíticos. Los pacientes con psoriasis también pueden desarrollar lesiones postulares. Estas pueden estar localizadas en las palmas y las plantas de los pies o pueden generalizarse y asociarse con fiebre, malestar, diarrea y artralgias.

Aproximadamente la mitad de los pacientes con psoriasis tienen implicación de las uñas de los dedos de las manos, que aparece como picaduras punteadas, engrosamiento de la uña o hiperqueratosis subungular. Aproximadamente del 5 al 10 por ciento de los pacientes con psoriasis tienen quejas con respecto a las articulaciones asociadas, y estas se encuentran más frecuentemente en pacientes con implicación de las uñas de los dedos de las manos. Aunque algunos tienen la aparición simultánea de artritis reumatoide clásica, muchos tienen enfermedad de las articulaciones que queda en uno de cinco tipos asociados con psoriasis: (1) enfermedad limitada a una única o algunas articulaciones pequeñas (70 por ciento de los casos); (2) una enfermedad de tipo artritis reumatoide seronegativa; (3) implicación de las articulaciones interfalángias distales; (4) artritis destructiva grave con desarrollo de "artritis mutilante"; y (5) enfermedad limitada a la columna vertebral.

La psoriasis puede tratarse administrando agentes que actúan como agonistas de zB7R1. Los antagonistas preferidos son un receptor soluble de zB7R1 tal como zB7R1 (SEQ ID NO: 3) o anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o anticuerpos monocatenarios que se unen con el zB7R1 o su contrarreceptor. Dichos antagonistas pueden administrarse solos o en combinación con otras terapias establecidas tales como lubricantes, queratolíticos, corticosteroides tópicos, derivados de vitamina D tópicos, antralina, antimetabolitos sistémicos tales como metotrexato, terapia con luz ultravioleta-psoraleno (PUVA), etretinato, isotretinoína, ciclosporina y el derivado de vitamina D3 tópico calcipotriol. Además, dichos antagonistas pueden administrarse a individuos por vía subcutánea, por vía intravenosa o por vía transdérmica usando una crema o un parche transdérmico que contiene el antagonista. Si se administra por vía subcutánea, el antagonista puede inyectarse en una o más placas psoriásicas. Si se administran por vía transdérmica, los antagonistas pueden administrarse directamente a las placas usando una crema, ungüento, pomada o solución que contiene el antagonista.

Pueden administrarse agonistas para zB7R1 a una persona que tiene asma, bronquitis o fibrosis quística u otra enfermedad pulmonar inflamatoria para tratar la enfermedad. Los antagonistas pueden administrarse por cualquier método adecuado incluyendo intravenoso, subcutáneo, lavado bronquial y el uso de inhalante que contiene el antagonista.

Por lo tanto, la presente memoria descriptiva desvela el uso de zB7R1 y anticuerpos anti zB7R1 como agonistas en

enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias tales como psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, diverticulosis, asma, pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, cáncer de colon e intestinal, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órgano o médula ósea; inflamación debida a endotoxemia, traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto contra hospedador; y cuando haya inhibición de inflamación, inmunosupresión, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, células T (incluyendo células Th1 y Th2), supresión de la respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno, u otros casos en los que se desea inhibición de zB7R1. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se define en las reivindicaciones, para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias tales como artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, endotoxemia, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis, enfermedad de Crohn, diverticulosis, asma, pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órganos o médula ósea, traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis, esplenomegalia, enfermedad de injerto contra hospedador, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES) y miastenia grave.

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

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

Bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la señalización mediante zB7R1 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, esclerosis múltiple (EM), Lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia grave, artritis reumatoide y EII para evitar o inhibir la señalización en células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos, monocitos, leucocitos) mediante zB7R1 (Hughes C *et al.*, J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). También pueden usarse anticuerpos alternativos, tales como anticuerpos monoclonales (MAb) para zB7R1, como un antagonista para agotar células inmunitarias no deseadas para tratar enfermedad autoinmunitaria. Pueden tratarse asma, alergia y otra enfermedad atópica con un MAb contra, por ejemplo, receptores solubles de zB7R1 soluble para inhibir la respuesta inmunitaria o para agotar células perjudiciales. Bloquear, inhibir, reducir o antagonizar la señalización mediante zB7R1, usando los polipéptidos y anticuerpos desvelados en el presente documento, también puede ser beneficioso para enfermedades del páncreas, riñón, hipófisis y células neuronales. También puede ser beneficioso para IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático. zB7R1 puede actuar como una diana para terapia de MAb de cáncer en la que un MAb antagonista inhibe el crecimiento de cáncer y dirige destrucción mediada por inmunidad. (Holliger P, y Hoogenboom, H: Nature Biotech, 16: 1015-1016, 1998). También pueden ser útiles MAb para zB7R1 soluble para tratar nefropatías tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón entre otros tejidos), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con LES, IDDM, diabetes de tipo II (NIDDM), tumores renales y otras enfermedades.

45 Actuar como agonista de, potenciar, aumentar o iniciar la señalización mediante zB7R1 en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como IDDM, EM, LES, miastenia grave, artritis reumatoide y EII. Los anticuerpos monoclonales y neutralizantes anti zB7R1 pueden señalar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación o cambiar la producción de citocinas o proteínas de superficie celular que alivian la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de una respuesta de células T puede desviar una respuesta autoinmunitaria para aliviar la enfermedad (Smith JA *et al.*, J. Immunol., 160: 4841-4849, 1998). De forma similar, pueden usarse anticuerpos monoclonales anti zB7R1 agonistas para señalar, agotar y desviar células inmunitarias implicadas en la artritis reumatoide, asma, alergia y enfermedad atópica. La señalización mediante zB7R1 también puede ser beneficiosa para enfermedades del páncreas, riñón, hipófisis y células neuronales. También puede ser beneficiosa para IDDM, NIDDM, pancreatitis y carcinoma pancreático. zB7R1 puede actuar como una diana para terapia con MAb de cáncer pancreático en la que un MAb de señalización inhibe el crecimiento del cáncer y dirige destrucción mediada por inmunidad (Tutt, AL *et al.*, J. Immunol., 161: 3175-3185, 1998). De forma similar el carcinoma de células renales puede tratarse con anticuerpos monoclonales para receptores solubles que comprenden zB7R1 desvelados en el presente documento.

60 Pueden usarse polipéptidos de zB7R1 solubles descritos en el presente documento para unirse con, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1, bien individualmente o bien juntos, en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, enfermedad atópica, NIDDM, pancreatitis y disfunción renal como se ha descrito anteriormente. Puede usarse una forma soluble de zB7R1 para promover una respuesta de anticuerpo mediada por células Th y/o para promover la producción de IL-4 u otras citocinas por linfocitos u otras células inmunitarias.

65 Además, la inflamación es una respuesta protectora por un organismo para combatir un agente invasor. La

inflamación es un acontecimiento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por un lado, la supresión de respuestas inflamatorias puede dejar a un huésped inmunocomprometido; sin embargo, si se deja sin tratar, la inflamación puede conducir a complicaciones graves incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, psoriasis, artritis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino y similares),  
 5 choque séptico e insuficiencia orgánica múltiple. Resulta importante que estas diversas patologías comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto en la morbilidad y mortalidad humanas. Por lo tanto está claro que las moléculas que están implicadas de forma íntima en la coestimulación y/o inhibición de respuestas inmunitarias, tales como zB7R1, su contrarreceptor y anticuerpos anti zB7R1, podrían tener potencial terapéutico crucial para un amplio número de enfermedades  
 10 humanas y animales, de asma y alergia a autoinmunidad y choque séptico.

### 1. Artritis

Las artritis, incluyendo osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como resultado de lesión y similares,  
 15 son afecciones inflamatorias que se beneficiarían del uso terapéutico de proteínas antiinflamatorias, tales como las moléculas de zB7R1 desveladas en el presente documento. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que reviste la articulación, que provoca dolor, rigidez, calor, rojez e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir hueso y cartílago. Como resultado de artritis  
 20 reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamada, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y el cartílago lo que conduce al deterioro de la articulación y dolor grave entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineamiento, dando como resultado dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad mediada por inmunidad particularmente caracterizada por inflamación  
 25 y daño tisular posterior que conducen a discapacidad grave y mortalidad aumentada. Diversas citocinas se producen localmente en las articulaciones reumatoideas. Numerosos estudios han demostrado que IL-1 y TNF-alfa, dos citocinas proinflamatorias prototípicas, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción de articulación progresiva. De hecho, la administración de TNF-alfa e inhibidores de IL-1 en pacientes con AR ha conducido a una mejora drástica de las señales clínicas y biológicas de  
 30 inflamación y una reducción de las señales radiológicas de erosión ósea y destrucción del cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados prometedores, un porcentaje significativo de pacientes no responden a estos agentes, lo que sugiere que están implicados también otros mediadores en la patofisiología de artritis (Gabay, Expert, Opin. Biol. Ther. 2 (2): 135-149, 2002). Uno de esos mediadores podría ser una proteína de zB7R1 soluble o un anticuerpo anti zB7R1 y como tal una molécula que se une con o media en zB7R1, tal como B7R1-Fc soluble, B7R1m-VASP CH6 o anticuerpos o compañeros de unión como se describe en el presente documento, podría actuar como un producto  
 35 terapéutico valioso para reducir inflamación en artritis reumatoide, y otras enfermedades artríticas.

Existen varios modelos animales para artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de  
 40 artritis inducida por colágeno (CIA), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se asemeja estrechamente a la artritis reumatoide humana. Ya que CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con AR, esto lo hace un modelo ideal para cribar compuestos antiinflamatorios humanos potenciales. El modelo de CIA es un modelo bien conocido en ratones que depende tanto de una respuesta inmunitaria como de una respuesta inflamatoria, para producirse. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de células B y células T CD4+ en respuesta a un colágeno, que se proporciona como antígeno, y conduce a la producción de  
 45 anticuerpos anti colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas tisulares de mediadores de inflamación, como consecuencia de que algunos de estos anticuerpos reaccionen de forma cruzada con el colágeno nativo del ratón y activen la cascada del complemento. Una ventaja en el uso del modelo de CIA es que se conocen los mecanismos básicos de patogénesis. Los epítomos de células T y B relevantes en colágeno de tipo II se han identificado, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (por ejemplo, hipersensibilidad de tipo  
 50 retardado y anticuerpo anti colágeno) e inflamatorios (por ejemplo, citocinas, quimiocinas y enzimas degradantes de la matriz) relacionados con artritis mediada por inmunidad, y pueden por lo tanto usarse para evaluar eficacia del compuesto de ensayo en el modelo de CIA (Wooley, Curr. Opin. Rheum., 3: 407-20, 1999, Williams *et al.*, Immunol. 89: 9784-1988, 1992, Myers *et al.*, Life Sci. 61: 1861-78, 1997, y Wang *et al.*, Immunol. 92: 8955-959, 1995).

Como se muestra en el Ejemplo 21, los niveles de ARNm de B7R1 murino son mayores en las patas afectadas y ganglios linfáticos de drenaje (poplíteos) de ratones con CIA en comparación con ratones sin CIA, y los niveles se asocian con gravedad de enfermedad. Además, un grupo ha mostrado que el suministro de un anticuerpo  
 55 neutralizante para otro miembro de la familia de B7, proteína homóloga de B7 (B7h), reduce los síntomas en un modelo de CIA de ratón en relación con ratones de control (Iwai *et al.*, J. Immunol. 169: 4332, 2002), apoyando de este modo la idea de que B7R1-Fc soluble y B7R1m-VASP CH6 puede ser beneficioso en el tratamiento de enfermedad humana, tal como artritis. La administración de un anticuerpo anti B7h neutralizante redujo los síntomas de artritis en los animales cuando se introdujo de forma profiláctica o después de que ya estuvieran presentes los síntomas de artritis en el modelo (Iwai *et al.*, J. Immunol., 169: 4332, 2002). Por lo tanto, pueden usarse B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 para tratar enfermedades humanas específicas tales como cáncer, artritis reumatoide, psoriasis,  
 60 artritis psoriásica, artritis, endotoxemia, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis y otras afecciones inflamatorias desveladas en el presente documento.

La administración de polipéptidos que comprenden B7R1 soluble, tales como B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 u otras proteínas solubles y de fusión de zB7R1 a estos ratones de modelo CIA se usa para evaluar el uso de B7R1-Fc soluble para aliviar síntomas y alterar la evolución de la enfermedad. Además, ya que la inflamación está implicada en la patogénesis y progresión de artritis reumatoide, la administración sistémica o local polipéptidos que comprenden B7R1 soluble, tales como B7R1-Fc, B7R1m-VASP CH6 u otros receptores solubles y anticuerpos anti zB7R1, y proteínas de fusión pueden suprimir potencialmente la respuesta inflamatoria en AR. Como ejemplo y sin limitación, la inyección de 10-200 µg de B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 por ratón (de una a siete veces a la semana durante hasta pero sin limitación 4 semanas mediante la vía de administración s.c., i.p. o i.m.) puede reducir significativamente la puntuación de enfermedad (puntuación de pata, incidente de inflamación o enfermedad). Dependiendo del inicio de la administración de B7R1-Fc (por ejemplo antes de o en el momento de la inmunización con colágeno, o en cualquier punto temporal después de la segunda inmunización con colágeno, incluyendo los puntos temporales en los que la enfermedad ya ha progresado), B7R1-Fc o B7R1m-VASP CH6 pueden ser eficaces en la prevención de la artritis reumatoide, así como prevención de su progresión. Otros productos terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos de CD155 o anticuerpos anti CD155.

## 2. Endotoxemia

La endotoxemia es una afección grave que resulta habitualmente de agentes infecciosos tales como bacterias y otros agentes de enfermedad infecciosa, septicemia, síndrome de choque tóxico o en pacientes inmunocomprometidos sometidos a infecciones oportunistas y similares. Proteínas antiinflamatorias terapéuticamente útiles, tales como polipéptidos de zB7R1 y anticuerpos desvelados en el presente documento podrían ayudar en la prevención y tratamiento de endotoxemia en seres humanos y animales. Los polipéptidos de zB7R1, anticuerpos anti IL22RA o anticuerpos anti IL-22 o compañeros de unión, podrían actuar como un producto terapéutico valioso para reducir la inflamación y efectos patológicos en endotoxemia.

La endotoxemia inducida por lipopolisacárido (LPS) interacciona con muchos de los mediadores proinflamatorios que producen efectos patológicos en las enfermedades infecciosas y la endotoxemia inducida por LPS en roedores es un modelo ampliamente usado y aceptable para estudiar los efectos farmacológicos de agentes proinflamatorios o inmunomoduladores potenciales. LPS, producido en bacterias gram negativas, es un agente causante importante en la patogénesis del choque séptico (Glausner *et al.*, Lancet 338: 732, 1991). Puede inducirse de hecho un estado de tipo choque experimentalmente por una única inyección de LPS en animales. Las moléculas producidas por células que responden a LPS pueden dirigirse a patógenos directa o indirectamente. Aunque estas respuestas biológicas protegen al hospedador contra patógenos invasores, también pueden provocarles daño. Por lo tanto, la estimulación masiva de inmunidad innata, que se produce como resultado de infección bacteriana Gram negativa grave, conduce a producción en exceso de citocinas y otras moléculas, y el desarrollo de un síndrome letal, síndrome de choque séptico, que se caracteriza por fiebre, hipotensión, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia orgánica múltiple (Dumitru *et al.*, Cell 103: 1071-1083, 2000).

Estos efectos tóxicos de LPS están relacionados principalmente con activación de macrófagos que conduce a la liberación de múltiples mediadores inflamatorios. Entre estos mediadores, TNF parece desempeñar un papel crucial, como se indica por la prevención de la toxicidad de LPS por la administración de anticuerpos anti TNF neutralizantes (Beutler *et al.*, Science 229: 869, 1985). Está bien establecido que 1 µg de inyección de LPS de *E. coli* en un ratón C57Bl/6 dará como resultado aumentos significativos de IL-6, TNF-alfa, IL-1 y proteínas de fase aguda en circulación (por ejemplo SAA) aproximadamente 2 horas después de la inyección. La toxicidad de LPS parece estar mediada por estas citocinas ya que la inmunización pasiva contra estos mediadores puede dar como resultado mortalidad reducida (Beutler *et al.*, Science 229: 869, 1985). Las estrategias de inmunointervención potencial para la prevención y/o el tratamiento de choque séptico incluyen mAb anti TNF, antagonista del receptor de IL-1, LIF, IL-10 y G-CSF.

La administración de anticuerpos anti zB7R1 u otras proteínas solubles y de fusión de zB7R1 a estos modelos inducidos por LPS puede usarse para evaluar el uso de zB7R1 para aliviar síntomas y alterar la evolución de la enfermedad inducida por LPS.

## 3. Enfermedad Inflamatoria del Intestino. EII

En los Estados Unidos aproximadamente 500.000 personas padecen Enfermedad Inflamatoria del Intestino (EII) que puede afectar al colon y al recto (colitis Ulcerosa) o ambos, intestino delgado y grueso (Enfermedad de Crohn). La patogénesis de estas enfermedades no está clara, pero implica inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos de zB7R1, anticuerpos anti zB7R1 o compañeros de unión, podrían actuar como un producto terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en EII y enfermedades relacionadas.

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, habitualmente denominado el colon, caracterizada por inflamación y ulceración de la mucosa o el revestimiento interno del colon. Esta inflamación provoca que el colon se vacíe frecuentemente, dando como resultado diarrea. Los síntomas incluyen disgregación de las heces y dolores abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de CU se desconoce, estudios recientes sugieren que las defensas naturales del cuerpo actúan contra proteínas del cuerpo que el cuerpo cree que son ajenas (una "reacción autoinmunitaria"). Quizá porque se asemejan a proteínas

bacterianas en el intestino, estas proteínas pueden instigar o estimular el proceso inflamatorio que comienza a destruir el revestimiento del colon. A medida que el revestimiento del colon se destruye, se forman úlceras liberando moco, pus y sangre. La enfermedad comienza habitualmente en el área rectal y puede extenderse con el tiempo por todo el intestino grueso. Episodios repetidos de inflamación conducen a engrosamiento de la pared del intestino y el recto con tejido cicatricial. Con enfermedad grave puede producirse muerte de tejido del colon o septicemia. Los síntomas de colitis ulcerosa varían en su gravedad y su aparición puede ser gradual o repentina. Los ataques pueden estar provocados por muchos factores, incluyendo infecciones respiratorias o tensión.

Aunque no existe en la actualidad ninguna cura para CU disponible, los tratamientos se centran en suprimir el proceso inflamatorio anómalo en el revestimiento del colon. Están disponibles para tratar la enfermedad tratamientos incluyendo corticosteroides inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos. Sin embargo, el uso a largo plazo de inmunosupresores tales como corticosteroides y azatioprina puede dar como resultado efectos secundarios graves incluyendo debilitamiento de los huesos, cataratas, infección y efectos en el hígado y la médula ósea. En los pacientes en los que las terapias actuales no son exitosas, la cirugía es una opción. La cirugía implica la retirada del colon completo y el recto.

Existen varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa crónica. El modelo más ampliamente usado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico/etanol (TNBS), que induce inflamación crónica y ulceración en el colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles mediante instilación intrarrectal, este induce respuesta inmunitaria mediada por células T en la mucosa colónica, que conduce en este caso a una inflamación mucosa masiva caracterizada por la infiltración densa de células T y macrófagos por toda la pared del intestino grueso. Además, la imagen histopatológica se acompaña de la imagen clínica de pérdida de peso progresiva (debilitamiento), diarrea con sangre, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath *et al.*, Rev. Immunol 19: 51-62, 2000).

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

La administración de anticuerpos anti zB7R1 u otras proteínas solubles y de fusión de zB7R1 a estos modelos de TNBS o DSS puede usarse para evaluar el uso de zB7R1 para aliviar síntomas y alterar la evolución de la enfermedad gastrointestinal. Además, los resultados que muestran inhibición de señalización de células T por zB7R1 proporcionan prueba de concepto de que otros antagonistas de zB7R1, tales como zB7R1 o anticuerpos de los mismos, también pueden usarse para aliviar síntomas en los modelos de colitis/EII y alterar la evolución de la enfermedad.

#### 4. Psoriasis

La psoriasis es una afección cutánea crónica que afecta a más de siete millones de americanos. Se produce psoriasis cuando nuevas células de la piel crecen de forma anómala, dando como resultado porciones de piel inflamadas, hinchadas y escamosas en las que la piel vieja no se ha desprendido con suficiente rapidez. La psoriasis de placa, la forma más común, se caracteriza por porciones de piel inflamada ("lesiones") cubiertas con escamas blanco plateado. La psoriasis puede estar limitada a algunas placas o implicar áreas de piel de moderadas a extensivas, apareciendo más habitualmente en el cuero cabelludo, rodillas, codos y tronco. Aunque es altamente visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogénesis de las enfermedades implica inflamación crónica de los tejidos afectados. Los polipéptidos de zB7R1, anticuerpos anti zB7R1 o anticuerpos anti IL-22 y anti zB7R1 o compañeros de unión, podrían actuar como un producto terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en psoriasis, otras enfermedades cutáneas inflamatorias, alergias cutáneas y mucosas, y enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por células T de la piel que puede provocar incomodidad considerable. Es una enfermedad para la que no hay cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta aproximadamente al dos por ciento de las poblaciones de Europa y Norteamérica. Aunque los individuos con psoriasis leve pueden con frecuencia combatir su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en todo el mundo requieren terapia inmunosupresora ultravioleta o sistémica. Desafortunadamente, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y la toxicidad de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes habitualmente tienen reaparición de psoriasis, y en algunos casos rebote, poco después de detener la terapia inmunosupresora.

Además, pueden usarse anticuerpos anti zB7R1 y receptores solubles zB7R1 de la presente divulgación en la prevención y terapia contra pérdida de peso asociada con varias enfermedades inflamatorias descritas en el

presente documento, así como para cáncer (por ejemplo, quimioterapia y caquexia) y enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la pérdida de peso grave es un marcador clave asociado con modelos de septicemia, EM, AR y modelos tumorales. Además, la pérdida de peso es un parámetro clave para muchas enfermedades humanas incluyendo cáncer, enfermedad infecciosa y enfermedad inflamatoria. Pueden ensayarse anticuerpos anti zB7R1 y antagonistas de zB7R1 tales como los receptores zB7R1 solubles y anticuerpos de los mismos de la presente divulgación, con respecto a su capacidad para prevenir y tratar la pérdida de peso en ratones a los que se han inyectado adenovirus de zB7R1 descritos en el presente documento. Se conocen en la técnica métodos para determinar un régimen profiláctico o terapéutico para dichos antagonistas de zB7R1 y pueden determinarse usando los métodos descritos en el presente documento.

También pueden usarse polipéptidos de receptores solubles de zB7R1 y anticuerpos de los mismos dentro de los sistemas de diagnóstico para la detección de niveles en circulación de zB7R1 o contrarreceptor de zB7R1, y en la detección de zB7R1 asociado con respuesta inflamatoria de fase aguda. Dentro de una realización relacionada, pueden usarse anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente con receptores solubles de zB7R1 de la presente divulgación para detectar polipéptidos de receptores en circulación; por el contrario, pueden usarse los receptores solubles de zB7R1 en sí mismos para detectar polipéptidos de zB7R1 en circulación o de acción local. Los niveles elevados o deprimidos de contrarreceptor de zB7R1 o polipéptidos de zB7R1 pueden ser indicativos de condiciones patológicas, incluyendo inflamación o cáncer. Además, la detección de proteínas o moléculas de fase aguda tales como zB7R1 puede ser indicativa de una afección inflamatoria crónica en ciertas patologías (por ejemplo, psoriasis, artritis reumatoide, colitis, EII). La detección de dichas afecciones sirve para ayudar en el diagnóstico de enfermedad así como para ayudar a un médico a elegir la terapia apropiada.

Por ejemplo, los anticuerpos neutralizantes para zB7R1 incluyen anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales neutralizantes, que pueden unirse con epítopos antigénicos de zB7R1 y neutralizar la actividad de zB7R1. En consecuencia, los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos antigénicos de zB7R1 son útiles para inducir anticuerpos que se unan con los polipéptidos de zB7R1 descritos en el presente documento, así como para identificar y cribar anticuerpos monoclonales anti-zB7R1 que son neutralizantes, y que pueden unirse con, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1. Dichos anticuerpos monoclonales neutralizantes de la presente divulgación pueden unirse con un epítipo antigénico de zB7R1.

Además de otros modelos de enfermedad descritos en el presente documento, la actividad de anticuerpos anti-zB7R1 en tejido inflamatorio derivado de lesiones psoriásicas humanas puede medirse *in vivo* usando un modelo de ratón inmunodeficiente combinado grave (SCID). Se han desarrollado varios modelos de ratón en los que se implantan células humanas en ratones inmunodeficientes (denominados colectivamente modelos de xenoinjerto); véase, por ejemplo, Cattán AR, Douglas E, Leuk. Res. 18: 513-22, 1994 y Flavell, DJ, Hematological Oncology 14: 67-82, 1996. Como un modelo de xenoinjerto *in vivo* para psoriasis, se implanta tejido cutáneo psoriásico humano en el modelo de ratón SCID, y se expone a un antagonista apropiado. Además, pueden usarse otros modelos animales de psoriasis en la técnica para evaluar los antagonistas de zB7R1, tales como injertos cutáneos psoriásicos humanos implantado en modelo de ratón AGR129, y exponerse a un antagonista apropiado (por ejemplo, véase, Boyman, O. *et al.*, J. Exp. Med. Publicación en línea n.º 20031482, 2004). Son antagonistas preferidos anticuerpos anti-zB7R1 que se unen con, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan o neutralizan la actividad de zB7R1, sin embargo, pueden usarse en este modelo anticuerpos anti-zB7R1 (solos o en combinación con otros antagonistas de B7), zB7R1 soluble, así como otros antagonistas de zB7R1. De forma similar, pueden usarse tejidos o células derivados de colitis humana, EII, artritis u otras lesiones inflamatorias en el modelo de SCID para evaluar las propiedades antiinflamatorias de los antagonistas de zB7R1 descritos en el presente documento.

Pueden ensayarse terapias diseñadas para anular, retardar o reducir la inflamación usando anticuerpos anti-zB7R1 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes mediante la administración de anticuerpos anti-zB7R1 o compuestos de zB7R1 solubles a ratones SCID que portan tejido inflamatorio humano (por ejemplo, lesiones psoriásicas y similares) u otros modelos descritos en el presente documento. La eficacia de tratamiento se mide y se evalúa estadísticamente como efecto antiinflamatorio aumentado dentro de la población tratada a lo largo del tiempo usando métodos bien conocidos en la técnica. Algunos métodos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, medir, por ejemplo, en un modelo de psoriasis, el grosor epidérmico, el número de células inflamatorias en la dermis superior, y los grados de paraqueratosis. Dichos métodos se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Por ejemplo, véase, Zeigler, M. *et al.* Lab Invest 81: 1253, 2001; Zollner, T. M. *et al.* J. Clin. Invest. 109: 671, 2002; Yamanaka, N. *et al.* Microbio. Immunol. 45: 507, 2001; Raychaudhuri, S. P. *et al.* Br. J. Dermatol. 144: 931, 2001; Boehncke, W. H *et al.* Arch. Dermatol. Res. 291: 104, 1999; Boehncke, W. H *et al.* J. Invest. Dermatol. 116: 596, 2001; Nickoloff, B. J. *et al.* Am. J. Pathol. 146: 580, 1995; Boehncke, W. H *et al.* J. Cutan. Pathol. 24: 1, 1997; Sugai, J., M. *et al.* J. Dermatol. Sci. 17: 85, 1998; y Villadsen L.S. *et al.* J. Clin. Invest. 112: 1571, 2003. La inflamación también puede supervisarse a lo largo del tiempo usando métodos bien conocidos tales como citometría de flujo (o PCR) para cuantificar el número de células inflamatorias o lesionales presentes en una muestra, puntuación (pérdida de peso, diarrea, sangrado rectal, longitud del colon) para EII, puntuación de enfermedad de la pata y puntuación de inflamación para modelo de AR CIA. Por ejemplo, las estrategias terapéuticas apropiadas para ensayar en dicho modelo incluyen tratamiento directo usando anticuerpos anti-zB7R1, otros antagonistas de zB7R1 (individualmente o junto con otros antagonistas de B7), o conjugados o antagonistas relacionados basándose en la interacción de alteración de anticuerpos anti-zB7R1 con zB7R1, o para terapias basadas en células utilizando

anticuerpos anti- zB7R1 o sus derivados, agonistas, conjugados o variantes.

Además, la psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica que se asocia con queratinocitos epidérmicos hiperplásicos y células mononucleares de infiltración, incluyendo células T de memoria CD4+, neutrófilos y macrófagos (Christophers, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 110: 199, 1996). Se creen en la actualidad que los antígenos ambientales desempeñan un papel significativo en el inicio y la contribución a la patología de la enfermedad. Sin embargo, es la pérdida de tolerancia a auto-antígenos lo que se cree que media en la patología de la psoriasis. Se cree que las células dendríticas y células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel importante en la presentación de antígeno y reconocimiento que median en la respuesta inmunitaria que conduce a la patología. Se ha desarrollado recientemente un modelo de psoriasis basado en el modelo de transferencia CD4+CD45RB (Davenport *et al.*, *Internat. Immunopharmacol.*, 2: 653-672). Se administran anticuerpos anti-zB7R1 de la presente divulgación, o zB7R1 soluble, a los ratones. La inhibición de las puntuaciones de enfermedad (lesiones cutáneas, citocinas inflamatorias) indica la eficacia de antagonistas de zB7R1 en psoriasis, por ejemplo, anticuerpos anti-zB7R1 o receptores solubles de zB7R1, u otros antagonistas tales como anticuerpos contra el contrarreceptor de zB7R1.

##### 5. Dermatitis atópica

La DA es una enfermedad inflamatoria crónica común que se caracteriza por citocinas hiperactivadas del subconjunto de células T auxiliares 2 (Th2). Aunque se conoce la etiología exacta de DA, se han implicado múltiples factores, incluyendo respuestas inmunitarias Th2 hiperactivas, autoinmunidad, infección, alérgenos y predisposición genética. Las características claves de la enfermedad incluyen xerosis (sequedad de la piel), prurito (picor de la piel), conjuntivitis, lesiones cutáneas inflamatorias, infección por *Staphylococcus aureus*, eosinofilia en sangre elevada, elevación de IgE e IgG1 en suero y dermatitis crónica con infiltración de células T, mastocitos, macrófagos y eosinófilos. Se ha reconocido que la colonización o infección con *S. aureus* empeora DA y perpetua la cronicidad de esta enfermedad cutánea.

Se encuentra con frecuencia DA en pacientes con asma y rinitis alérgica, y es frecuentemente la manifestación inicial de enfermedad alérgica. Aproximadamente el 20 % de la población en los países occidentales padecen estas enfermedades alérgicas, y la incidencia de DA en países desarrollados está aumentando por razones desconocidas. La DA comienza normalmente en la infancia y puede persistir con frecuencia durante la adolescencia hasta la adultez. Los tratamientos actuales para DA incluyen corticosteroides tópicos, ciclosporina A oral, inmunosupresores no corticosteroides tales como tacrolimus (FK506 en forma de pomada), e interferón gamma. A pesar de la diversidad de tratamientos para DA, muchos síntomas de los pacientes no mejoran, o tienen reacciones adversas a los medicamentos, requiriendo la búsqueda de otros agentes terapéuticos más eficaces. Los polipéptidos de zB7R1 solubles y anticuerpos anti-zB7R1 de la presente divulgación pueden usarse para neutralizar zB7R1 en el tratamiento de enfermedades humanas específicas tales como dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias y otras afecciones inflamatorias desveladas en el presente documento.

Para uso farmacéutico, el zB7R1 soluble o anticuerpos anti-zB7R1 desvelados en el presente documento se formulan para suministro parenteral, particularmente intravenoso o subcutáneo, de acuerdo con métodos convencionales. La administración intravenosa será por inyección de embolada, liberación controlada, por ejemplo, usando mini-bombas u otra tecnología apropiada, o mediante infusión durante un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán una proteína hematopoyética en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5 % en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para evitar la pérdida de proteína en superficies de vial, etc. Cuando se utiliza dicha terapia de combinación, las citocinas pueden combinarse en una única formulación o pueden administrarse en formulaciones separadas. Se conocen bien en la técnica métodos de formulación y se desvelan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990. Las dosis terapéuticas están en general en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg de peso de paciente por día, preferentemente 0,5-20 mg/kg por día, determinándose la dosis exacta por el especialista clínico según patrones aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y gravedad de la afección para tratar, rasgos del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de la experiencia habitual en la técnica. Las proteínas se administrarán habitualmente durante un periodo de hasta 28 días después de quimioterapia o trasplante de médula ósea o hasta que se consigue un recuento de plaquetas de  $>20.000/\text{mm}^3$ , preferentemente  $>50.000/\text{mm}^3$ . Más habitualmente, las proteínas se administrarán durante una semana o menos, con frecuencia durante un periodo de uno a tres días. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de zB7R1 soluble o anticuerpos anti-zB7R1 de la presente divulgación es una cantidad suficiente para producir un aumento clínicamente significativo en la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras linfoides o mieloides, que se manifestará como un aumento en los niveles en circulación de células maduras (por ejemplo, plaquetas o neutrófilos). El tratamiento de trastornos plaquetarios continuará por lo tanto hasta que se alcance un recuento de plaquetas de al menos  $20.000/\text{mm}^3$ , preferentemente  $50.000/\text{mm}^3$ . El zB7R1 soluble o anticuerpos anti-zB7R1 de la presente divulgación también pueden administrarse en combinación con otras citocinas tales como IL-3, 5 y 11; factor de células madre; eritropoyetina; G-CSF y GM-CSF. Dentro de regímenes de terapia de combinación, las dosis diarias de otras citocinas serán en general: EPO, 150 U/kg; GM-CSF, 5-15 lg/kg; IL-3, 1-5 lg/kg; y G-CSF, 1-25 lg/kg. La terapia de combinación con EPO, por ejemplo, está indicada en paciente anémicos con bajos niveles de EPO.

En general, la dosificación de zB7R1 soluble (o análogo o proteína de fusión de zB7R1) o anticuerpos anti-zB7R1 administrados variará dependiente de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, la condición médica general y el historial médico previo del paciente. normalmente, es deseable proporcionar al receptor una dosificación de zB7R1 soluble o anticuerpos anti-zB7R1 que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque también puede administrarse una dosificación menor o mayor según dicten las circunstancias.

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

Las vías adicionales de administración incluyen oral, de membrana mucosa, pulmonar y transcutánea. El suministro oral es adecuado para microesferas, microesferas de zeína, microesferas de proteinoide, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de un suministro intranasal se ejemplifica por dicho modo de administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 199 (1999)). Pueden prepararse partículas secas o líquidas que comprenden zB7R1 e inhalarse con la ayuda de dispersiones de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (por ejemplo, Pettit y Gombotz, *TIBTECH* 16: 343 (1998); Patton *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35: 235 (1999)). Este enfoque se ilustra por el sistema de control de la diabetes AERX, que es un inhalador electrónico portátil que suministra insulina aerosolizada a los pulmones. Los estudios han mostrado que se han suministrado proteínas de hasta 48.000 kDa a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, lo que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitra *et al.*, *Science* 269: 850 (1995)). El suministro transdérmico usando electroporación proporciona otra medio para administrar una molécula que tiene actividad de unión a zB7R1 (Potts *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10: 213 (1997)).

Una composición farmacéutica que comprende un zB7R1 soluble o anticuerpo anti-zB7R1 puede formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo que las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede tolerarse por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la materia conocen bien otros vehículos adecuados. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995).

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

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

Los liposomas proporcionan un medio de suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, o mediante administración oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl. 1): S61 (1993), Kim, *Drugs* 46: 618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son de composición similar a membranas celulares y como resultado pueden administrarse liposomas con seguridad y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar de tamaño con diámetros que varían de 0,02  $\mu\text{m}$  a más de 10  $\mu\text{m}$ . Pueden encapsularse diversos agentes en liposomas: división de agentes hidrófobos en las bicapas y división de agentes hidrófilos dentro del espacio o los espacios acuosos internos (véase, por ejemplo, Machy *et al.*, *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro *et al.*, *American J. Hosp. Pharm.* 46: 1576 (1989)). Además, es posible controlar la capacidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del

liposoma, el número de bicapas, la composición lipídica así como la carga y características de superficie de los liposomas.

5 Los liposomas pueden adsorberse en prácticamente cualquier tipo de célula y después liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido puede endocitarse por células que son fagocíticas. La endocitosis se sigue de degradación intralisosómica de lípidos liposómicos y liberación de los agentes encapsulados (Scherphof *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985)). Después de administración intravenosa, normalmente se captan liposomas pequeños (0,1 a 1,0  $\mu\text{m}$ ) por células del sistema reticuloendotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que liposomas mayores de 3,0  $\mu\text{m}$  se depositan en el pulmón. Esta captación preferente de liposomas menores por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para suministrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

15 El sistema reticuloendotelial puede evitarse por varios métodos incluyendo la saturación con grandes dosis de partículas de liposomas o inactivación de macrófagos selectivos por medios farmacológicos (Claassen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984)). Además, se ha mostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glucolípidos o polietilenglicol en membranas liposómicas da como resultado una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1068: 133 (1991); Allen *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).

20 También pueden prepararse liposomas para dirigirse a células u órganos particulares variando la composición de fosfolípidos o insertando receptores o contrarceptores en los liposomas. Por ejemplo, se han usado liposomas, preparados con alto contenido de un tensioactivo no iónico, para dirigirse al hígado (Hayakawa *et al.*, Patente Japonesa 04-244.018; Kato *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 16: 960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja,  $\alpha$ -tocoferol, y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío y después reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha mostrado que una formulación liposómica de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) se dirige al hígado (Shimizu *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 881 (1997)).

30 Como alternativa, pueden unirse diversos contrarceptores de dirección a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosilípidos de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de células del hígado (Kato y Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). De forma similar, Wu *et al.*, Hepatology 27: 772 (1998), han mostrado que el marcaje de liposomas con asialofetuína condujo a una semivida en plasma de liposoma acortada y captación de liposoma marcado con asialofetuína por hepatocitos muy potenciada. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galatosilípidos de tipo ramificado puede inhibirse por preinyección de asialofetuína (Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humano poliacotilados proporcionan otro enfoque para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997)). Además, Geho, *et al.* Patente de Estados Unidos n.º 4.603.044, describen un sistema de suministro de vesículas liposómicas dirigido a hepatocitos, que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

45 En un enfoque más general para la dirección tisular, las células diana se premarcan con anticuerpos biotinilados específicos para un contrarceptor expresado por la célula diana (Harasym *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998)). Después de liberación del plasma de anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, se unen anticuerpos de dirección directamente a liposomas (Harasym *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998)).

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

60 Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Se preparan microesferas a partir de polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhidridos, poli(ortoésteres), polímeros de etilenvinilacetato no biodegradables, en los que las proteínas se inmovilizan en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem. 6: 332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus *et al.*, Science 281: 1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también puede proporcionar vehículos para administración

intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10: 167 (1997)).

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

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

Como ilustración, pueden proporcionarse composiciones farmacéuticas como un kit que comprende un recipiente que comprende un polipéptido con un dominio extracelular de zB7R1, por ejemplo, receptores solubles monoméricos, homodiméricos, heterodiméricos o multiméricos de zB7R1, o un antagonista de zB7R1 (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con un polipéptido de zB7R1 o anticuerpo anti-zB7R1 neutralizante). Pueden proporcionarse polipéptidos terapéuticos en forma de una solución inyectable para dosis individuales o múltiples, o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispersor de polvo seco, generador de aerosol líquido o nebulizador para administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede comprender además información escrita acerca de indicaciones y uso de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir una declaración de que la composición de zB7R1 está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a zB7R1.

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

Los liposomas proporcionan un medio para suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, o mediante administración oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl. 1): S61 (1993), Kim, *Drugs* 46: 618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son de composición similar a membranas celulares y, como resultado, los liposomas pueden administrarse con seguridad y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y el tamaño de los liposomas puede variar con diámetros que varían de 0,2 µm a más de 10 µm. Puede encapsularse diversos agentes en liposomas: división de agentes hidrófobos en las bicapas y división de agentes hidrófilos dentro del espacio o los espacios acuosos internos (véase, por ejemplo, Machy *et al.*, *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro *et al.*, *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la capacidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, la composición lipídica, así como la carga y las características de superficie de los liposomas.

Los liposomas adsorberse prácticamente en cualquier tipo de célula y después liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma absorbido puede endocitarse por células que son fagocíticas. La endocitosis se sigue de degradación intralisosómica de lípidos liposómicos y liberación de los agentes encapsulados (Scherphof *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446: 368 (1985)). Después de administración intravenosa, se captan normalmente liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 µm) por células del sistema reticuloendotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que se depositan liposomas mayores de 3,0 µm en el pulmón. Esta captación preferente de liposomas menores por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para suministrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos en tumores del hígado.

El sistema reticuloendotelial puede evitarse por varios métodos incluyendo la saturación con grandes dosis de partículas liposómicas o inactivación de macrófagos selectiva por medios farmacológicos (Claassen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 802: 428 (1984)). Además, se ha mostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glucolípidos o polietilenglicol a membranas liposómicas da como resultado una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1068: 133 (1991); Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9 (1993)).

- También pueden prepararse liposomas para dirigirse a células particulares u órganos variando la composición de fosfolípidos o insertando receptores o contrarceptores en los liposomas. Por ejemplo, se han usado liposomas, preparados con un alto contenido de un tensioactivo no iónico, para dirigirse al hígado (Hayakawa *et al.*, Patente Japonesa 04-244.018; Kato *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 16: 960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja,  $\alpha$ -tocoferol y aceite de ricino hidrogenado etoxilado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío y después reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha mostrado que una formulación liposómica de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y *cholesterol* (Ch) se dirige al hígado (Shimizu *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 881 (1997)).
- Como alternativa, pueden unirse diversos contrarceptores de dirección a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas pueden modificarse con derivados de galactosilípido de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de células del hígado (Kato y Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). De forma similar, Wu *et al.*, Hepatology 27: 772 (1998), han mostrado que el marcaje de liposomas con asialofetúina conducía a una semivida en plasma de liposoma acortada y captación de liposoma marcado con asialofetúina por hepatocitos muy potenciada. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galatosilípidos de tipo ramificado puede inhibirse por preinyección de asialofetúina (Murahashi *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). Los liposomas de albúmina de suero humano poliacotilados proporcionan otro enfoque para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997)). Además, Geho, *et al.* Patente de Estados Unidos n.º 4.603.044, describen un sistema de suministro de vesículas liposómicas dirigido a hepatocitos, que tienen especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.
- En un enfoque más general para la dirección tisular, las células diana se premarcan con anticuerpos biotinilados específicos para un contrarceptor expresado por la célula diana (Harasym *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998)). Después de la eliminación del plasma de anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, se unen directamente anticuerpos de dirección a liposomas (Harasym *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998)).
- Pueden encapsularse anticuerpos neutralizantes anti-zB7R1 y compañeros de unión con actividad de unión a zB7R1, o receptor soluble de zB7R1, dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson *et al.*, Infect Immun., 31: 1099 (1981), Anderson *et al.*, Cancer Res. 50: 1853 (1990), y Cohen *et al.*, Biochim, Biophys Acta 1063: 95 (1991), Alving *et al.*, "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," en Liposome Technology, 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al.*, Meth. Enzymol. 149: 124 (1987)). Como se ha observado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen *et al.*, Biochim, Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).
- Se han diseñado microesferas de polímeros degradables para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli (lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres), polímeros de etilvinilacetato no biodegradables, en los que las proteínas están inmovilizadas en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem., Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995), Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus *et al.*, Science 281: 1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref *et al.*, Pharm. Biol., 10: 167 (1997)).
- La presente memoria descriptiva también contempla anticuerpo anti zB7R1 modificado químicamente o compañero de unión, por ejemplo anticuerpos anti zB7R1 o receptor soluble de zB7R1, unido con un polímero, como se ha analizado anteriormente.
- Pueden idearse otras formas de dosificación por los expertos en la materia, como se muestra, por ejemplo, en Ansel y Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms y Drug Delivery Systems, 5ª edición (Lea y Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995), y en Ranade y Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996).
- La presente memoria descriptiva contempla composiciones de anticuerpos anti zB7R1 y métodos y usos terapéuticos que comprenden un anticuerpo, péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Dichas composiciones pueden comprender además un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Los ejemplos de vehículos incluyen agua, solución de tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares. En un aspecto, la invención proporciona una formulación que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se define en las reivindicaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## 12. Producción de ratones transgénicos

También pueden usarse ácidos nucleicos que codifican zB7R1 o formas modificadas del mismo para generar animales transgénicos o animales "nuligénicos" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, habiéndose introducido dicho transgén en el animal o un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo, uno embrionario. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, puede usarse ADNc que codifica una proteína de zB7R1 para clonar ADN genómico que codifica una proteína de zB7R1 de acuerdo con técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan el ADN deseado. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han hecho convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.736.866 y 4.870.009.

Como alternativa, pueden usarse homólogos no humanos de zB7R1 para construir un animal "nuligénico" que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica una proteína de zB7R1 como resultado de recombinación homóloga entre el gen endógeno y un ADN genómico alterado que codifica zB7R1, que se introduce en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse ADNc que codifica una proteína de zB7R1 para clonar ADN genómico que codifica una proteína de zB7R1 de acuerdo con técnicas establecidas. Puede suprimirse una parte del ADN genómico que codifica una proteína de zB7R1 o reemplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede usarse para supervisar la integración. Normalmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos tanto 5' como 3'). Véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992). Las células seleccionadas se inyectan después en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación. Véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152. Después puede implantarse un embrión quimérico en un animal adoptivo hembra pseudoembarazado adecuado y el embrión se lleva a término para crear un animal "nuligénico". La descendencia que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse por técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales nuligénicos pueden caracterizarse por ejemplo por su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a ausencia de la proteína zB7R1. Se entiende que los modelos descritos en el presente documento pueden variarse. Por ejemplo, pueden formarse modelos de "introducción de gen", o los modelos pueden ser basados en células en lugar de modelos animales.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

### 40 Ejemplo 1

#### Construcción de expresión de zB7R1 murina

Se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba el zB7R1 de ratón de longitud completa (SEQ ID NO: 8) mediante recombinación homóloga. Se aisló un fragmento de ADNc de zB7R1 de ratón por PCR usando la secuencia polinucleotídica como se identifica por SEQ ID NO: 29 con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' correspondientes a las secuencias de vector que flanquean el punto de inserción de zB7R1 de ratón usando los cebadores zc51280 (SEQ ID NO: 30) y zc51314 (SEQ ID NO: 31).

La mezcla de reacción de PCR se procesó en un gel de agarosa al 2 % y se extrajo en gel una banda correspondiente al tamaño del inserto usando un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación, un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40; y secuencias de URA3 y CEN-ARS requeridas para selección y replicación en *S. cerevisiae*. Se construyó a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 77145), un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) de poliovirus y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C-terminal del dominio transmembrana. Se digirió el plásmido pZMP21 con BgIII, y se usó para recombinación con el inserto de PCR.

La recombinación se realizó usando el kit de Clonación de PCR BD In-Fusion™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La mezcla del fragmento de PCR y el vector digerido en 10 µl se añadió a los reactivos de clonación liofilizados y se incubó a 37 °C durante 15 minutos y 50 °C durante 15 minutos. La reacción estuvo lista para

transformación. Se transformaron 2 µl de reacción de recombinación en Células Competentes Químicas TOP10 One Shot (Invitrogen, Carlsbad, CA); La transformación se incubó en hielo durante 10 minutos y se sometió a choque térmico a 42 °C durante 30 segundos. La reacción se incubó en hielo durante 2 minutos (ayudando a las células transformadas a recuperarse). Después de los 2 minutos de incubación, se añadieron 300 µl de SOC (Tryptona Bacto™ 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y la transformación se incubó a 37 °C con agitador durante una hora. La transformación completa se sembró en una placa de LB AMP (caldo de cultivo LB (Lennox), Agar Bacto™ 1,8 % (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

10 Las colonias se cribaron por PCR usando los cebadores zc51280 (SEQ ID NO: 30) y zc51314 (SEQ ID NO: 31), respectivamente. Las colonias positivas se verificaron por secuenciación. La construcción correcta se designó mzB7R1FLpZMP21.

## Ejemplo 2

15

### zB7R1mFc2pZMP21 de ratón

Puede construirse un plásmido de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el dominio extracelular de zB7R1 de ratón y la parte Fc2 de ratón mediante recombinación homóloga. Se aísla un fragmento de ADN del dominio extracelular de zB7R1 de ratón mediante PCR usando SEQ ID NO: 32 con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' correspondientes a la secuencia de vector y la secuencia de Fc2 de ratón que flanquean el punto de inserción de zB7R1 de ratón usando los cebadores zc50437 (SEQ ID NO: 33) y zc50438 (SEQ ID NO: 34).

20

La mezcla de reacción de PCR se procesa en un gel de agarosa al 2 % y se extrae en gel una banda correspondiente al tamaño del inserto usando un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El plásmido inicial usado es pZMP21 que usó pZMP21 como un vector base y tiene la parte Fc2 de ratón incluida en él. El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, múltiples sitios de restricción para inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación, un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40; y secuencias de URA3 y CEN-ARS requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. Se construye a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 77145), un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) de poliovirus y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C terminal del dominio transmembrana. El plásmido hBTLA mFc2 pZMP21 se digirió con EcoR1/BglII para separar por escisión BTLA humano y se usó para recombinación con el inserto de PCR.

25

30

35

40

45

50

Las colonias se cribaron mediante PCR usando los cebadores zc50437 (SEQ ID NO: 33) y zc50438 (SEQ ID NO: 34). Las colonias positivas se verificaron por secuenciación. La construcción correcta se designó mB7R1mFc2pZMP21 (SEQ ID NO: 69).

55

## Ejemplo 3

### Construcciones de expresión B7/mFc2

60 Se preparó un vector de expresión, pZMP21 hB7R1/mFc2 (SEQ ID NO: 68), para expresar una versión soluble marcada con Fc en el extremo C terminal de zB7R1. Se generó un fragmento de 734 pares de bases mediante PCR que contenía el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3) y los dos primeros aminoácidos de mFc (glutamina y prolina) con sitios EcoRI y BglII codificados en los extremos 5' y 3', respectivamente.

65 Este fragmento de PCR se generó usando los cebadores zc48914 (SEQ ID NO: 35) y zc48908 (SEQ ID NO: 36) mediante amplificación a partir de una biblioteca de ADNc de placenta humana. Las condiciones de reacción de

PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos; seguido de una inmersión a 4 °C. Se generó un fragmento de 699 pares de bases por PCR que contenía los dominios constante 2 y constante 3 de la función efectora menos BALB-C IgG gamma 2a (mFc2). Este fragmento de PCR se generó usando los cebadores zc48911 y ac48915 mediante amplificación a partir de un vector de expresión que contenía mFc2 (mTAC1/mFc2 construcción n.º 998). Las condiciones de reacción de PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos; seguido de una inmersión a 4 °C. El fragmento de zB7R1 de 734 pares de bases y el fragmento mFc2 de 699 pares de bases se purificaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % y purificación de bandas usando un kit de extracción en gel QiaQuick (Qiagen: 28704). 1/5º y 1/25º del total de las bandas purificadas para cada uno del zB7R1 y los fragmentos de mFc2, respectivamente, se recombinaron en pZMP21 que se había linealizado por digestión con BglII y purificado por purificación de bandas, como se ha descrito anteriormente, usando la cepa de levadura SF838-9Dalfa. La levadura que fue capaz de crecer a partir de placas de agar deficientes en uracilo se lisó y se extrajo ADN mediante precipitación con etanol. Se electroporaron 2 µl de la mezcla de ligamiento en 37 µl de *E. coli* electrocompetente DH10B (Gibco 18297-010) según las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se diluyeron en 400 µl de medio LB y se sembraron en placas de LB que contenían ampicilina 100 µg/ml. Los clones se analizaron por digestiones de restricción y se enviaron clones positivos para secuenciación de ADN para confirmar la precisión de la PCR.

El vector de expresión, pZMP21 hB7R1/mfc2, descrito anteriormente, se usó después para construir una serie de proteínas químicas solubles mFc2. zB7R1/mFc2 se construyó mediante PCR de un fragmento de 438 pares de bases usando oligos zc50136 (SEQ ID NO: 37) y zc50138 (SEC ID N° 38) con clonetrack n.º 101632 como molde. El producto de PCR resultante se purificó en bandas, como se ha descrito anteriormente, y se digirió con EcoRI y BglII. El producto resultante se purificó de nuevo por bandas. También se digirió pZMP21 hB7R1/mFc2 con EcoRI y BglII y se aisló la cadena principal del vector de 9721 pares de bases más mFc2. 1/50º del producto de pZMP21 hB7R1/mFc2 se ligó a 3/50º del fragmento de 438 pares de bases usando ADN ligasa T4. Se introdujeron por electroporación 2 µl de la mezcla de ligamiento en 37 µl de *E. coli* electrocompetentes DH10B (Gibco 18297-010) de acuerdo con las directrices del fabricante. Las células transformadas se diluyeron en 400 µl de medio LB y se sembraron en placas de LB que contenían ampicilina 100 µg/ml. Los clones se analizaron por digestiones de restricción y se enviaron clones positivos para secuenciación de ADN para confirmar la precisión de la PCR. Se digirieron tres conjuntos de 200 µg de la construcción de pZMP21 hB7R1/mFc2 cada uno con 200 unidades de Pvu I a 37 °C durante tres horas y después se precipitaron con IPA y se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se retiró por decantación del sedimento, y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70 % y se permitió que incubara durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a 14.000 RPM y el sobrenadante se retiró por decantación del sedimento. Después el sedimento se resuspendió en 750 µl de medio PF-CHO en un ambiente estéril, se permitió que se incubara a 60 °C durante 30 minutos, y se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Se sedimentaron por centrifugación células 5E6 APFDXB11 en cada uno de tres tubos y se resuspendieron usando la solución de ADN-medio. Las mezclas de ADN/célula se colocaron en una cubeta de hueco de 0,4 cm y se sometieron a electroporación usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitación y 300 V. Después los contenidos de las cubetas se retiraron, se agruparon y se diluyeron hasta 25 ml con medio PF-CHO y se colocaron en un matraz de agitación de 125 ml. El matraz se colocó en un incubador en un agitador a 37 °C, CO<sub>2</sub> 6 %, y se agitó a 120 rpm. La línea celular se sometió a selección de nutrientes seguido de amplificación por etapas a metotrexato (MTX) 200 nM, y después a MTX 500 nM. La expresión se confirmó por transferencia de Western, y la línea celular se aumentó de escala y se siguió de purificación de proteínas.

#### Ejemplo 4

##### zB7R1Avi-HIS TagpZMP21 de ratón

En el intento de crear las moléculas tetraméricas se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codifica el dominio extracelular de zB7R1 de ratón, el Marcador de Avi y Marcador de HIS. Se aisló un fragmento de ADN del dominio extracelular de zB7R1 de ratón mediante PCR usando SEQ ID NO: 39 con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' correspondientes a la secuencia de vector y parte de la secuencia de Marcador de Avi que flanquean el punto de inserción de zB7R1 de ratón usando los cebadores zc51100 (SEQ ID NO: 40) y zc51101 (SEQ ID NO: 41).

La mezcla de reacción de PCR se procesa en un gel de agarosa al 2 % y se extrae en gel una banda correspondiente al tamaño del inserto usando un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación, un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40; y secuencias de URA3 y CEN-ARS requeridas para selección y replicación en *S. cerevisiae*. Se construye a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209,

con el n.º de Referencia 77145), un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) de poliovirus y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C terminal del dominio transmembrana. Se digirió el plásmido pZMP21AviHIS con EcoR1 y se usó para recombinación con el inserto de PCR.

5 La recombinación se realizó usando el kit de clonación de PCR BD In-Fusion™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La mezcla del fragmento de PCR y el vector digerido en 10 µl se añadió a los reactivos de clonación liofilizados y se incubó a 37 °C durante 15 minutos y 50 °C durante 15 minutos. La reacción estuvo lista para transformación. Se transformaron 2 µl de reacción de recombinación en Células Competentes Químicas One Shot TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA); la transformación se incubó en hielo durante 10 minutos y se sometió a choque térmico a 42 °C durante 30 segundos. La reacción se incubó en hielo durante 2 minutos (ayudando a las células transformadas a recuperarse). Después de 2 minutos de incubación, se añadieron 300 µl de SOC (Tripton Bacto™ 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y la transformación se incubó a 37 °C con agitador durante una hora. La transformación completa se sembró en una placa LB AMP (caldo de cultivo LB (Lennox), Agar Bacto™ 1,8 % (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

15 Las colonias se cribaron por PCR usando los cebadores zc51100 (SEQ ID NO: 40) y zc51101 (SEQ ID NO: 41). Las colonias positivas se verificaron por secuenciación. La construcción correcta se designó mB7R1AviHISpZMP21.

### 20 Ejemplo 5

#### zB7R1Avi-HIS TagpZMP21 humano

25 En el intento de crear las moléculas tetraméricas se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codificaba el dominio extracelular de zB7R1 humano (SEQ ID NO: 3), el Marcador de Avi y el Marcador de HIS. Se aisló un fragmento de ADN del dominio extracelular de zB7R1 humano mediante PCR usando SEQ ID NO: 42 con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' correspondientes a la secuencia de vector y las secuencias de Marcador de Avi (SEQ ID NO: 43) y marcador de HIS (SEQ ID NO: 44) que flanquean el punto de inserción de zB7R1 humano usando los cebadores zc50485 (SEQ ID NO: 45) y zc50729 (SEQ ID NO: 46).

30 La mezcla de reacción de PCR se procesa en un gel de agarosa al 2 % y se extrae en gel una banda correspondiente al tamaño del inserto usando un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación, un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40; y secuencias de URA3 y CEN-ARS requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. Se construye a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 77145), un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) de poliovirus y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C terminal del dominio transmembrana. Se digirió el plásmido pZMP21 con EcoR1/BglII para retirar por escisión el líder de PTA y usarlo para recombinación con el inserto de PCR.

45 La recombinación se realizó usando el kit de clonación de PCR BD In-Fusion™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La mezcla del fragmento de PCR y el vector digerido en 10 µl se añadió a los reactivos de clonación liofilizados y se incubó a 37 °C durante 15 minutos y 50 °C durante 15 minutos. La reacción estuvo lista para transformación. Se transformaron 2 µl de reacción de recombinación en Células Competentes Químicas One Shot TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA); La transformación se incubó en hielo durante 10 minutos y se sometió a choque térmico a 42 °C durante 30 segundos. La reacción se incubó en hielo durante 2 minutos (ayudando a las células transformadas a recuperarse). Después de 2 minutos de incubación, se añadieron 300 µl de SOC (Tripton Bacto™ 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y la transformación se incubó a 37 °C con agitador durante una hora. La transformación completa se sembró en una placa de LB AMP (caldo de cultivo de LB (Lennox), Agar Bacto™ 1,8 % (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

55 Las colonias se cribaron por PCR usando los cebadores zc50485 (SEQ ID NO: 45) y zc50729 (SEQ ID NO: 46). Las colonias positivas se verificaron por secuenciación. La construcción correcta se designó hB7R1AviHISpZMP21.

### 60 Ejemplo 6

#### Condiciones de estimulación para la expresión de zB7R1 y otros miembros de la familia B7

##### A. Introducción

65 Las condiciones de estimulación en las que miembros de la familia B7 conocidos se expresan y/o regulan positivamente en células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BMDC) serían útiles en la evaluación de la

capacidad de zB7R1'a para unirse con CD cultivadas. En primer lugar, la regulación de miembros de la familia B7 conocidos se investigó usando diversas condiciones de estimulación en cultivos de FLT3L y GM-CSF/IL-4 de ratones BALB/c. En segundo lugar, se ensayó la unión de las proteínas de fusión de Fc solubles murinas disponibles con células de médula ósea cultivadas FLT3L, GM-CSF y GM-CSF/IL-4 de cepas tanto BALB/c como C57BL/6. Esto se describe en más detalle posteriormente.

## B. Métodos

### 1) *Aislamiento de médula ósea*

Se recogió médula ósea de ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad o ratones C57B1/6 de 4 meses de edad de los fémures. La médula ósea se filtró a través de un tamiz celular de 100 µm, los glóbulos rojos se lisaron con tampón de lisis de ACK y las células se resuspendieron en medio "completo" de RPMI (FCS 10 %, L-Glutamina 2 mM, Na-Piruvato 1 mM, NEAA 0,1 mM, β-ME 0,05 mM). Las células se sembraron después en placas de 6 pocillos a 1 x 10<sup>6</sup> células por ml con las condiciones de cultivo apropiadas.

#### (i) Generación de cultivos de células BMDC Flt3L

Se cultivaron células de médula ósea en presencia de 100 ng/ml de ligando de Flt3 humano recombinante. La mitad del medio se reemplazó el día 5 de cultivo con medio que contenía Flt3L nuevo. Se recogieron células el día 7 del cultivo.

#### (ii) Generación de cultivos de células GM-CSF/IL-4 BMDC

Se cultivaron células de la médula ósea en presencia de 10 ng/ml de cada uno de los GM-CSF murino recombinante e IL-4 murina recombinante (ambos de R & D Systems). La mitad del medio se reemplazó el día 3 del cultivo con medio que contenía GM-CSF/IL-4 nuevo. Las células se recogieron el día 6 del cultivo.

#### (iii) Generación de cultivos de células GM-CSF BMDC

Se cultivaron células de médula ósea en presencia de GM-CSF murino recombinante 20 ng/ml en 4 ml en placas de 6 pocillos. El día 3 de cultivo se añadieron 2 ml de medio que contenía GM-CSF nuevo a cada pocillo, el día 6, se reemplazó la mitad del medio (3 ml) con medio que contenía GM-CSF nuevo. Se recogieron células el día 7 del cultivo.

### 2) *Análisis de FACS*

Se realizaron todas las tinciones y diluciones en tampón de lavado de FACS (PBS, BSA 1 %, NaN<sub>3</sub> 0,1 %). Antes de la tinción, se añadió FcBlock (0,25 µg/10<sup>6</sup> células) a las células y se incubó aproximadamente 5-10 minutos. Las células se cotificaron con CD11c y B220. Todos los datos se adquirieron en BD FACSCalibur.

## C. Estimulación de cultivos celulares:

### 1) *Investigación de la regulación de moléculas de la familia B7 conocidas*

Se sembraron células cultivadas a 1 x 10<sup>6</sup> células por ml en 2 ml en placas de 24 pocillos y se estimularon con LPS 100 ng/ml, IFNγ 20 ng/ml, CD40L 1 µg/ml o una mezcla de ligando de TLR que contenía MALP -20,1 µg/ml, Poli I:C 12,5 µg/ml, LPS 100 ng/ml, Flagelina 0,1 µg/ml, R848 1 µg/ml y CpG ODN1826 125 ng/ml. Las células se ensayaron por citometría de flujo para expresión de la familia B7 a t = 0, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h.

Las células se tiñeron con uno de los anticuerpos de la familia B7 conjugados con PE B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-DC, ICOS o PD-1. Se usó 7-AAD para descartar células muertas en los puntos temporales de 72 y 96 h.

#### BMDC Flt3L

##### (i) B7-1

En todos los puntos temporales, las células no estimuladas expresaron B7-1, y la expresión se reguló positivamente adicionalmente por LPS y la mezcla de ligandos de TLR. El tratamiento con IFNγ y CD40L no tuvo ningún efecto en la expresión de B7-1 en relación con células no estimuladas.

##### (ii) B7-2

En todos los puntos temporales, las células no estimuladas expresaron B7-2, y la expresión se reguló positivamente además por LPS, IFNγ y la mezcla de ligandos de TLR. El tratamiento con CD40L no tuvo ningún efecto en la

expresión de B7-2 en relación con células no estimuladas.

(iii) B7-H1

5 A las 24 h las células no estimuladas no expresan B7-H1, pero LPS, IFN $\gamma$  y la mezcla de ligandos de TLR sí inducen expresión. Las células no estimuladas comienzan a expresar bajos niveles de B7-H1 a las 48 h, y LPS, IFN $\gamma$  y la mezcla de ligandos de TLR continúan mostrando regulación positiva del B7-H1 en relación con el control no estimulado. El tratamiento de CD40L no tuvo ningún efecto en la expresión de B7-H1 en relación con células no estimuladas.

10

(iv) B7-H2

En todos los puntos temporales, las células no estimuladas expresaron B7-H2. El tratamiento con IFN $\gamma$  y CD40L tuvo un efecto de bajo a nulo en la expresión de B7-H2 en relación con células no estimuladas. El tratamiento con el cóctel de ligandos de TLR pareció reducir la expresión de B7-H2.

15

(v) PD-1

Las células dendríticas Flt3L no estimuladas fueron negativas para expresión de PD-1, sin embargo la estimulación del ligando de TLR indujo expresión en todos los puntos temporales, y LPS (débilmente) e IFN $\gamma$  indujeron regulación positiva en los puntos temporales de 48 h, 72 h y 96 h.

20

(vi) B7-H3, B7-H4, B7-DC e ICOS

25 B7-H3, B7-H4, B7-DC e ICOS fueron negativos para expresión, en todos los puntos temporales, con todas las condiciones de estimulación, en células dendríticas generadas por Flt3L.

BMDC GM-CSF/IL-4

30 (I) B7-1

En todos los puntos temporales, las células no estimuladas expresaron B7-1, y la expresión se reguló positivamente adicionalmente mediante mezcla de ligando de TLR en los puntos temporales de 72 h y 96 h. El tratamiento con LPS, IFN $\gamma$  y CD40L no tuvo ningún efecto en la expresión de B7-1 en relación con células no estimuladas.

35

(ii) B7-2

En todos los puntos temporales, las células no estimuladas expresaron B7-2, y la expresión se reguló positivamente adicionalmente por IFN $\gamma$  y la mezcla de ligando de TLR en los puntos temporales de 72 h y 96 h. LPS redujo la expresión de B7-2 en los puntos temporales de 72 y 96 h. El tratamiento con CD40L no tuvo ningún efecto en la expresión de B7-2 en relación con células no estimuladas.

40

(iii) B7-H1

45 Las BMDC GM-CSF/IL-4 no estimuladas expresan en gran medida B7-H1. LPS reguló positivamente la expresión solamente en el punto temporal de 24 horas, e IFN $\gamma$  y la mezcla de ligandos de TLR regularon positivamente la expresión en todos los puntos temporales. El tratamiento con CD40L no tuvo ningún efecto en la expresión de B7-H1 en relación con células no estimuladas.

50

(iv) B7-H2

En todos los puntos temporales, las células no estimuladas expresaban B7-H2. El tratamiento con IFN $\gamma$  reguló positivamente ligeramente la expresión de B7-H2 en relación con células no estimuladas a las 48, 72 y 96 h. Ninguna de las otras condiciones de estimulación tuvo ningún efecto en la expresión de B7-H2 en relación con células no estimuladas.

55

(v) B7-DC

Las células dendríticas GM-CSF/IL-4 no estimuladas eran positivas para expresión de PD-1, y la estimulación con IFN $\gamma$  indujo aumento de la expresión en los puntos temporales de 48 h, 72 h y 96 h. LPS, CD40L y el cóctel de ligandos de TLR no tuvieron ningún efecto en la expresión de B7-DC en relación con el control no estimulado.

60

(vi) B7-H3, B7-H4, PD-1 e ICOS

65 B7-H3, B7-H4, PD-1 e ICOS fueron negativos para expresión, en todos los puntos temporales, con todas las condiciones de estimulación, en células dendríticas generadas por GM-CSF/IL-4.

## 2) Unión de proteínas de fusión de Fc soluble

se cultivaron células como se ha descrito anteriormente, sin embargo las condiciones de estimulación se modificaron a (i) LPS 100 ng/ml, (ii) CD40L (1 µg/ml) e IFNγ (20 ng/ml) y (iii) cóctel de ligandos de TLR, con algunas modificaciones (se omitió LPS, y se usó CpG ODN 2395 en lugar de CpG ODN 1826 (ambos ligandos de TLR 9 murinos) y se usó ácido Poliuridílico en lugar de R848 (ambos ligandos de TLR 7/8)). Se ensayaron células con respecto a la unión con las proteínas de fusión de Fc disponibles de interés a las 48 h por citometría de flujo.

Las proteínas de fusión de Fc murinas pBTLA, zB7R1, zB7-H4mL y zB7-H4mS así como zB7-H3x2 (control negativo) e ICOS-Fc murino obtenido de R & D Systems (control positivo) se marcaron con PE usando Kit de Marcaje de IgG de Ratón Zenon (Molecular Probes) y se usaron para teñir las células. El colorante 7-AAD se usó para descartar células muertas.

No pareció haber ninguna unión de pBTLA-Fc, zB7-H4mL-Fc o zB7-H4mS-Fc murinos en ninguna de las condiciones ensayadas.

Sin embargo, zB7R1-Fc murino sí parecía unirse en células cultivadas Flt3L estimuladas por IFNγ + CD40L en cepas de ratón tanto BALB/c como C57B1/6. La unión de zB7R1-Fc parecía negativa en las células cultivadas tanto con GM-CSF como con GM-CSF/IL-4 en las condiciones ensayadas.

### D. Conclusión

Se identificaron las condiciones en las que se expresan B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-DC y PD-1 y/o se regula positivamente en cultivos celulares enriquecidos con respecto a células dendríticas. Además, se ensayó la unión de proteínas de fusión de Fc marcadas con fluorescencia de los receptores huérfanos y ligandos con células cultivadas en estas condiciones para definir homólogos desconocidos para los miembros de la familia B7 desapareados. Específicamente, se identificó una condición de estimulación (IFNγ + CD40L), que indujo la unión de zB7R1.

### Ejemplo 7

#### Identificación de células que expresan zB7R1

##### A. Introducción

La identificación de una fuente celular que expresa el contrarreceptor para zB7R1 ayudaría a entender la biología de zB7R1 y también ayudaría en la clonación del contrarreceptor. Se usó un conjugado de fluorocromo directo de zB7R1-mFc2a y superficie de esplenocitos de ratón teñida con un cóctel de anticuerpos conjugados con fluorocromo específicos para marcadores de linaje para identificar células CD11c<sup>+</sup> activadas como el tipo celular primario que se une con zB7R1.

##### B. Procedimiento

Se recogió un bazo de ratón DO11.10 transgénico para un TCR específico para el péptido de Ova 323-339 y se trituró entre portaobjetos de vidrio esmerilado para obtener una suspensión celular individual. Los glóbulos rojos de la suspensión se lisaron usando tampón de lisis ACK. La suspensión celular resultante se ajustó a  $1 \times 10^6$  células por pocillo en el medio (RPMI + FBS 10 %, glutamina, piruvato, pen-strep y 2-mercaptoetanol a  $5 \times 10^{-5}$  M) y se incubó con péptido de OVA 323-339 1 µM a 37 °C. Las células se recogieron para análisis por citometría de flujo en los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas.

La proteína de fusión de zB7R1-mIgGFc2a se marcó directamente con PE usando el kit de marcaje de IgG2a de ratón de R-Ficoeritrina Zenon™ (Molecular Probes, Eugene Oregon, nº de cat Z25155) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron células recogidas en cada punto temporal en tampón de Facs (PBS + BSA 2 % + Na<sub>3</sub>CO<sub>3</sub> 0,02 %) con 5 µg/ml de ZB7R1-mFc2a marcado con PE Zenon™. En algunos casos, estos experimentos de unión también se realizaron en presencia de exceso de 40 veces de zB7R1-mFc2a no marcado (bloqueante específico) o exceso de 40 veces de pB7H4L-mFc2a (bloqueante no específico). Se incubaron pocillos de control con el reactivo de marcaje de Zenon™ solo o con una proteína de fusión de Fc irrelevante marcada de la misma manera. Las células se incubaron simultáneamente con anticuerpos para los siguientes antígenos: CD11c-APC, CD11b-PerCP-CY5, CD49b-APC-CY7, CD3-PeCy7 CD19-FITC (BD Pharmingen), CD8-PE-Texas Red y CD4-A405 (Caltag) a diluciones apropiadas en tampón de FACS en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces (añadiendo tampón de Facs a 4X el volumen de marcaje y centrifugando las células a 300Xg durante 5 minutos, decantando el sobrenadante para cada lavado), después se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS durante 20 minutos. Las células se centrifugaron a 300Xg durante 5 minutos y se resuspendieron en 200 µl de tampón de FACS por cada  $2 \times 10^5$  células y se almacenaron a 4 °C durante hasta 5 días. Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo (FACSAria, Becton Dickenson) y software FACS Diva.

### C. Resultados

Las células viables se seleccionaron usando representaciones de puntos de dispersión frontales y laterales. Después se analizaron las células viables con respecto a expresión de CD11b y CD11c, así como con respecto a los otros marcadores de superficie en la combinación de tinción. En un experimento, se observó unión de zB7R1-mFc2a en células CD11c en todos los puntos temporales. En el mismo experimento, la unión de zB7R1-mFc2a en células doble positivas para CD11b CD11c fue detectable solamente a las 48 y 72 horas. En otro experimento, se observó unión de zB7R1-mFc2a en células CD11c y células doble positivas para CD11c CD11b a las 48 y 72 horas. Las células positivas para CD11b pero negativas para CD11c no se unieron con zB7R1 significativamente más que las células teñidas con el reactivo de marcaje solamente o con una proteína de fusión de Fc irrelevante en todos los puntos temporales en ambos experimentos. Las células con un fenotipo de superficie CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+/-</sup> se unieron con zB7R1 con una fluorescencia media de 1952 canales frente a 660 para el control. La muestra bloqueada específicamente con exceso de zB7R1-mFc2a no marcado tuvo una fluorescencia de canal media de 781 en comparación con 1682 para la muestra no bloqueada específicamente con exceso de pB7H4L-mFc2a.

### D. Conclusión

El marcador de superficie CD11c se encuentra en la mayoría de células dendríticas y se usa para identificarlas en la mezcla de respuestas de células del bazo activadas y en reposo. La unión de zB7R1-mFc2a con la superficie de células dendríticas indica la presencia del ligando afín en la superficie de estas células. La unión aumenta en células dendríticas activadas. La interacción de zB7R1 en células dendríticas y zB7R1 en células T y posiblemente otros tipos celulares influye en la progresión de una respuesta inmunitaria.

### Ejemplo 8

#### **El ARNm de zB7R1 murino se regula en tejidos específicos en modelos murinos de enfermedad en comparación con controles no enfermos**

#### A. Procedimiento

Se obtuvieron tejidos a partir de los siguientes modelos de enfermedad murinos: Colitis, Asma, Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE), Psoriasis y Artritis Inducida por Colágeno (CIA). Los modelos animales se procesaron siguiendo procedimientos convencionales e incluyeron controles no enfermos apropiados. Se indujo colitis por dextran sulfato sódico (DSS) en el agua para beber y los tejidos aislados del modelo incluyeron colon distal, colon próximo y ganglios linfáticos mesentéricos. Se indujo asma por sensibilización y exposición intranasal al antígeno ovaalbúmina. Los tejidos aislados incluyeron pulmón, bazo y ganglio linfático. Se indujo EAE inmunizando con péptido MOG35-55 en adyuvante RIBI. Los tejidos aislados incluyeron cerebro, ganglio linfático y médula espinal. Se indujo psoriasis mediante transferencia adoptiva de células T sin tratamiento previo en ratones inmunocomprometidos singénicos o desapareados con histocompatibilidad menor. Los tejidos aislados incluyeron piel con lesión y piel adyacente. Se indujo CIA mediante inyecciones de colágeno y los tejidos aislados incluyeron pie y ganglio linfático. Se aisló ARN de todos los tejidos usando procedimientos convencionales. Brevemente, los tejidos se recogieron y se congelaron inmediatamente en N2 líquido y después se transfirieron a -80 °C hasta su procesamiento. Para el procesamiento, los tejidos se colocaron en reactivo Qiazol (Qiagen, Valencia, CA) y se aisló ARN usando el kit Qiagen Rneasy según las recomendaciones del fabricante. La expresión de ARNm de zB7R1 murino se midió con método de RT-PCR cuantitativa en tiempo real múltiple (TaqMan) y el sistema de detección de secuencia de ABI PRISM 7900 (PE Applied Biosystems). Los niveles de ARNm de zB7R1 se normalizaron con respecto a la expresión del ARNm de hipoxantina guanina fosforribosil transferasa murina y se determinaron por el método de ciclo de umbral comparativo (User Bulletin 2; PE Applied Biosystems). Los cebadores y sonda para zB7R1 murino incluían un cebador directo 5' (SEQ ID NO: 47), cebador inverso 5' (SEQ ID NO: 48) y una sonda (SEQ ID NO: 49).

#### B. Resultados

Se detectó expresión de ARNm de zB7R1 murino en todos los tejidos ensayados. Se observaron los mayores niveles de expresión en los tejidos de ganglio linfático y bazo. Se encontraron niveles menores de expresión en tejidos de piel, colon, pulmón, cerebro, pie y médula espinal.

El ARNm de zB7R1 murino aumentó en tejidos de un modelo crónico de colitis de DSS en comparación con tejidos de controles no enfermos. Zb7r1 aumentó 1,65 veces en el LN, 3,2 veces en el colon distal y 2,6 veces en el colon proximal en comparación con controles no enfermos.

El ARNm de zB7R1 aumentó en tejidos del modelo murino de asma en comparación con tejidos de controles no enfermos. Zb7r1 aumentó 5,4 veces en pulmón, 1,4 veces en bazo y 1,7 veces en ganglios linfáticos.

El ARNm de Zb7r1 aumentó en tejidos del modelo de EAE en comparación con tejidos de controles no enfermos. El ARNm de Zb7r1 aumentó 16,87 veces en el cerebro de animales desde la aparición temprana de enfermedad y 5,63

veces en animales con puntuaciones de enfermedad grave. El ARNm de Zb7r1 aumentó 4,15 veces en la médula espinal de animales de la aparición temprana de enfermedad y 6,93 veces en animales con puntuaciones de enfermedad grave.

- 5 El ARNm de zB7R1 aumentó en tejidos cutáneos del modelo de psoriasis en comparación con tejidos cutáneos de controles no enfermos. El ARNm de Zb7r1 aumentó 2,24 veces en una lesión cutánea y 3,07 veces en tejido cutáneo adyacente a la lesión psoriásica.

- 10 El ARNm de zB7R1 aumentó en tejido de pie completo de ratones en el modelo de CIA de artritis en comparación con tejido de pie de controles no enfermos. El ARNm de Zb7r1 aumentó 2,31 veces en animales puntuados con enfermedad leve y 3,4 veces en animales con enfermedad grave.

### Ejemplo 9

#### 15 Clonación y Construcción de vector de expresión de VASP

- 20 Se describe fosfoproteína activada por vasodilatador (VASP) humana en Kühnel, *et al.*, (2004) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 101: 17027. Se proporcionan secuencias de nucleótidos y aminoácidos de VASP como SEQ ID NO: 13 y 14. Se sintetizaron dos oligonucleótidos solapantes, que codificaban cadenas tanto con sentido como antisentido del dominio de tetramerización de proteína VASP humana, mediante síntesis de fase sólida usando el oligonucleótido zc50629 (SEQ ID NO: 50) y el oligonucleótido ZC 50630 (SEQ ID NO: 51). Estos oligonucleótidos se hibridaron a 55 °C, y se amplificaron mediante PCR con los cebadores oligonucleotídicos zc50955 (SEQ ID NO: 52) y zc50956 (SEQ ID NO: 53).

- 25 El ADN amplificado se fraccionó en gel de agarosa 1,5 % y después se aisló usando un kit de aislamiento en gel Qiagen según el protocolo del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). El ADN aislado se insertó en vector pzmp21 escindido con *BglII* mediante recombinación de levadura. La secuenciación de ADN confirmó la secuencia esperada del vector, que se designó pzmp21VASP-His<sub>6</sub>.

- 30 El dominio extracelular de zB7R1 humano se generó mediante digestión con enzimas de restricción de zB7R1mFc2 humano (SEQ ID NO: 61). Se realizó una digestión doble con *EcoRI* y *BglIII* (Roche Indianápolis, IN) para obtener el dominio extracelular. El fragmento se fraccionó en gel de agarosa al 2 % (Invitrogen Carlsbad, CA) y después se aisló usando un kit de aislamiento en gel Qiagen según el protocolo del fabricante (Qiagen Valencia CA). El fragmento aislado se insertó en vector pZMP21VASP-His<sub>6</sub> escindido con *EcoRI/BglIII* mediante ligamiento (Fast Link Ligase EPICENTER Madison, WI). La construcción se designó hzB7R1VASPpZMP21 (SEQ ID NO: 62).

- 40 El dominio extracelular de zB7R1 de ratón se generó por digestión con enzimas de restricción de zB7R1mFc2 de ratón SEQ ID NO: 63. Se realizó una digestión doble con *EcoRI* y *BglIII* (Roche Indianápolis, IN) para obtener el dominio extracelular. El fragmento se fraccionó en gel de agarosa al 2 % (Invitrogen Carlsbad, CA) y después se aisló usando un kit de aislamiento en gel Qiagen según el protocolo del fabricante (Qiagen Valencia CA). El fragmento aislado se insertó en vector pZMP21VASP-His<sub>6</sub> escindido por *EcoRI/BglIII* mediante ligamiento (Fast Link Ligase EPICENTER Madison, WI). La construcción se designó mzB7R1VASPpZMP21 SEQ ID NO: 64.

- 45 Estos vectores incluyen la secuencia codificante para el dominio extracelular de zB7R1 (incluyendo la secuencia señal nativa) que comprende los aminoácidos 1 a 140 del gen de longitud completa (aminoácidos 1-140 de SEQ ID NO: 2), el enlazador flexible GSGG (SEQ ID NO: 27), el dominio de tetramerización VASP (aminoácidos 5 a 38 de SEQ ID NO: 54), el enlazador flexible GSGG (SEQ ID NO: 27) y los restos de aminoácidos del marcador de His<sub>6</sub> (aminoácidos 43 a 48 de SEQ ID NO: 54).

### 50 Ejemplo 10

#### Expresión y purificación de B7R1VASP-HIS<sub>6</sub>

- 55 El vector pzmp21B7R1VASP-His<sub>6</sub> se transfectó en células BHK570 usando Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los cultivos se seleccionaron para resistencia de transfectantes a metotrexato 10 µM. Se transfirieron colonias resistentes a placas de cultivo tisular, se expandieron y se analizaron con respecto a secreción de B7R1VASP-His<sub>6</sub> mediante análisis de transferencia de western con anticuerpo anti His (C terminal) (Invitrogen, Carlsbad, CA). La línea celular resultante, BHK.B7R1VASP-His<sub>6</sub>.2, se expandió.

#### 60 A. Purificación de B7R1VASP-His<sub>6</sub> de células BHK

- 65 La purificación se realizó a 4 °C. Se concentraron aproximadamente 2 l de medio acondicionado de BHK: B7R1VASP-His<sub>6</sub>.2 hasta 0,2 l usando filtros de 5 k Pellicon-2 (Millipore, Bedford, MA), después se intercambió el tampón diez veces con NaPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 15 mM, pH 7,5. La muestra final de 0,2 l se pasó a través de un filtro de 0,2 µm (Millipore, Bedford, MA).

Se empaquetó una columna Talon (BD Biosciences, San Diego, CA) con un volumen de lecho de 20 ml y se equilibró con NaPi 20 mM, Imidazol 15 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. El medio se cargó en la columna a un caudal de 0,2-0,4 ml/min, después se lavó con 5-6 VC del tampón de equilibrado. Se eluyó B7R1VASP-His<sub>6</sub> de la columna con NaPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 0,5 M, pH 7,5 a un caudal de 4 ml/min. Se recogieron fracciones de 10 ml y se analizaron con respecto a la presencia de B7R1VASP-His<sub>6</sub> mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie.

Un grupo combinado de eluatos de Talon obtenidos de tres procesamientos idénticos como se ha descrito anteriormente se concentró de 60 ml a 3 ml usando un filtro de centrifuga 5 k Amicon Ultra (Millipore, Bedford, MA). Se equilibró una columna Superdex 200 con un volumen de lecho de 318 ml con NaPi 50 mM, NaCl 110 mM, pH 7,3 y se inyectó la muestra de 3 ml en la columna a un caudal de 0,5 ml/min. Se observaron dos picos de absorbancia a 280 nm eluyendo desde la columna, uno a 0,38 VC y el otro a 0,44 VC. Las fracciones que eluían aproximadamente 0,44 VC, que se creía que contenían B7R1VASP-His<sub>6</sub> tetramérico se agruparon y concentraron, se esterilizaron por filtración a través de un filtro de Acrodisc de 0,2 mm (Pall Corporation, East Hills, NY) y se almacenaron a -80 °C. La concentración de la muestra final se determinó mediante BCA (Pierce, Rockford, IL).

#### B. Análisis por SEC-MALS de B7R1VASP-CH<sub>6</sub>

El fin de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es separar moléculas basándose en el tamaño para la estimación del peso molecular ( $P_M$ ). Si se añade detección por dispersión de la luz estática a un sistema de SEC, pueden realizarse mediciones absolutas de peso molecular. Esto es posible porque la intensidad de la luz dispersada por el analito es directamente proporcional a su masa y concentración, y es completamente independiente de la posición de elución de SEC, conformación o interacción con la matriz de columna. Adicionalmente, combinando SEC, dispersión de la luz de láser multiángulo (MALS) y detección de índice refractario (IR), la masa molecular, estado de asociación y grado de glucosilación pueden determinarse. El límite de precisión de estas mediciones para una muestra que es monodispersa con respecto a  $P_M$  es  $\pm 2$  %.

#### Ejemplo 11

##### CD155 se une con zB7R1 soluble

Se produjo una forma soluble de zB7R1 bien como una fusión en fase con una región Fc de ratón o bien con el dominio de tetramerización de la proteína Vasp (ambos de los cuales se describen en el presente documento). Estas proteínas se marcaron con biotina o se conjugaron con un fluorocromo para su uso como un reactivo de FACS o para microscopía de fluorescencia. Estos reactivos se usaron para consultar diversos tipos celulares primarios de médula ósea y bazo de ratón con respecto a unión. Se descubrió que las células dendríticas (CD) de médula ósea cultivadas durante siete días en el ligando de Flt-3 (Flt3L) y activadas después con el ligando de CD40 (CD40L) e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) se unían con formas conjugadas con fluorocromo o biotiniladas de ambas proteínas de zB7R1. Se produjo una biblioteca de expresión a partir de esta población de CD activadas y esta biblioteca se introdujo en células COS mediante transfección transitoria. Después se cribaron grupos transfectados de células con respecto a unión con zB7R1 usando la proteína Vasp-zB7r1 biotinilada y microscopía de fluorescencia. Los grupos positivos se degradaron sistemáticamente hasta que se recuperó un único plásmido que proporcionaba actividad de unión. La secuenciación de ácidos nucleicos reveló que este plásmido codificaba el homólogo de ratón del receptor de poliovirus humano (PVR), CD155 (SEQ ID NO: 17 y 18). CD155 se une con células transfectadas con zB7R1 y, por lo tanto, es un contrarreceptor que se sabe ahora que se une con zB7R1.

#### Ejemplo 12

##### Expresión de VASP-zB7R1 para el ensayo de trampas de secreción

Se digirieron tres conjuntos de 50  $\mu$ g de la construcción de proteína de fusión mzB7R1/Vasp cada uno digerido con 50 unidades de Pvu I a 37 °C durante tres horas y después se precipitaron con IPA y se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se retiró por decantación del sedimento, y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70 % y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a 14.000 RPM y el sobrenadante se retiró por decantación de sedimento. El sedimento se resuspendió después en 750  $\mu$ l de medio PF-CHO en un ambiente estéril, se dejó incubar a 60 °C durante 30 minutos, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las células 5E6 APFDXB11 se centrifugaron en cada uno de tres tubos y se resuspendieron usando la solución de medio-ADN. Las mezclas de ADN/células se colocaron en una cubeta de hueco de 0,4 cm y se sometieron a electroporación usando los siguientes parámetros: 950  $\mu$ F, alta capacitación y 300 V. Después los contenidos de las cubetas se retiraron, se agruparon y se diluyeron hasta 25 ml con medio PF-CHO y se colocaron en un matraz de agitación de 125 ml. El matraz se colocó en un incubador en un agitador a 37 °C, CO<sub>2</sub> 6 % y agitación a 120 RPM.

La línea celular se sometió a selección de nutrientes seguido de amplificación por etapas hasta metotrexato (MTX) 200 nM, y después hasta MTX 500 nM. La expresión se confirmó por transferencia de Western, y la línea celular se aumentó de escala y se siguió de purificación de proteínas.

**Ejemplo 13**

**Uso de proteína de fusión de VASP-zB7R1 para cribar para ligandos**

5 Se preparó proteína de fusión zB7R1VASP como se ha descrito en el Ejemplo 12 anterior. Esta proteína se usó después para cribar con respecto a su ligando correspondiente como se describe posteriormente.

A) Cribado de la biblioteca de mBMDC:

10 Se usó un ensayo de trampa de secreción para emparejar mzB7R1 con mCD155 (SEQ ID NO: 18). La proteína de fusión mzB7R1/Vasp que se había biotinilado se usó como reactivo de unión en un ensayo de trampa de secreción. Se transfectó de forma transitoria una biblioteca de ADNc de pZP-7NX de médula ósea de ratón (mBMDC) estimulada en células COS en grupos de 800 clones. La unión de mzB7R1/Vasp-biotina con células COS transfectadas se llevó a cabo usando el ensayo de trampa de secreción descrito posteriormente. Se vio unión  
15 positiva en 26 de 72 grupos explorados. Uno de estos grupos se seleccionó y se sometió a electroporación en DR10B. Se seleccionaron 400 colonias individuales en 1,2 ml de LB + ampicilina 100 µg/ml en bloques de 96 pocillos de pocillos profundos, cultivadas durante una noche seguido de aislamiento de ADN de cada placa. Después de la transfección y sonda de trampa de secreción, se identificó un único pocillo positivo a partir de esta descomposición y se envió a secuenciar y se identificó como mCD155. Este ADNc purificado se transfectó y exploró  
20 con mB7R1/Vasp-biotina junto con controles adicionales para verificar que mCD155 se unía de forma específica y reproducible con mB7R1/Vasp-biotina pero no con otras quimeras de vasp.

B) Transfecciones de células COS

25 La transfección de células COS se realizó de la siguiente manera: mezclar 1 µg de ADN agrupado en 25 µl de medio DMEM sin suero (500 ml de DMEM con 5 ml de aminoácidos no esenciales) y 1 µl de Cosfectin™ en 25 µl de medio DMEM sin suero. El ADN diluido y cosfectin se combinaron después seguido de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Añadir esta mezcla de 50 µl a  $8,5 \times 10^5$  células COS/pocillo que se habían sembrado el día anterior en placas de cultivo tisular de 12 pocillos e incubar durante una noche a 37 °C.

30 C) Ensayo de trampa de secreción

La trampa de secreción se realizó de la siguiente manera: se aspiró medio de los pocillos y después las células se fijaron durante 15 minutos con formaldehído 1,8 % en PBS. Las células se lavaron después con TNT (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y Tween-20 0,05 % en H<sub>2</sub>O), y se permeabilizaron con Triton-X 0,1 % en PBS durante 15 minutos y se lavaron de nuevo con TNT. Las células se bloquearon durante 1 hora con TNB (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y Reactivo de Bloqueo 0,5 % (Kit NEN Renaissance TSA-Direct) en H<sub>2</sub>O) y se lavó de nuevo con TNT. Las células se incubaron durante 1 hora con proteína de fusión de receptor soluble mzB7R1/Vasp-biotina 2 µg/ml. Las células se lavaron después con TNT. Las células se fijaron una segunda vez durante 15 minutos con formaldehído 1,8 % en PBS. Después de lavar con TNT, las células se incubaron durante otra hora con estreptavidina HRP diluida 1:1000. De nuevo las células se lavaron con TNT.

45 Se detectó unión positiva con reactivo de fluoresceína tiramida diluido 1:50 en tampón de dilución (kit NEN) y se incubó durante 5 minutos, y se lavó con TNT. Las células se conservaron con medio de montaje Vectashield (Vector Labs Burlingame, CA) diluido 1:5 en TNT. Las células se visualizaron usando un filtro de FITC en microscopio de fluorescencia.

**Ejemplo 14**

50 **Actividad biológica de la proteína de fusión VASP-zB7R1**

Se aislaron células T de sangre periférica mediante selección negativa (Mitenyi Biotec, Auburn, CA). Se sembraron células T en cada pocillo de una placa de 96 pocillos que se había prerrecubierto con anti CD3 (BD Bioscience, San Diego, CA). Se añadieron anti CD28 (BD Bioscience, San Diego, CA) y una concentración creciente de zB7R1/VASP a pocillos apropiados. Los cultivos se incuban a 37 °C durante 4 días y después se marcan durante una noche con 1 Ci de [<sup>3</sup>H] timidina por pocillo. Se mide la proliferación como [<sup>3</sup>H] timidina incorporada, y se cuantifica el contenido de citocina en cultivo usando Luminex (Austen, TX). zB7R1/VASP inhibe potentemente tanto la proliferación de células T como la liberación de citocinas (Dong *et al.*, Nature Med. 5: 1365-1369, 1999).

60 **Ejemplo 15**

**Anticuerpos monoclonales de zB7R1**

65 Se inmunizaron ratones BALB/c con ADN que codificaba el dominio extracelular de zB7R1 humano (SEQ ID NO: 3) expresado como una proteína de membrana. Se proporcionó a ratones con títulos de suero positivos para zB7R1 humano expresado celular un refuerzo de prefusión de proteína de fusión zB7R1-Fc soluble.

Se recogieron esplenocitos de un ratón de alta titulación y se fusionaron con células de mieloma P3-X63-Ag8/ATCC (ratón) en un protocolo de fusión mediado por PEG optimizado (Rockland Immunochemicals). Después de 9 días de cultivo postfusión, se identificaron grupos de hibridoma productores de anticuerpos específicos mediante ELISA usando 500 ng/ml de cada uno de la proteína de fusión recombinante purificada zB7R1-mFc2 como la diana de anticuerpo específica y una proteína de fusión pTACI mFc2 como una diana de anticuerpo no específica. Para comprobar la reactividad cruzada, las muestras también se comprobaron frente a zB7R1 de ratón. Los grupos de hibridoma positivos para la diana de anticuerpo específica solamente se analizaron adicionalmente con respecto a capacidad para unirse mediante análisis de FACS con células p815/zB7R1 como diana de anticuerpo.

Los grupos de hibridoma que producían un resultado positivo específico en el ensayo de ELISA y resultados positivos en el ensayo de FACS se clonaron al menos dos veces por dilución limitante.

Los siguientes cinco clones se recogieron y purificaron para su uso en ensayos: 318.4.1.1, 318.28.2.1, 318.39.1.1, 318.59.3.1, 318.77.1.10.

### Ejemplo 16

#### Bioensayos para la detección de anticuerpos de señalización anti zB7R1

En un intento de desarrollar un ensayo que pudiera usarse para detectar y evaluar anticuerpos de señalización, se construyó una línea celular indicadora de Baf3-STAT-luciferasa que expresaba una quimera del dominio extracelular de la molécula de interés (es decir zB7R1), y los dominios transmembrana e intracelular de GCSFR de ratón. Los anticuerpos contra la molécula de interés pueden mediar en la dimerización de su molécula diana en la superficie celular, lo que conduce a su vez a la dimerización de los dominios intracelulares de mGCSFR y fosforilación posterior de moléculas de señalización STAT. Estos STAT fosforilados migran después al núcleo en el que se unen con elementos sensibles a STAT localizados en una construcción de potenciador/promotor/ADNc recombinante. Esta unión da como resultado la transcripción y síntesis de una proteína de luciferasa que puede medirse de forma cuantitativa utilizando un ensayo sencillo.

La línea celular de ensayo se construyó colocando un vector de expresión (pZMP21Z) que contenía la quimera zB7R1/mGCSFR humana, en una línea celular BaF3/KZ134 previamente utilizada. Este vector de expresión y línea celular posterior se construyeron usando las siguientes etapas.

#### Generación de productos de PCR de dominio extracelular de zB7R1 humano y dominio transmembrana e intracelular de GCSFR de ratón

Se creó un fragmento de ADN de dominio extracelular de B7r1 humano de 465 pb mediante PCR usando reactivos Expand (Roche, Applied Sciences, Indianápolis, IN) y ZC53051 (SEQ ID NO: 55) y ZC54199 (SEQ ID NO: 56). Estos cebadores de amplificación de zB7R1 añadieron regiones complementarias a mGCSFR y el vector pZMP21 que permitían PCR solapante y recombinación de levadura respectivamente.

Se creó un fragmento de ADN de GCSFR de ratón de dominio intracelular y transmembrana de 1562 pb mediante PCR usando reactivos Expand (Roche, Applied Sciences, Indianápolis, IN) y ZC54198 (SEQ ID NO: 57) y ZC53248 (SEQ ID NO: 58). Estos cebadores de amplificación de mGCSFR añadieron regiones complementarias a hB7R1 y el vector pZMP21 que permitían PCR solapante y recombinación de levaduras respectivamente.

#### Generación de producto de PCR solapante de zB7R1-m.GCSFR humano para uso en recombinación de levadura

Se usaron como moldes plásmidos que contenían los ADNc de zB7r1 y GCSFR de ratón. Se realizó amplificación por PCR de los fragmentos de zB7r1 y GCSFR de ratón de la siguiente manera: un ciclo de 95 °C durante 2 minutos; después treinta ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1,5 minutos, seguido de un ciclo de 72 °C durante 7 minutos y después un mantenimiento a 4 °C. Las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa 1,2 % y las bandas apropiadas se escindieron y purificaron usando kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen, Santa Clarita, Ca.)

Los productos de PCR purificados de zB7R1 y GCSFR de ratón se usaron como moldes en una reacción de PCR solapante para crear un producto de B7r1-m.GCSFR quimérico de 1995 pb. Se usaron reactivos Expand (Roche, Applied Sciences, Indianápolis, IN), y ZC53051 (SEQ ID NO: 59) y ZC53248 (SEQ ID NO: 60) como cebadores de PCR.

La amplificación por PCR del fragmento de B7r1-GCSFR de ratón se realizó de la siguiente manera: un ciclo de 95 °C durante 2 minutos; después 30 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1,5 minutos, seguido de un ciclo de 72 °C durante 7 minutos y un mantenimiento a 4 °C. La reacción se visualizó en un gel de agarosa 1,2 % y la banda apropiada se escindió y purificó usando kit de Extracción en Gel QIAquick (Qiagen, Santa Clarita, Ca.).

Recombinación de levadura de producto de PCR purificado de zB7R1 humano-m.GCSFr en pZMP21Z

Se descongelaron en hielo células de levadura competentes de la cepa SF838-9D. Se mezcló un  $\mu$ l de vector pZMP21Z digerido con BglII mediante métodos de digestión de restricción convencionales con 6  $\mu$ l de producto de PCR purificado h.zB7r1-m.GCSFR o 6  $\mu$ l de tampón TE como un control negativo. La mezcla de ADN se añadió a 45  $\mu$ l de células de levadura, se mezcló y se transfirió a dos cámaras de electroporación desechables de 2 mm (VWR, West Chester, PA). Las células se sometieron a electroporación usando un Biorad Genepulser™ (Herpes, CA) ajustado a 750 V, 25  $\mu$ FD, resistencia infinita. Se añadieron inmediatamente 600  $\mu$ l de sorbitol 1,2 M frío a cada cámara. Se sembraron 150  $\mu$ l y 300  $\mu$ l de cada cámara en placas de agar-URA DS y se incubaron durante 72 horas a 30 °C. Se suspendieron colonias de levadura de cada placa en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación y se retiró el sobrenadante. Se transfirió una cantidad equivalente a 50  $\mu$ l de levadura empaquetada de cada muestra a otro tubo eppendorf de 1,5 ml y se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón de lisis de levadura (Triton X 25, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). A cada tubo se añadieron 2  $\mu$ l (10 U) de zimolasa (Zymo Research, Cat n.º E1001/E1002) seguido de una incubación de 30 minutos a 37 °C. Las células lisadas se procesaron en minipreps añadiendo 150  $\mu$ s de tampón P1 (Qiagen) y después continuando con el Kit de Miniprep de Centrifugación QIAprep en la etapa 2. El ADN plasmídico purificado de este modo de levadura se introdujo por electroporación en células DH10b Electormax (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los clones se aislaron, se secuenciaron y se preformaron aislamientos de plásmidos a gran escala usando métodos convencionales.

Construcción de células BaF3/KZ134 que expresan zB7R1 humano-GCSFr de ratón quimérico

BaF3, una línea celular prelinfoide dependiente de interleucina-3 (IL-3) derivada de médula ósea murina (Palacios y Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6.: 4133-4135, 1986), se mantuvo en medio completo (medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) complementado con suero de ternero fetal inactivado por calor 10 %, IL-3 murina (mIL-3) 2 ng/ml (R + D, Mineápolis, MN), L-glutamina 2 mM (Gibco-BRL) y Piruvato Sódico 1 mM (Gibco-BRL).

El plásmido KZ134 se construyó con oligonucleótidos complementarios que contenían elementos de unión a factor de transcripción STAT de 4 genes, que incluyen un elemento inducible por Sis c-fos modificado (m67SIE o hSIE) (Sadowski, H. *et al.*, Science 261: 1739-1744, 1993), el p21 SIE1 del gen p21 WAF1 (Chin, Y. *et al.*, Science 272: 719-722, 1996), el elemento de respuesta de la glándula mamaria del gen -caseína (Schmitt-Ney, M. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11: 3745 - 3755, 1991), y un elemento inducible por STAT del gen de Fc $\gamma$  RI, (Seidel, H. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 92: 3041 -3045, 1995). Estos oligonucleótidos contienen extremos compatibles con Asp718-XhoI y se ligaron, usando métodos convencionales, en un vector indicador de luciferasa de luciérnaga receptor con un promotor c-fos (Poulsen, L. K. *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998) digerido con las mismas enzimas y que contenía un marcador seleccionable de neomicina. El plásmido KZ134 se usó para transfectar de forma estable células BaF3, usando métodos de transfección y selección convencionales, para preparar la línea celular BaF3/KZ134.

Se prepararon células BaF3/KZ134 para electroporación lavando dos veces en medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) y después resuspendiendo en RPMI a una densidad celular de 10<sup>7</sup> células/ml. Se mezcló un ml de células BaF3 resuspendidas con 30  $\mu$ g del ADN del plásmido pZPMPZ/h.zB7r1-m.GCSFr y se transfirieron a cámaras de electroporación desechables separadas (Gibco-BRL). Después se dieron a las células dos choques en serie (800 1 Fad/300 V, 1180 1 Fad/300 V) suministrados por un aparato de electroporación (CELL-PORATOR™, Gibco-BRL, Bethesda, MD). Las células electroporadas se transfirieron posteriormente a 20 ml de medio completo que contenía Puromicina 2  $\mu$ g/ml (Clontech, PaloAlto, CA) y se colocaron en un incubador durante 24 horas (37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 20 ml de medio completo que contenía Puromicina  $\mu$ g/ml y selección de Zeocina 240 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un matraz T75 para aislar el grupo resistente a Zeocina. La línea celular estable resultante se denominó BaF3/KZ134/h.zB7r1-m.GCSFr.

Los anticuerpos de HzB7R1 activan específicamente señalización de STAT en células BaF3/KZ134/h.B7r1-m.GCSFr

Los anticuerpos ensayados en las células BaF3/KZ134/h.B7r1-m.GCSFr fueron: anticuerpos de ratón anti zB7r1 humano 318.4.1.1 (E9310), 318.28.2.1 (E9296), 318.39.1.1 (E9311), 318.59. 3.1 (E9400). Estos anticuerpos se acoplaron a Dynabeads M-450 Tosilactivadas, (DynaL Biotech ASA, Oslo, Noruega) de la siguiente manera: se lavaron 50  $\mu$ l (2x10<sup>7</sup> perlas) por muestra una vez con 1 ml de tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4-8,0 en un tubo eppendorf de 2,0 ml. El tubo se colocó en un imán durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante. Las perlas se resuspendieron en el volumen original usando el tampón de fosfato sódico. Se combinaron 10  $\mu$ g de cada anticuerpo con 50  $\mu$ l de perlas lavadas en tubos eppendorf de 2,0 ml. Se incluyó un control solamente con perlas (sin anticuerpo). Los tubos se colocaron en un mezclador Clay Adams Nutator (Bectin-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a temperatura ambiente durante 48 horas. Los tubos se colocaron después en un imán durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante. Las perlas recubiertas se lavaron después 4 veces con 1 ml de PBS (sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>), BSA 0,1 % (p/v) y EDTA 2 mM, pH 7,4.

Al preparar el ensayo celular, las perlas recubiertas y un control solamente con perlas se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en U Falcon (Bectin-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a concentraciones de 480.000, 240.000,

120.000, 60.000, 30.000, 15.000 y 7500 por pocillo en 100  $\mu$ l. También se sembró anticuerpo no unido a concentraciones de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,6 y 0,3  $\mu$ g/ml en 100  $\mu$ l. Cada muestra se sembró en placas por triplicado. Como un control positivo para señalización de STAT, se incluyeron diluciones de IL3 de ratón a concentraciones de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,6 y 0,3 pg/ml en 100  $\mu$ l.

5 Las células resistentes a zeocina BaF3/KZ134/h.B7r1-m.GCSFr se lavaron tres veces en RPMI y se contaron usando un hemocitómetro. Las células se resuspendieron en RPMI y se sembraron a una concentración de 30.000 células por pocillo en 100  $\mu$ l en la placa que contenía las muestras para un volumen de pocillo total de 200  $\mu$ l.

10 El ensayo se incubó a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 % durante 24 horas momento en el cual las células BaF3 se sedimentaron por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, el medio se aspiró y se añadieron 25  $\mu$ l de tampón de lisis (Promega). Después de dejar 10 minutos para lisis celular a temperatura ambiente, las placas se midieron con respecto a activación de la construcción indicadora de STAT leyéndolas en un luminómetro (EG&G Berthold, modelo Microumat Plus LB 96V) que añadió 40  $\mu$ l de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) y midió la luz generada en los 10 segundos después de la adición de sustrato.

15 Los resultados de este ensayo mostraron que el complejo de anticuerpo de B7r1-perla se unía al B7r1-m.GCSFr de una manera dependiente de dosis y provocaba dimerización que conducía a la formación de STAT y transducción de señales. Ni los anticuerpos unidos ni las perlas no decoradas indujeron una respuesta de STAT.

20 En este ejemplo, el dominio extracelular de una proteína de familia B7 de tipo I (B7r1) y el dominio transmembrana e intracelular de una proteína de superfamilia del receptor de citocinas de tipo I (GCSFR) se expresaron como una quimera e indujeron dimerización y señalización de STAT cuando se expusieron al anticuerpo. Este método también puede usarse con quimeras de otras familias de receptores. Los ejemplos de quimeras que utilizan GCSFr de ratón para señalización han incluido los dominios de unión al ligando extracelular de CD28, zTNFR14 y Fas, entre otros. Pueden usarse variaciones en este método con quimeras de otras familias de receptores emparejadas con ensayos de línea celular sensibles a rutas de señalización apropiadas. Los ejemplos pueden incluir quimeras que señalizan a través de la ruta de NFkB. Estas quimeras pueden expresarse en células NIH3T3 que también expresan un promotor sensible a NFkB fusionado con un plásmido de ADNc de luciferasa tal como KZ142. Estas quimeras pueden construirse con el dominio transmembrana e intracelular de una molécula de la familia TNF tal como pTNFRSF4, que se sabe que señala a través de NFkB, y podrían incluir el dominio extracelular de moléculas tales como B7r1, CD28, TNFR14 y Fas, entre otras.

35 Ensayos *in vitro* adicionales que utilicen receptores quiméricos serán útiles en la examinación de las propiedades de señalización del dominio intracelular de zB7R1 y en la identificación de anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular que media en la señalización. El tipo de señal celular que el dominio intracelular de zB7R1 genera en respuesta a unión a ligando puede dilucidarse de la siguiente manera. El dominio extracelular de hCD28, un miembro de la familia B7, se fusiona con los dominios transmembrana e intracelular de zB7R1 murino. Esta quimera se transfecta después a la línea celular de hibridoma de células T murina, Tea. Esta línea celular murina responde a ligamiento del receptor de células T (TCR) secretando IL2. Se ha mostrado que algunos miembros de la familia B7 modifican la magnitud de la respuesta de células T; por ejemplo, el ligamiento simultáneo de CD28 junto con CD3 (TCR) produce un aumento significativo de la secreción de IL2 frente al ligamiento de CD3 solamente. Utilizando esta quimera, anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de CD28 humano pueden mediar en el ligamiento del dominio intracelular de mzB7R1 y señalización posterior. Los niveles de IL2 se pueden cuantificar mediante ensayos de coestimulación de CD3/CD28 *in vitro* de ELISA que revelan la naturaleza del dominio de señalización hzB7R1.

45 Adicionalmente, los dominios extracelulares de zB7R1 humanos pueden fusionarse con dominios intracelulares de mCD28 en hibridomas de TEa. Dichas quimeras permitirían el cribado de anticuerpos u otros ligandos dirigidos contra el dominio extracelular de zB7R1. Esta unión puede dar como resultado dimerización y señalización a través del dominio intracelular de mCD28 que probablemente aumentaría la secreción de IL2. Dicho el cribado con respecto a moléculas activas en el dominio extracelular de zB7R1 puede iniciarse por lo tanto antes de un entendimiento completo del mecanismo de señalización de zB7R1.

## 55 **Ejemplo 17**

### **Expresión de zB7R1 en PBMNC humanas**

60 Para cultivar las células, se separó sangre de donantes internos normales en un gradiente de ficol, y la interfaz de PBMNC se recogió y se lavó en PBS. Las células se contaron y se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a  $2 \times 10^5$  células/pocillo en 200  $\mu$ l de medio de cultivo con LPS a 100 ng/ml o con mab anti CD3 + anti CD28 (50 ng/ml y 1  $\mu$ g/ml respectivamente). Algunas células se reservaron para el punto temporal 0. Las células se recogieron para tinción en los tiempos 24, 48 y 72 horas.

65 En cada punto temporal, se centrifugaron células en placas de 96 pocillos, el medio se retiró por sacudidas y se añadió una combinación de anticuerpos conjugados con flúor para marcadores de linaje de superficie en 50  $\mu$ l de

tampón de tinción Facs (CD56-A488, CD19-PE, CD45RA-Cychrome, CD45RO-PE-Cy7, CD4-A405, CD8-A700 y CD14-A750). La combinación incluyó mab anti B7R1 (318.4.1) acoplado al colorante A647, o un mab de control acoplado de forma similar. En algunos experimentos, la unión de mab anti B7R1 compitió con exceso de 20 veces (g/g) de receptor mB7R1. Cada condición se tiñó en pocillos por triplicado. Las células se incubaron con un combo  
 5 de tinción durante 30 minutos en hielo, después se lavaron 1,5X con tampón de Facs y se fijaron con paraformaldehído 2 %, 100 µl/pocillo, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Las placas se centrifugaron, el paraformaldehído se retiró por sacudidas, y las células se resuspendieron en 200 µl de tampón de Facs y se almacenaron a 4 °C cubiertas en papel metálico hasta que se leyeron en el LSRII.

10 Los datos del LSRII se analizaron usando software FacsDiva. Se usaron representaciones de puntos FSC X SSC para determinar una selección de población celular viable. Las células viables se analizaron después con respecto a unión con anti B7R1 usando representaciones de puntos de anti B7R1-A647 frente a marcadores de linaje específicos.

15 Para el análisis cinético de la expresión de B7R1, se restó la fluorescencia de fondo (determinada con el mab-A647 de control o con bloqueo usando receptor soluble 20X g/g) de la tinción anti B7R1-A647 para cada linaje a lo largo del tiempo.

20 Los resultados indicaron que zB7R1 se expresa en células CD8+ y NK en reposo y que la expresión está regulada positivamente con activación en células CD4+, CD8+ y NK. No hay ninguna unión detectable en CD19+ y no hay ninguna unión con la que pueda competir con células CD14 + o CD11c. La expresión de zB7R1 era mayor en células T de memoria en relación con células T sin tratamiento previo.

### Ejemplo 18

25

#### **La proliferación de célula T está inhibida por anticuerpos de zB7R1**

La proliferación de células T CD4 y CD8 purificadas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se inhibió por el anticuerpo para zB7r1 *in vitro*. Un anticuerpo para CD3 (BD Biosciences 555329) imitó el reconocimiento de antígenos de células T. La interacción de CD3 y el receptor de células T por anticuerpo proporcionó una señal para proliferar *in vitro*. Esta señal se potenció o inhibió por señales adicionales. Un anticuerpo para zB7r1, acoplado covalentemente con perlas tosilactivadas 4.5 (Dyna1 140.13), inhibió la proliferación inducida por anti CD3 de células T *in vitro*. La adición de anti CD28 coestimulante (BD Biosciences 555725) no superó el efecto inhibitorio de anti zB7r1. Además, anti zB7r1 inhibió la expresión de los marcadores de activación tempranos CD69 y el receptor de IL-2 CD25 así como la producción de IL-2.

30 Se usaron perlas tosilactivadas como una plataforma de fase sólida para presentar anti CD3 y anti zB7r1 a células T. Se recogieron PBMC humanas de voluntarios sanos mediante gradiente de densidad de Ficoll-Paque (GE Healthcare). Se purificaron CD4 y CD8 a partir de PBMC mediante columnas de perlas magnéticas (Miltenyi Biotec).  
 40 Las células T se marcaron con CFSE (Invitrogen) para evaluar la proliferación por citometría de flujo. Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células T marcadas con CFSE y 1x10<sup>5</sup> perlas por pocillo. Los cultivos se mantuvieron durante 1 día para evaluar los marcadores de activación temprana o 3 días para evaluar la proliferación en incubadores humidificados a CO<sub>2</sub> 5 %. La proliferación de CD4 y CD8 se midió en un LSRII (Becton Dickinson).

45 Anti zB7r1 inhibió células T sin tratamiento previo y de memoria CD4 de forma equivalente. Específicamente, las células T CD4 se purificaron como antes y después se clasificaron en poblaciones CD45RA alto (sin tratamiento previo) y CD45RA bajo (de memoria) mediante clasificación celular en el FACSAria (BD Biosciences). Las células se cultivaron como anteriormente, y después se evaluaron con respecto a proliferación a las 72 h. Se valoró anti CD3 en combinación con cantidad fija de zB7r1, control o anti CTLA4. Se inhibieron células de memoria y sin tratamiento  
 50 previo CD4 en proliferación hasta un grado equivalente.

Anti zB7r1 inhibió la producción de IL-2 mediante CD4 de memoria y sin tratamiento previo. Específicamente, la producción de IL-2 de células CD4 de memoria y sin tratamiento previo activadas por CD3 se inhibe por anti zB7r1. Se cultivaron células T y perlas como anteriormente. La producción de IL-2 a las 24 h se evaluó en sobrenadantes de cultivo mediante tecnología Luminex (Bio-Rad).

### Ejemplo 19

#### **ZB7R1-VASP en enfermedad de injerto contra hospedador aguda (GVHD)**

60 El fin de este experimento fue determinar si el tratamiento profiláctico de proteína soluble de B7R1-VASP influye en el desarrollo y gravedad de una respuesta de GVHD aguda en ratones.

65 Para iniciar GVHD, se inyectan 75 millones de células del bazo de ratones C57B1/6 por suministro intravenoso en ratones DBA2 X C57B1/6 F1 (BDF1) el día 0. Los ratones se tratan con 150 µg de proteína B7R1-VASP por vía intraperitoneal cada dos días comenzando el día antes de la transferencia celular y continuando durante toda la

duración del experimento. El peso corporal se supervisa diariamente y los ratones se sacrifican el día 12 después de la transferencia del bazo. Se recogen los bazos para análisis de FACS y se recoge sangre para suero.

5 El suministro profiláctico de B7R1-VASP reduce significativamente la gravedad de la pérdida de peso corporal durante GVHD aguda.

**Ejemplo 20**

**Hipersensibilidad de tipo retardado en ratones tratados con zB7R1-Fc**

10 La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) es una medida de respuestas de células T al antígeno específico. En esta respuesta, los ratones se inmunizan con una proteína específica en adyuvante (por ejemplo, ovoalbúmina de pollo, OVA) y después se exponen posteriormente al mismo antígeno (sin adyuvante) en el oído. El aumento en el grosor del oído (medido con calibradores) después de la exposición es una medida de la respuesta inmunitaria  
 15 específica al antígeno. DTH es una forma de inmunidad mediada por células que sucede en tres fases distintas: 1) la fase cognitiva, en la que células T reconocen antígenos proteicos ajenos presentados en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC), 2) la fase de activación/sensibilización, en la que células T secretan citocinas (especialmente interferón gamma; IFN- $\gamma$ ) y proliferan y 3) la fase efectora, que incluye tanto inflamación (incluyendo infiltración de macrófagos y neutrófilos activados) como la resolución en última instancia de la infección. Esta  
 20 reacción es el mecanismo de defensa primario contra bacterias intracelulares, y puede inducirse por antígenos proteicos solubles o haptenos químicamente reactivos. Se produce una respuesta de DTH clásica en individuos expuestos a derivado proteico purificado (PPD) de *Mycobacterium tuberculosis*, cuando esos individuos inyectados se han recuperado de TB primaria o se han vacunado contra TB. La induración, la evidencia de DTH, es detectable aproximadamente a las 18 horas después de la inyección del antígeno y es máxima a las 24-72 horas. El retardo en la aparición de induración palpable es la razón para denominar la respuesta “de tipo retardado”. En todas las  
 25 especies, las reacciones de DTH son críticamente dependientes de la presencia de células T CD4+ (y, en menor grado, CD8+), sensibilizadas al antígeno, que producen la citocina iniciadora principal implicada en DTH, IFN  $\gamma$ .

30 Para ensayar con respecto a efectos antiinflamatorios de mB7R1-Fc, se realizó un experimento de DTH con seis grupos de ratones C57B1/6 tratados con: I) plásmido de control, II) 25  $\mu$ g de plásmido mCTLA-4-Fc y III) 25  $\mu$ g de plásmido mB7R1-Fc. Todos estos plásmidos se inyectaron hidrodinámicamente a través de la vena de la cola. Brevemente, se resuspendieron 25  $\mu$ g del plásmido en 2 ml de solución salina inyectable estéril. Cada ratón recibió una única inyección intravenosa de 2 ml de solución salina que contenía 25  $\mu$ g de plásmido a través de su vena de la cola. Se consiguieron inyecciones en un periodo de 4-8 segundos/ratón, lo que condujo a la presión hidrodinámica  
 35 que da como resultado la transfección celular en múltiples órganos en el ratón. Se proporcionaron tratamientos un día antes de la sensibilización de OVA/RIBI (grupos 1-3) o un día antes de reexposición a OVA (grupos 4-6). Los ratones (6 por grupo) se inmunizaron en primer lugar en la espalda con 100  $\mu$ g de ovoalbúmina de pollo (OVA) emulsionada en Ribí en un volumen total de 200  $\mu$ l. Siete días después, los ratones se volvieron a exponer por vía intradérmica en el oído izquierdo a 10  $\mu$ l de PBS (control) o en el oído derecho a 10  $\mu$ g de OVA en PBS (sin adyuvante) en un volumen de 10  $\mu$ l. Se midió grosor de la oreja de todos los ratones antes de inyectar a los ratones en la oreja (medición 0). Se midió el grosor de la oreja 24 y 48 horas después de la exposición. La diferencia en el grosor de la oreja entre la medición 0 y la medición a las 24 horas se muestra en la Tabla 1. Los ratones de control en el grupo de tratamiento con plásmido de control desarrollaron una fuerte reacción de DTH como se muestra por el aumento en el grosor de la oreja a las 24 y 48 horas después de la exposición. Por el contrario, los ratones tratados  
 45 con CTLA-4Fc o B7R1Fc en la fase de exposición tuvieron un menor grado de grosor de la oreja en comparación con los controles. La inyección de B7R1-Fc también inhibió el grosor de la oreja en la fase de sensibilización pero solamente en el punto temporal de 24 horas. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, como se determinó por el ensayo de t de Student (Tabla 5, p valores frente a plásmido de control).

50

Tabla 5

zB7R1 inhibe la reacción de Hipersensibilidad de Tipo Retardado (DTH) cuando se administró en el momento de exposición o en la fase de sensibilización de la respuesta					
EXPT N.º	TRATAMIENTO	TIEMPO/VÍA DE TRATAMIENTO	CAMBIO EN EL GROSOR DE LA OREJA (x 10 <sup>-3</sup> mm)		p valor frente a control
			OÍDO IZQUIERDO (PBS)	OÍDO DERECHO (OVA)	
			24 h	24 h	
	Plásmido de control	Sensibilización (d-1)	10,67 +/- 20,32	170,69 +/- 26,42	-
1	mCTLA-4-Fc	i.v.	12,70 +/- 16,00	180,59 +/- 68,33	0,7484
(n= 6)	mB7R1-Fc		30,23+/-13,72	112,78 +/- 21,84	0,002
	Plásmido de control	Exposición (d6)	2,03 +/- 16,76	254+/-46,74	-

	mCTLA-4-Fc	i.v.	13,97 +/- 2,03	150,88 +/-19,81	0,0006
	mB7R1-Fc		16,51 +/- 15,75	179,83 +/- 32,51	0,0099
			<b>48 h</b>	<b>48 h</b>	
	Plásmido de control	Sensibilización (d-1)	5,08 +/- 13,72	150,11 +/-33,02	-
1	mCTLA-4-Fc	i.v.	16,76 +/- 10,16	195,33 +/- 68,33	0,1758
(n= 6)	mB7R1-Fc		23,88 +/- 22,35	160,78 +/- 28,45	0,5650
	Plásmido de control	Exposición (d6)	13,97 +/- 15,75	289,05 +/- 67,82	-
	mCTLA-4-Fc	i.v.	1,27 +/- 2,03	177,04 +/- 32,00	0,0045
	mB7R1-Fc		1,27 +/-3,30	160,02 +/- 24,38	0,0014

### Ejemplo 21

#### **B7R1 está regulado en tejidos de ratones con artritis inducida por colágeno (CIA) en comparación con tejido no enfermo**

5

Protocolo Experimental: se obtuvieron tejidos de ratones con diversos grados de enfermedad en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA). El modelo se realizó siguiendo procedimientos convencionales de inmunización de ratones DBA/1J macho con colágeno (véase Ejemplo 22 posterior) e incluyó controles no enfermos apropiados. Los tejidos aislados incluyeron patas afectadas y ganglios linfáticos poplíteos. Se aisló ARN de todos los tejidos usando procedimientos convencionales. Brevemente, se recogieron tejidos y se congelaron inmediatamente en N2 líquido y después se transfirieron a -80 °C hasta su procesamiento. Para el procesamiento, los tejidos se colocaron en reactivo Qiazol (Qiagen, Valencia, CA) y se aisló ARN usando el kit Qigen Rneasy según las recomendaciones del fabricante. Se midió la expresión de ARNm de zB7R1 murino con métodos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real múltiple (TaqMan) y el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7900 (PE Applied Biosystems). Los niveles de ARNm de zB7R1 murinos se normalizaron con respecto a la expresión de ARNm de hipoxantina guanina fosforribosil transferasa murina y se determinaron por el método de ciclo de umbral comparativo (User Bulletin 2: PE Applied Biosystems). Los cebadores y sonda para B7R1 murino incluyeron cebador directo 5' SEQ ID NO: 65, cebador inverso 5' SEQ ID NO: 66 y sonda SEQ ID NO: 67.

10

15

20

Resultados: Se detectó expresión de ARNm de B7R1 murino en los tejidos ensayados. Se observaron mayores niveles de expresión en ganglios linfáticos en comparación con las patas. El ARNm de B7R1 estaba aumentado en los ganglios linfáticos poplíteos y las patas de ratones en el modelo de CIA de artritis en comparación con tejidos obtenidos de controles no enfermos, y los niveles se asociaron con la gravedad de la enfermedad. ARNm de B7R1 estaba aumentado en las patas aproximadamente 2,3 veces en ratones con enfermedad leve y aproximadamente 4 veces en ratones con enfermedad grave en comparación con controles no enfermos. ARNm de B7R1 estaba aumentado en el ganglio linfático aproximadamente 1,5 veces en ratones con enfermedad leve y aproximadamente 1,8 veces en ratones con enfermedad grave en comparación con controles no enfermos.

25

30

### Ejemplo 22

#### **B7R1m-mFc y B7R1m-VASP CH6 reduce la incidencia y progresión de enfermedad en modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) de ratón (CIA)**

35

Modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) de ratón: se dividieron ratones DBA/1J macho de diez semanas de edad (Jackson Labs) en 3 grupos de 13 ratones/grupo. El día 21, se proporcionó a los animales una inyección intradérmica en la cola de 50-100 µl de colágeno de tipo II de pollo 1 mg/ml formulado en adyuvante completo de Freund (preparado por Chondrex, Redmond, WA) y tres semanas después el día 0 se les proporcionó la misma inyección excepto que se preparó en adyuvante incompleto de Freund. Se administró B7R1m-mFc o B7R1m-VASP CH6 como una inyección intraperitoneal cada dos días durante 1,5 semanas (aunque la dosificación puede extenderse hasta cuatro semanas), en puntos temporales diferentes que variaron del Día -1 hasta un día en que la mayoría de los ratones mostraban síntomas de enfermedad moderados. Los grupos recibieron 150 µg de B7R1m-mFc o B7R1m-VASP CH6 por animal por dosis, y los grupos de control recibieron el control del vehículo, PBS (Life Technologies, Rockville, MD). Los animales comenzaron a mostrar síntomas de artritis después de la segunda inyección de colágeno, desarrollando la mayoría de los animales inflamación en un periodo de 1,5-3 semanas. El alcance de la enfermedad se evaluó en cada pata usando un calibrador para medir el grosor de la pata, y asignando una puntuación clínica (0-3) a cada pata: 0 = Normal, 0,5 = Dedo o dedos inflamados, 1 = inflamación de la pata leve, 2 = inflamación de la pata moderada y 3 = inflamación de la pata grave como se detalla posteriormente.

40

45

50

Supervisión de la enfermedad: los animales pueden comenzar a mostrar signos de inflamación de la pata poco después de la segunda inyección de colágeno, y algunos animales pueden incluso comenzar a tener signos de inflamación de los dedos antes de la segunda inyección de colágeno. La mayoría de los animales desarrollan artritis en un periodo de 1-3 semanas desde la inyección de refuerzo, pero algunos pueden requerir un periodo de tiempo

más largo. La incidencia de enfermedad en este modelo es normalmente del 95-100 % y se ven normalmente 0-2 que no responden (determinados después de 6 semanas de observación) en un estudio en que se usan 40 animales. Obsérvese que a medida que comienza la inflamación, puede producirse una aparición transitoria común de inflamación de la pata o los dedos de bajo grado variable. Por esta razón, no se considera que un animal tenga enfermedad establecida hasta que se ha desarrollado una hinchazón de la pata persistente, notable.

Todos los animales se observaron diariamente para evaluar el estado de la enfermedad en sus patas, lo que se realiza asignando una puntuación clínica cualitativa a cada una de las patas. Cada día, se puntuaron las 4 patas de cada animal según su estado de enfermedad clínica. Para determinar la puntuación clínica, puede considerarse que la pata tiene 3 zonas, los dedos, la pata en sí misma (mano o pie) y la articulación de la muñeca o el tobillo. El alcance y gravedad de la inflamación en relación con estas zonas se observó incluyendo: observación de cada dedo con respecto a hinchazón; uñas arrancadas o rojez de los dedos; observación de cualquier evidencia de edema o rojez en cualquiera las patas; observación de cualquier pérdida de demarcación anatómica fina de los tendones o los huesos; evaluación de la muñeca o el tobillo con respecto a cualquier edema o rojez; y observación de si la inflamación se extiende proximalmente por la pierna. Una puntuación de pata de 1, 2 o 3 se basa primero en la impresión general de gravedad, y segundo en cuántas zonas están implicadas. La escala usada para puntuación clínica se muestra a continuación.

Puntuación clínica:

- 0 = Normal
- 0,5 = Uno o más dedos implicados, pero solamente están inflamados los dedos
- 1 = inflamación leve que implica la pata (1 zona) y puede incluir un dedo o dedos
- 2 = inflamación moderada en la pata y puede incluir algunos de los dedos y/o la muñeca/el tobillo (2 zonas)
- 3 = inflamación grave en la pata, muñeca/tobillo y algunos o todos los dedos (3 zonas)

La enfermedad establecida se define como una puntuación cualitativa de inflamación de la pata de 2 o más, que persiste durante dos días seguidos. Una vez que está presente la enfermedad establecida, la fecha se registra y se designa como el primer día de ese animal con "enfermedad establecida".

Se recoge sangre durante todo el experimento para supervisar los niveles en suero de anticuerpos anti colágeno, así como niveles de inmunoglobulina y citocinas en suero. Los anticuerpos anti colágeno en suero se correlacionan bien con la gravedad de la enfermedad. Los animales se sacrifican un día determinado, y se recoge sangre para suero. De cada animal, una pata afectada puede recogerse en NBF 10 % para histología y una se congela en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °C para análisis de ARNm. Además, se recoge 1/2 bazo, 1/2 timo, 1/2 ganglio linfático mesentérico, un lóbulo del hígado y el riñón izquierdo en RNAlater para análisis de ARN, y se recogen 1/2 bazo, 1/2 timo, 1/2 ganglio linfático mesentérico, el resto del hígado y el riñón derecho en NBF 10 % para histología. Se recoge suero y se congela a -80 °C para ensayos de inmunoglobulina y citocinas.

Los grupos de ratones que reciben proteína de fusión zB7R1-Fc soluble como se describe en el presente documento y zB7R1-VASP CH6 como se describe en el presente documento, en todos los puntos temporales ensayados (suministro profiláctico y terapéutico) se caracterizaron por un retardo en la incidencia (para administración profiláctica), aparición y/o progresión de inflamación de la pata. El día 8 del modelo, los ratones que recibieron PBS de forma profiláctica tuvieron 100 % de incidencia de enfermedad y tuvieron hinchazón significativa en la mayoría de sus patas. Sin embargo, los ratones que recibieron proteína de fusión zB7R1-Fc profilácticamente tuvieron hinchazón de las patas significativamente reducida (puntuación de artritis 2,3 veces menor en comparación con ratones tratados con PBS) y 80 % de incidencia. Además, los ratones tratados profilácticamente con proteína de fusión zB7R1-VASP CH6 estuvieron protegidos en gran medida de la enfermedad, ya que solamente el 40 % de estos ratones desarrollaron síntomas de artritis, que se asociaron con puntuaciones de artritis notablemente reducidas (3,5 veces menores que los ratones tratados con PBS). La proteína de fusión zB7R1-VASP CH6 también fue capaz de reducir los síntomas de artritis cuando se administró después de la aparición de enfermedad, de modo que los ratones tratados terapéuticamente con proteína de fusión zB7R1-VASP CH6 tuvieron puntuaciones de artritis aproximadamente 2 veces menores que los ratones tratados terapéuticamente con PBS. Estos resultados indican que las proteínas de fusión de zB7R1 solubles de la presente divulgación reducen la inflamación, así como la incidencia y progresión de enfermedad.

A partir de lo anterior, se apreciará que, aunque se han descrito en el presente documento realizaciones específicas de la invención para fines de ilustración, pueden realizarse diversas modificaciones. En consecuencia, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

Cláusulas

1. Un polipéptido de zB7R1 soluble aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2 o los restos de aminoácidos 27-208 de SEQ ID NO: 6, y en el que el polipéptido media en la activación de células T.
2. Un polipéptido de zB7R1 soluble aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene al

- menos 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2 o los restos de aminoácidos 27-208 de SEQ ID NO: 6 y en el que el polipéptido aumenta o regula positivamente la activación de células T.
- 5 3. Un polipéptido de zB7R1 soluble aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2 o los restos de aminoácidos 27-208 de SEQ ID NO: 6 y en el que el polipéptido reduce o inhibe la activación de células T.
4. Un polipéptido de zB7R1 soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
- 10 5. Un polipéptido de zB7R1 soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 68.
6. Un polinucleótido aislado que comprende nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8.
- 15 7. Un polinucleótido aislado que hibrida con un polinucleótido de la cláusula 6 en condiciones rigurosas de hibridación en tampón que contiene SSC 5x, Denhardt 5x, SDS 0,5 %, 1 mg de esperma de salmón/25 ml de solución de hibridación incubado a 65 °C durante una noche, seguido de lavado de alta rigurosidad con SSC 0,2x/SDS 0,1 % a 65 °C, en el que el polinucleótido aislado codifica un polipéptido soluble que inhibe la coestimulación de células T.
- 20 8. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente:
- un promotor de la transcripción;  
un segmento de ADN que codifica un polipéptido de la cláusula 1; y  
un terminador de la transcripción.
- 25 9. Una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión de la cláusula 8, en la que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN.
10. Un método para producir un polipéptido que comprende:
- 30 cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión de la cláusula 8,  
en el que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN; y  
recuperar el polipéptido expresado.
11. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido de la cláusula 1.
- 35 12. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la cláusula 11, en el que dicho anticuerpo bloquea o inhibe la interacción de zB7R1 con CD155.
13. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente con CD155, en el que dicho anticuerpo bloquea o inhibe la interacción de CD155 con zB7R1.
14. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la cláusula 11, en el que dicho anticuerpo reemplaza o aumenta la interacción de zB7R1 con su contrarreceptor.
- 40 15. El anticuerpo de la cláusula 14, en el que el contrarreceptor es CD155.
16. El anticuerpo de la cláusula 11, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal murino, un fragmento de anticuerpo, anticuerpo neutralizante y un anticuerpo monoclonal humano.
- 45 17. El fragmento de anticuerpo de la cláusula 11, en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en F(ab'), F(ab), F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv y unidad de reconocimiento mínima.
18. Un anticuerpo anti idiotípico que comprende un anticuerpo anti idiotípico que se une específicamente con el anticuerpo de la cláusula 11.
19. El anticuerpo de la cláusula 13, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo monoclonal murino, un fragmento de anticuerpo, anticuerpo neutralizante y un anticuerpo monoclonal humano.
- 50 20. El fragmento de anticuerpo de la cláusula 13, en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en F(ab'), F(ab), F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv y unidad de reconocimiento mínima.
21. Un anticuerpo anti idiotípico que comprende un anticuerpo anti idiotípico que se une específicamente al anticuerpo de la cláusula 13.
- 55 22. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2 o 27-208 de SEQ ID NO: 5; y un resto de óxido de polialquilo, en el que la proteína de fusión media en la activación de células T.
23. La proteína de fusión de la cláusula 22, en la que el resto de óxido de polialquilo es polietilenglicol.
- 60 24. La proteína de fusión de la cláusula 23 en la que el polietilenglicol está unido por el extremo N terminal o C terminal con el polipéptido.
25. La proteína de fusión de la cláusula 23, en la que el polietilenglicol es mPEG propionaldehído.
26. La proteína de fusión de la cláusula 23, en la que el polietilenglicol es ramificado o lineal.
- 65 27. La proteína de fusión de la cláusula 23 en la que el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 5 kD, 12 kD, 20 kD, 30 kD, 40 kD o 50 kD.
28. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de restos de

aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 69.

29. La proteína de fusión de la cláusula 28 en la que la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es un fragmento Fc.

5 30. La proteína de fusión de la cláusula 28 en la que la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es un isotipo seleccionado del grupo que consiste en un IgG, IgM, IgE, IgA e IgD.

31. La proteína de fusión de la cláusula 30 en la que el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

32. Una proteína de fusión que comprende un dominio de VASP y zB7R1.

33. La proteína de fusión de la cláusula 32, en la que zB7R1 comprende SEQ ID NO: 3.

34. Una proteína de fusión que comprende SEQ ID NO: 25.

10 35. Una formulación que comprende:

un polipéptido soluble aislado que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2 o los restos de aminoácidos 27-208 de SEQ ID NO: 6; y

15 un vehículo farmacéuticamente aceptable.

36. Un kit que comprende la formulación de la cláusula 35.

37. Una formulación que comprende:

20 un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 11; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

38. Una formulación que comprende:

25 un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la cláusula 13; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

39. Un kit que comprende la formulación de la cláusula 37.

40. Un kit que comprende la formulación de la cláusula 38.

30 41. Un método para modular la actividad de los linfocitos, que comprende poner en contacto un linfocito positivo para zB7R1 con un agente bioactivo capaz de modular la señalización mediada por zB7R1 en una cantidad eficaz para modular al menos una actividad de linfocito.

35 42. El método de acuerdo con la cláusula 41, en el que dicho agente comprende un antagonista de señalización mediada por zB7R1, y en el que dicho contacto inhibe la atenuación de la actividad de linfocitos mediada por señalización de zB7R1.

43. El método de acuerdo con la cláusula 42, en el que dicho contacto aumenta la actividad de linfocitos.

44. El método de acuerdo con la cláusula 42, en el que dicho antagonista comprende un agente de bloqueo capaz de interferir con la interacción funcional de zB7R1 y su contrarreceptor.

45. El método de la cláusula 44, en el que dicho contrarreceptor es CD155.

40 46. El método de acuerdo con la cláusula 44, en el que dicho agente de bloqueo comprende un anticuerpo anti zB7R1 capaz de unirse específicamente con el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3), y en el que dicha unión interfiere con la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor.

47. El método de acuerdo con la cláusula 44, en el que dicho agente de bloqueo comprende una proteína de zB7R1 soluble.

45 48. El método de acuerdo con la cláusula 47, en el que la proteína de zB7R1 soluble comprende una secuencia de secuencia de restos de aminoácidos seleccionada.

49. El método de acuerdo con la cláusula 44, en el que dicho agente de bloqueo comprende una proteína de fusión de zB7R1 soluble.

50 50. El método de acuerdo con la cláusula 44, en el que el agente de bloqueo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti zB7R1, polipéptidos de zB7R1 y proteínas de fusión de zB7R1.

51. El método de acuerdo con la cláusula 41, en el que dicho agente comprende un agonista de señalización mediada por zB7R1, y dicho contacto reduce la actividad de linfocitos.

52. El método de acuerdo con la cláusula 51, en el que dicho agonista comprende un agente mimético capaz de imitar la interacción funcional de zB7R1 y su contrarreceptor.

55 53. El método de acuerdo con la cláusula 52, en el que dicho agonista comprende un agente mimético capaz de aumentar la interacción funcional de zB7R1 y su contrarreceptor.

54. El método de acuerdo con la cláusula 41, en el que dicho linfocito es un linfocito T y dicha actividad de linfocitos se selecciona del grupo que consiste en activación, diferenciación, proliferación, supervivencia, actividad citolítica y producción de citocinas.

60 55. El método de acuerdo con la cláusula 41, en el que dicho linfocito es un linfocito B y dicha actividad de linfocito se selecciona del grupo que consiste en activación, diferenciación, proliferación, supervivencia y producción de anticuerpos.

56. El método de acuerdo con la cláusula 1, en el que dicha actividad de linfocitos comprende una respuesta inmunitaria del hospedador a un antígeno diana, seleccionándose dicho antígeno diana del grupo que consiste en un antígeno patógeno, un antígeno de vacuna y un antígeno asociado a tumor distinto de su contrarreceptor.

65 57. Un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene células tumorales positivas para zB7R1 que

comprende administrar al paciente un antagonista de señalización mediada por zB7R1, en el que dicha administración es eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria del hospedador contra dicha célula tumoral positiva para zB7R1.

5 58. El método de acuerdo con la cláusula 57, en el que dicho antagonista comprende un agente de bloqueo capaz de interferir con la interacción funcional de zB7R1 y su contrarreceptor.

59. El método de acuerdo con la cláusula 51, en el que dicho agente de bloqueo comprende un anticuerpo anti zB7R1 capaz de unirse específicamente con el dominio extracelular de zB7R1 (SEQ ID NO: 3), en el que dicha unión interfiere con la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor.

10 60. Un método para tratar un paciente que tiene una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la presencia de linfocitos positivos para zB7R1 autorreactivos, que comprende administrar al paciente un agonista de la señalización mediada por zB7R1, en el que dicha administración es eficaz para inhibir una respuesta inmunitaria autorreactiva contra células del hospedador no tumorales no linfoides que expresan zB7R1.

61. El método de acuerdo con la cláusula 60, en el que dicho agonista comprende un agente mimético capaz de imitar la interacción funcional de zB7R1 y su contrarreceptor.

15 62. El método de acuerdo con la cláusula 40, en el que la contraestructura es CD155.

63. El método de acuerdo con la cláusula 41, en el que la contraestructura es CD155.

64. El método de acuerdo con la cláusula 61, en el que la contraestructura es CD155.

65. Un método para inhibir la activación de células T, comprendiendo el método poner en contacto la célula T con un agonista de zB7R1.

20 66. Un método para regular positivamente la actividad de células T, comprendiendo el método poner en contacto la célula T con un antagonista de zB7R1.

67. El método de la cláusula 66, en el que la actividad de células B también está regulada positivamente.

68. Un método para inhibir la coestimulación de una célula T, comprendiendo el método poner en contacto la célula T con un polipéptido de zB7R1 soluble, cuya secuencia comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2 o los restos de aminoácidos 27-208 de SEQ ID NO: 6.

25 69. El método de la cláusula 68, en el que el contacto comprende cultivar el polipéptido con la célula T *in vitro*.

70. El método de la cláusula 68, en el que la célula T está en un paciente.

71. El método de la cláusula 68 en el que el contacto comprende administrar el polipéptido al paciente.

30 72. El método de la cláusula 70 en el que el contacto comprende administrar un ácido nucleico que codifica el polipéptido al paciente.

73. El método de la cláusula 70 en el que comprende (a) proporcionar una célula recombinante que es la descendencia de una célula obtenida del paciente y se ha transfectado o transformado *ex vivo* con una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de modo que la célula exprese el polipéptido; y (b) administrar la célula al paciente.

35 74. El método de la cláusula 70 en el que el paciente padece una enfermedad inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad celíaca y síndrome de intestino irritable.

40 75. Un método para tratar, prevenir, inhibir la progresión de, retardar la aparición de y/o reducir al menos uno de los síntomas o afecciones asociados con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enfermedad de injerto contra hospedador y síndrome del intestino irritable que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la formulación de la cláusula 35.

45 76. Un método para tratar, prevenir, inhibir la progresión de, retardar la aparición de y/o reducir al menos uno de los síntomas o afecciones asociados con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enfermedad de injerto contra hospedador y síndrome del intestino irritable que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la formulación de la cláusula 37.

50 77. Un método para tratar, prevenir, inhibir la progresión de, retardar la aparición de y/o reducir al menos uno de los síntomas o afecciones asociados con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enfermedad de injerto contra hospedador y síndrome del intestino irritable que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la formulación de la cláusula 38.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> ZYMOGENETICS, INC.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MODULAR RESPUESTAS INMUNITARIAS

<130> P31357EP-D2-PCT

60 <140> EP 06759739.3

<141> 12-05-2006

<150> 60/680.374

65 <151> 12-05-2005

<150> 60/791.626

# ES 2 609 429 T3

```

<151> 13-04-2006

<150> 60/795.005
<151> 26-04-2006

5
<160> 69

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

10
<210> 1
<211> 902
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15
<220>
<221> CDS
<222> (11)...(745)

20
<220>
<221> misc_feature
<222> (289)...(289)
<223> n = c o t

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (359)...(359)
<223> n = a o g

30
<400> 1

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

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

      acg ggg aac att tct gca gag aaa ggt ggc tct atc atc tta caa tgt      145
      Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys
                30                35                40                45

      cac ctc tcc tcc acc acg gca caa gtg acc cag gtc aac tgg gag cag      193
      His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln
                50                55                60

```



ES 2 609 429 T3

<400> 2

```

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

```

5

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

10

<400> 3

ES 2 609 429 T3

```

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

Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
      130          135          140

```

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

<400> 4

```

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

```

10 <210> 5  
 <211> 1711  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (755)...(1690)

20 <400> 5

ES 2 609 429 T3

```

aaactatttg agggtagggg ctgtgattat ttactctcat atcctcagag cctgggtgttg 60
aggttgggtgc tttgtaggca cccagggact ttcaaataaa tgaaggagg gagggaggaa 120
agaaggatgg gtccatagta ggacctgggtg atgggctggg agctccaggc aaatgtcaac 180
caatccctct cctgggtcag ctcccagggg ctcaaccctc tttgcatttc cagctctcat 240
gaggtcattg tgcacaggaa agctctctcc tctaatctcc tetgatccta ctgcaccaga 300
gaaatcaagc cagaattcaa caaagtctca gtccagataa acaagacaaa agaaataaga 360
ttcgagtaga agatctcctt caagggaaag ttgctgtggt tgtccaagac ctttgtccca 420
tccatgtatc atcccccaag taaacaectc ttgttcacct gttcattaga tttcaagtgc 480
agtccttggc ctgtaagtcc ctacaatgat aagtttctct tatcattgca cattcttcat 540
caggaggatg ccagaggagc tcagccaaca gttcctcctc agtagcagat tcttcagaat 600
cttgggcact acacagatgc ccttgagctc tttgaataaa ggctgatttt tagaaaaaac 660
attaagacag aacttaaaaa caatagattg actataatcc aaagacgagt gtacctctaa 720
ccacaatfff catttatfff taaatgffff ctcc atg gcc ttt ctt gtg gct cac 775
Met Ala Phe Leu Val Ala His
1 5

```

```

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

```

```

gtt ttt gcc aaa ctt ggt ttt tcc gag acc gtc ttt tet cag agg etc 871

```

ES 2 609 429 T3

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

ES 2 609 429 T3

```

Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly
 265                               270                               275

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

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

tag caaccagagg catcttctgg a   1711

```

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

5

<400> 6

```

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

```

Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly  
 305 310

10

ES 2 609 429 T3

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

5

<400> 7

```

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

10

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

15

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

20

<400> 8

```

atg cat ggc tgg ctg ctc ctg gtc tgg gtc cag ggg ctg ata cag gct 48
Met His Gly Trp Leu Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Ile Gln Ala
 1                    5                    10                    15

gcc ttc ctc gct aca gga gcc aca gca ggc acg ata gat aca aag agg 96
Ala Phe Leu Ala Thr Gly Ala Thr Ala Gly Thr Ile Asp Thr Lys Arg
 20                    25                    30

aac atc tct gca gag gaa ggt ggc tct gtc atc tta cag tgt cac ttc 144
Asn Ile Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys His Phe
 35                    40                    45

tcc tct gac aca gct gaa gtg acc caa gtc gac tgg aag cag cag gac 192
  
```

ES 2 609 429 T3

Ser	Ser	Asp	Thr	Ala	Glu	Val	Thr	Gln	Val	Asp	Trp	Lys	Gln	Gln	Asp	
	50					55					60					
cag	ctt	ctg	gcc	att	tat	agt	gtt	gac	ctg	ggg	tgg	cat	gtc	gct	tca	240
Gln	Leu	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ser	Val	Asp	Leu	Gly	Trp	His	Val	Ala	Ser	
	65				70					75					80	
gtc	ttc	agt	gat	cgg	gtg	gtc	cca	ggc	ccc	agc	cta	ggc	ctc	acc	ttc	288
Val	Phe	Ser	Asp	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Phe	
				85					90					95		
cag	tct	ctg	aca	atg	aat	gac	acg	gga	gag	tac	ttc	tgt	acc	tat	cat	336
Gln	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	Tyr	His	
			100					105					110			
acg	tat	cct	ggt	ggg	att	tac	aag	ggg	aga	ata	ttc	ctg	aag	gtc	caa	384
Thr	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ile	Tyr	Lys	Gly	Arg	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	Gln	
		115					120					125				
gaa	agc	tca	gtg	gct	cag	ttc	cag	act	gcc	ccg	ctt	gga	gga	acc	atg	432
Glu	Ser	Ser	Val	Ala	Gln	Phe	Gln	Thr	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Thr	Met	
		130				135					140					
gct	gct	gtg	ctg	gga	ctc	att	tgc	tta	atg	gtc	aca	gga	gtg	act	gta	480
Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Cys	Leu	Met	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Val	
	145				150					155					160	
ctg	gct	aga	aag	aag	tct	att	aga	atg	cat	tct	ata	gaa	agt	ggc	ctt	528
Leu	Ala	Arg	Lys	Lys	Ser	Ile	Arg	Met	His	Ser	Ile	Glu	Ser	Gly	Leu	
				165					170					175		
ggg	aga	aca	gaa	gcg	gag	cca	cag	gaa	tgg	aac	ctg	agg	agt	ctc	tca	576
Gly	Arg	Thr	Glu	Ala	Glu	Pro	Gln	Glu	Trp	Asn	Leu	Arg	Ser	Leu	Ser	
			180					185					190			
tcc	cct	gga	agc	cct	gtc	cag	aca	caa	act	gcc	cct	gct	ggt	ccc	tgt	624
Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Val	Gln	Thr	Gln	Thr	Ala	Pro	Ala	Gly	Pro	Cys	
		195				200						205				
gga	gag	cag	gca	gaa	gat	gac	tat	gct	gac	cca	cag	gaa	tac	ttt	aat	672
Gly	Glu	Gln	Ala	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ala	Asp	Pro	Gln	Glu	Tyr	Phe	Asn	
	210					215					220					
gtc	ctg	agc	tac	aga	agc	cta	gag	agc	ttc	att	gct	gta	tcg	aag	act	720
Val	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Thr	
	225					230				235					240	
ggc	taa															726
Gly	*															

<210> 9  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 9

5

ES 2 609 429 T3

```

Met His Gly Trp Leu Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Ile Gln Ala
 1           5           10           15

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

```

<210> 10  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 10

```

Met His Gly Trp Leu Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Ile Gln Ala
 1           5           10           15

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

```

10

<210> 11  
 <211> 140

ES 2 609 429 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

5

```

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

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

10

<400> 12

```

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

15

<210> 13  
<211> 147  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20

<220>  
<223> Dominio de Tetramerización VASP-His6

25

<400> 13

ES 2 609 429 T3

ggctccgggtg gctccgacct acagagggtg aaacaggagc ttctggaaga ggtgaagaag 60

gaattgcaga aagtgaaaga ggaaatcatt gaagccttcg tccaggagct gaggggttcc 120  
 ggtggccate accatcacca tcaactga 147

5 <210> 14  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Dominio de Tetramerización VASP-His6  
 <400> 14

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

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

20 <220>  
 <223> Enlazador  
 <400> 15

Gly Ser Gly Gly  
 1

25  
 30 <210> 16  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Enlazador  
 35 <400> 16

His His His His His His  
 1 5

40 <210> 17  
 <211> 3200  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (184)...(1425)

50 <220>  
 <223> CD155 humano  
 <400> 17

ES 2 609 429 T3

cttgaagaag tgggtattcc ccttcccacc ccaggaactg gaggagcggc cccccgggga 60  
tccaggacc tgagctccgg gagctggact cgcagcgacc ggggcagagc gagctggcgc 120  
cgggaagcga ggagacgccc gcgggagccc cagctgctcg gagcaactgg catggcccga 180  
gcc atg gcc gcc gcg tgg ccg ctg ctg ctg gtg gcg cca ctg gtg ctg 228  
Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu  
1 5 10 15  
tcc tgg cca ccc cca gga acc ggg gac gtc gtc gtg cag gcg ccc acc 276  
Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr  
20 25 30  
cag gtg ccc ggc ttc ttg ggc gac tcc gtg acg ctg ccc tgc tac cta 324  
Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu  
35 40 45  
cag gtg ccc aac atg gag gtg acg cat gtg tca cag ctg act tgg gcg 372  
Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala  
50 55 60  
cgg cat ggt gaa tct ggc agc atg gcc gtc ttc cac caa acg cag gcc 420  
Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly  
65 70 75  
ccc agc tat tcc gag tcc aaa cgg ctg gaa ttc gtg gca gcc aga ctg 468  
Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu  
80 85 90 95  
ggc gcg gag ctg cgg aat gcc tcc ctg agg atg ttc ggg ttg cgc gta 516  
Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val  
100 105 110  
gag gat gaa ggc aac tac acc tgc ctg ttc gtc acg ttc ccg cag gcc 564  
Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly  
115 120 125  
agc agg agc gtg gat atc tgg ctc cga gtg ctt gcc aag ccc cag aac 612  
Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn  
130 135 140  
aca gct gag gtt cag aag gtc cag ctc act gga gag cca gtg ccc atg 660  
Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met  
145 150 155  
gcc cgc tgc gtc tcc aca ggg ggt cgc ccg cca gcc caa atc acc tgg 708  
Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp  
160 165 170 175  
cac tca gac ctg ggc ggg atg ccc aat acg agc cag gtg cca ggg ttc 756  
His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe  
180 185 190  
ctg tct ggc aca gtc act gtc acc agc ctc tgg ata ttg gtg ccc tca 804  
Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser  
195 200 205  
agc cag gtg gac ggc aag aat gtg acc tgc aag gtg gag cac gag agc 852  
Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser  
210 215 220  
ttt gag aag cct cag ctg ctg act gtg aac ctc acc gtc tac tac ccc 900  
Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro

ES 2 609 429 T3

225	230	235	
cca gag gta tcc atc tct ggc tat gat aac aac tgg tac ctt ggc cag			948
Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln			
240	245	250	255
aat gag gcc acc ctg acc tgc gat gct cgc agc aac cca gag ccc aca			996
Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr			
	260	265	270
ggc tat aat tgg agc acg acc atg ggt ccc ctg cca ccc ttt gct gtg			1044
Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val			
	275	280	285
gcc cag gcc gcc cag ctg ctg atc cgt cct gtg gac aaa cca atc aac			1092
Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn			
	290	295	300
aca act tta atc tgc aac gtc acc aat gcc cta gga gct cgc cag gca			1140
Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala			
	305	310	315
gaa ctg acc gtc cag gtc aaa gag gga cct ccc agt gag cac tca gcc			1188
Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly			
	320	325	330
atg tcc cgt aac gcc atc atc ttc ctg gtt ctg gga atc ctg gtt ttt			1236
Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Val Phe			
	340	345	350
ctg atc ctg ctg ggg atc ggg att tat ttc tat tgg tcc aaa tgt tcc			1284
Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser Lys Cys Ser			
	355	360	365
cgt gag gtc ctt tgg cac tgt cat ctg tgt ccc tcg agt aca gag cat			1332
Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser Thr Glu His			
	370	375	380
gcc agc gcc tca gct aat ggg cat gtc tcc tat tca gct gtg agc aga			1380
Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg			
	385	390	395
gag aac agc tct tcc cag gat cca cag aca gag gcc aca agg tga			1425
Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg *			
400	405	410	
cagcgtcggg actgagaggg gagagagact ggagctggca aggacgtggg cctccagagt			1485
tggaccggac cccaatggat gaagaccccc tccaaagaga ccagcctccc tccctgtgcc			1545
agacctcaaa acgacggggg caggtgcaag ttcataaggtc tccaagacca ccctcctttc			1605
atttgctaga aggactcact agaactcagga aagctgttag gccacacagt acagtttatt			1665
acaqtaaaag gacagagatt aaqatcagca aagqgaggaq gtgcacagca cacgttccac			1725
gacagatgag gcgacgctt ccaactgcc tctcccagtq gagccatata ggcagccct			1785
gattctcaca gcaacatgtg acaacatgca agaagtactg ccaatactgc caaccagagc			1845
agctcactcg agatctttgt gtccagagtt ttttgtttgt ctgagacag ggtctggctc			1905
tgttggcaga ctagagtaca gtggtgagat cacagttcat tgcagccttg acttctcaac			1965
gccaagtcac cctcccacct cagcctcctg agtagctatg actacaggtg tgtgccacca			2025
cgtctggcta atctttttat tatctgtaaa gtcgaggttt cctgtgttg cccaggtcgg			2085
tcttgaactc ttggctccaa gtgatacttc tgcttggcc tccaaaagtg ctgaattaag			2145
cagctcacca tccacacggc tgacctcata catcaagcca ataccygtg gcccaagacc			2205
cccaccataa atcacatcat tagcatgaac cccccagagt gcccacaagac tcccagatca			2265

ES 2 609 429 T3

```

gctaccaggc aggatattcc aaggccttag agatgaatgc ccaggagctg aggataaagg 2325
gcccgatott tttttgggca aggttaagcc tttactgcat agcagaccac acagaagggt 2385
gtgggccacc agagaatttt ggtaaaaatt tggcctctgg ccttgagctt ctaaattctct 2445
gtatccgtca gatctctgtg gttacaagaa acagccactg accctggtea ccagaggctg 2505
caattcaggc cgcaagcagc tgcttagggg gtgtccaagg agcagagaaa actactagat 2565
gtgaacttga agaaggttgt cagctgcagc cactttctgc cagcatctgc agccactttc 2625
tgccagcatc tgcagccagc aagetgggac tggcaggaaa taaccacaaa aagaagcaaa 2685
tgcaatttcc aacacaaggg ggaagggatg cagggggagg cagcgtgca gttgctcagg 2745
acacgctcct ataggaccaa gatggatgcg acccaagacc caggaggccc agctgctcag 2805
tgcaactgac aagttaaaaa ggtctatgat cttgagggca gacagcagaa ttctctttat 2865
aaagaaaact gtttgggaaa atacgttgag ggagagaaga ccttgggcca agatgctaaa 2925
tgggaatgca aagcttgagc tgctctgcaa gagaaaataa gcaggacaga ggatttgctc 2985
tggacagaga tgggaagagcc gggaacagag aagtgtgggg aagagatagg aaccagcagg 3045
atggcagggg caaagggtc aagggtgagg aggccagtgg gacccacag agttggggag 3105
ataaaggaac attggttgct ttggtggcac gtaagetctt tgtctgtctc cagcaccag 3165
aatctcatta aagcttattt attgtacctc caaaa 3200

```

<210> 18  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> CD155 humano

10

<400> 18

ES 2 609 429 T3

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

Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala  
275 280 285  
Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr  
290 295 300  
Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu  
305 310 315 320  
Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met  
325 330 335  
Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Val Phe Leu  
340 345 350  
Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser Lys Cys Ser Arg  
355 360 365  
Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser Thr Glu His Ala  
370 375 380  
Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg Glu  
385 390 395 400  
Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg  
405 410

<210> 19  
<211> 316  
<212> PRT

ES 2 609 429 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CD155 humano

5

<400> 19

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

10 <210> 20  
 <211> 2838  
 <212> ADN  
 <213> Murino

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (62)...(1288)

ES 2 609 429 T3

<400> 20

```

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

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

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

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

tgg atg aag aag gat tca ggt gga tcc cac gct ctt gtg gct gtc ttc 301
Trp Met Lys Lys Asp Ser Gly Gly Ser His Ala Leu Val Ala Val Phe
    65             70             75             80

cac ccc aag aag ggg ccc aac atc aaa gag cca gag agg gtg aaa ttc 349
His Pro Lys Lys Gly Pro Asn Ile Lys Glu Pro Glu Arg Val Lys Phe
    85             90             95

ttg gct gcc caa cag gat ctg agg aac gca tct ctg gcc atc tcg aac 397
Leu Ala Ala Gln Gln Asp Leu Arg Asn Ala Ser Leu Ala Ile Ser Asn
    100            105            110

tta agt gta gaa gac gaa ggc atc tat gaa tgt cag att gcc aca ttc 445
Leu Ser Val Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Glu Cys Gln Ile Ala Thr Phe
    115            120            125

ccc aga ggc agt aga agc acc aat gcc tgg ctg aag gtg caa gcc cga 493
Pro Arg Gly Ser Arg Ser Thr Asn Ala Trp Leu Lys Val Gln Ala Arg
    130            135            140

cct aag aac act gca gag gcc ctg gag ccc tct ccc acc ttg ata ctg 541
Pro Lys Asn Thr Ala Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Thr Leu Ile Leu

```

ES 2 609 429 T3

145		150		155		160	
cag gat ggc gct aaa tgc atc tct gcc aat ggt cac cct cct gga cga							589
Gln Asp Val Ala Lys Cys Ile Ser Ala Asn Gly His Pro Pro Gly Arg							
		165		170		175	
atc tct tgg ccc tcg aat gtg aat gga aat cac cgt gaa atg aag gaa							637
Ile Ser Trp Pro Ser Asn Val Asn Gly Ser His Arg Glu Met Lys Glu							
		180		185		190	
cca ggg tcc cag ccg ggc acc acc aca gtt acc agc tac ctc tcc atg							685
Pro Gly Ser Gln Pro Gly Thr Thr Thr Val Thr Ser Tyr Leu Ser Met							
		195		200		205	
gta cct tct cgc cag gca gac ggc aag aac atc acc tgc acg gtg gag							733
Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr Cys Thr Val Glu							
		210		215		220	
cat gaa agc tta cag gag ctg gac cag ctg ctg gtg acc ctt tcc caa							781
His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val Thr Leu Ser Gln							
		225		230		235	
ccc tal cca cct gaa aac gtg tcc atc tct ggc tal gac ggc aac tgg							829
Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Gly Asn Trp							
		245		250		255	
tat gtt ggc ctc act aac ttg acc ctg acc tgt gaa gct cac agc aaa							877
Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala His Ser Lys							
		260		265		270	
cca ggc cct gac atg gct gga tat aac tgg agc acg aac acg ggt gac							925
Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Asn Thr Gly Asp							
		275		280		285	
ttt ccc aac tct gtt aag cgc cag ggc aat atg ctt cta atc tcc acc							973
Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu Leu Ile Ser Thr							
		290		295		300	
gta gag gat ggt ctc aat aac acg gtc att gtg tgc gaa gtc acc aat							1021
Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys Glu Val Thr Asn							
		305		310		315	
gcc cta ggg tct ggg cag ggc caa gtg cac atc att gtt aaa gag aaa							1069
Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile Val Lys Glu Lys							
		325		330		335	
cct gag aat atg cag caa aat aca aga tta cac cta gcc tac atc ttt							1117
Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His Leu Gly Tyr Ile Phe							
		340		345		350	
ctt atc gtc ttt gtc ctc gct gta gtc atc atc atc gca gca cta tac							1165
Leu Ile Val Phe Val Leu Ala Val Val Ile Ile Ile Ala Ala Leu Tyr							
		355		360		365	
act ata cga aga tgc agc cat ggt cgt gct ctg cag tcc aat ccc tca							1213
Thr Ile Arg Arg Cys Arg His Gly Arg Ala Leu Gln Ser Asn Pro Ser							
		370		375		380	
gag agg gag aac gtc cag tat tca tct gtg aac ggc gac tgt aga ctg							1261
Glu Arg Glu Asn Val Gln Tyr Ser Ser Val Asn Gly Asp Cys Arg Leu							

ES 2 609 429 T3

385	390	395	400	
aac atg gag cca aac agc aca agg tga cgggtgctggg tagacagaac				1308
Asn Met Glu Pro Asn Ser Thr Arg *				
	405			
taaggaactt gaaggcatag caactggaac cctactctca taaatgaaga agcctccaga				1368
gagactggct gctcagtggt atgagcatag caagtttggg gggctctcca ggatgctgcc				1428
gaattccacg ttgtcaaaag gacctatgga ggccagtggt ttggctcaact cttgacatct				1488
cagcaagctg gggggggggg ggggagcata aagcgagggt gactctagct tgggctatag				1548
agcaaagccc tgtccataca caaacaagct aaggggcttt gagacggcca gaaactgaag				1608
tcttgctttg ggtaaggtaa atcctctacc gcatgtatgt gctagacttg aaagacttcc				1668
acacagacct ctttataagt tgaactccatt ggggctatcc cctcctctct ggacaaggtc				1728
tctgtatgta gccaaaggcta ggctcaaact cacagagata tgtctgcttc tacctcccca				1788
gtgctagagt tgaagattt tgtgccactg cacttttcta ggtctcttt taatgaagta				1848
aagtatatat ttataaaaag ctatttagtt atatatatat atatttttga gactatttca				1908
tagagcccaa gctaacctca aacttactat gttagccaaga gtgatggtaa actaatat				1968
tttaatttat ttgtcttcaa ttttaacct caccacaacc ctgctccctt ccatatcttc				2028
tttcaatcca ttccattgtc tttttcttcc cagacactat tctgacttac gtctccatta				2088
aaaacatttt attgaactac ataaaaatgt gtgaaccaca aaaaaaaaaat gtatttgtca				2148
aaattgtagt tgtctttctg aggctgacct gagttctctg ataccattct ctccagttgt				2208
atccagtttc ctgtaaacaa tgtgactttg tttttctcag tagctaaaac atcccaatta				2268
tgtgagtgta cactttcttt actcattcct ctgtgggcca ccagctgggt tggttccata				2328
tctgagctat tgtgcatgga attgtctctg tgggtgggttt agtaaaactcc caggaatgcc				2388
tgtacatggt tgttagaggcc agaagaaggc acaaaatctt gagccaggct tacatgcaact				2448
tgtgagtagc cccacatag tgcataagaac ccagttcagg tctctgctg tgggatggtg				2508
ggctgtgcac agaaagcctg gtcccggctc agcaaaggtc tggaaactcc gagccgggtg				2568
gctgtgattt acaccagcat gggatggaag gagttggacc tcgcctctg ggcacctggc				2628
tctgtcaca tagctacagc ctcccacagc ccccctatag ggaggtatgc agcatcaatc				2688
acatagtagc tgcactaagc cctcccacat gcaaataagg tttcccaaaa ctctcagtc				2748
aagccaatga aaagtacctg ctgtcaaacc ctaaatacct cccaaaactc tgtaagtcct				2808
atcaggggat aaaatgtgtg tgaaaactaa				2838

- <210> 21
- <211> 408
- <212> PRT
- <213> Murino
  
- <400> 21

5

ES 2 609 429 T3

Met Ala Gln Leu Ala Arg Ala Thr Arg Ser Pro Leu Ser Trp Leu Leu  
1 5 10 15  
Leu Leu Phe Cys Tyr Ala Leu Arg Lys Ala Gly Gly Asp Ile Arg Val  
20 25 30  
Leu Val Pro Tyr Asn Ser Thr Gly Val Leu Gly Gly Ser Thr Thr Leu  
35 40 45  
His Cys Ser Leu Thr Ser Asn Glu Asn Val Thr Ile Thr Gln Ile Thr  
50 55 60  
Trp Met Lys Lys Asp Ser Gly Gly Ser His Ala Leu Val Ala Val Phe  
65 70 75 80  
His Pro Lys Lys Gly Pro Asn Ile Lys Glu Pro Glu Arg Val Lys Phe  
85 90 95  
Leu Ala Ala Gln Gln Asp Leu Arg Asn Ala Ser Leu Ala Ile Ser Asn  
100 105 110  
Leu Ser Val Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Glu Cys Gln Ile Ala Thr Phe  
115 120 125  
Pro Arg Gly Ser Arg Ser Thr Asn Ala Trp Leu Lys Val Gln Ala Arg  
130 135 140  
Pro Lys Asn Thr Ala Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Thr Leu Ile Leu  
145 150 155 160  
Gln Asp Val Ala Lys Cys Ile Ser Ala Asn Gly His Pro Pro Gly Arg  
165 170 175  
Ile Ser Trp Pro Ser Asn Val Asn Gly Ser His Arg Glu Met Lys Glu  
180 185 190  
Pro Gly Ser Gln Pro Gly Thr Thr Thr Val Thr Ser Tyr Leu Ser Met  
195 200 205  
Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr Cys Thr Val Glu  
210 215 220  
His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val Thr Leu Ser Gln  
225 230 235 240  
Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Gly Asn Trp  
245 250 255  
Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala His Ser Lys  
260 265 270  
Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Asn Thr Gly Asp  
275 280 285  
Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu Leu Ile Ser Thr  
290 295 300  
Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys Glu Val Thr Asn  
305 310 315 320  
Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile Val Lys Glu Lys  
325 330 335  
Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His Leu Gly Tyr Ile Phe  
340 345 350  
Leu Ile Val Phe Val Leu Ala Val Val Ile Ile Ile Ala Ala Leu Tyr  
355 360 365  
Thr Ile Arg Arg Cys Arg His Gly Arg Ala Leu Gln Ser Asn Pro Ser  
370 375 380  
Glu Arg Glu Asn Val Gln Tyr Ser Ser Val Asn Gly Asp Cys Arg Leu  
385 390 395 400  
Asn Met Glu Pro Asn Ser Thr Arg  
405

<210> 22  
<211> 319  
<212> PRT  
<213> Murino

ES 2 609 429 T3

<400> 22

```

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

                165                170                175
Tyr Leu Ser Met Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr
 180                185                190
Cys Thr Val Glu His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val
 195                200                205
Thr Leu Ser Gln Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr
 210                215                220
Asp Gly Asn Trp Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu
 225                230                235                240
Ala His Ser Lys Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr
 245                250                255
Asn Thr Gly Asp Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu
 260                265                270
Leu Ile Ser Thr Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys
 275                280                285
Glu Val Thr Asn Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile
 290                295                300
Val Lys Glu Lys Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His
 305                310                315

```

5 <210> 23  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Dominio de Tetramerización VASP-His6

<400> 23

```

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

```

15

ES 2 609 429 T3

<210> 24  
 <211> 2207  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 24

```

ccccctcctg tgggggttcat tgggggcatcc cctttctgct gcaggaacct ctcatacagac 60
cgcttgaggg aagcggcgcc cggagaccog ccccggeccg gtccacatte tccccaggaa 120
gcoggaactct atggggcggg accctggggg agcctgagcc gagcccgag ccageccccga 180
accctgaaac ctccagccag gggcgccccg ggagcagcca gcccgtaggc gagccgccccg 240
cccgccgagc agccatgagc gagacggtea tctgttecag ccgggccact gtgatgettt 300
atgatgatgg caacaagcga tggctccctg ctggcaggg tccccaggcc ttcagcccg 360
tccagateta ccacaacccc acggccaatt cctttcgcgt cgtgggcccg aagatgcagc 420
ccgaccagca ggtggtcacc aactgtgcca tcgtccgggg tgtcaagtat aaccaggcca 480
cccccaactt ccatcagtgg cgcgacgctc gccaggtctg gggcctcaac ttcggcagca 540
aggaggatgc gggccagttt gccgcccggc tggccagtgc cctagaggcg ttggaaggag 600
gtgggcccccc tccacccccca gcaacttccca cctggtcggc cccgaacggc ccctccccgg 660
aggagggtgga gcagcagaaa aggcagcagc ccggcccgtc ggagcacata gagcgcgggg 720
tctccaatgc aggagggcca cctgctcccc ccgctggggg tccacccccca ccaccaggac 780
ctccccctcc tccaggtccc cccccacccc caggtttgccc ccttcggggg gteccagctg 840
cagcgcacgg agcaggggga ggaccacccc ctgcaccccc tctcccgcca gcacagggcc 900
ctggtggtgg gggagctggg gccccaggcc tggccgcagc tattgctgga gccaaactca 960

```

```

ggaaagtacg caagcaggag gaggcctcag gggggccccc agcccccaaa gctgagagtg 1020
gtcgaagcgg aggtggggga ctcatggaag agatgaacgc catgctggcc cggagaaggga 1080
aagccacgca agttggggag aaaacccccca aggatgaatc tgccaatcag gaggagccag 1140
aggccagagt cccggcccag agtgaatctg tgcggagacc ctgggagaag aacagcacia 1200
ccttgccaag gatgaagtgc tcttcttcgg tgaccacttc cgagacccaa cctgcacgc 1260
ccagctccag tgattactgc gacctacaga ggggtgaaaca ggagcttctg gaagaggtga 1320
agaaggaatt gcagaaagtg aaagaggaaa tcattgaagc cttcgtccag gagctgagga 1380
agcgggggtc tccctgacca cagggaccca gaagacccgc ttctccttc cgcacacccg 1440
gcctgtcacc ctgctttccc tgccctctact tgacttggaa ttggctgaag acacaggaat 1500
gcctcgttcc cactccccat cccacttggg aaactccaag ggggtgtggc ttccctgctc 1560
acaccacac tggctgctga ttggctgggg agggccccgc cctttctccc ctttggctct 1620
tcccctctgc catccccctg gggccggctc ctctgctggg gatgcaccaa tgaacccccac 1680
aggaaggggg aaggaaggag ggaatttcac attcccttgt tctagattca ctttaacgct 1740
taatgccttc aaagtcttgg tttttttaag aaaaaaaaaat atatatatat ttgggttttg 1800
ggggaagggg gaaatctttt tttctctttg gttttgataa aatgggatgt gggagttttt 1860
aaatgctata gccctgggct tgccccattt ggggcagcta ttttaagggga ggggatgtct 1920
caccgggctg ggggtgagat atccccccac cccagggact ccccttccct ctggctcctt 1980
ccccttttct atgaggaaat aagatgctgt aactttttgg aacctcagtt ttttgatttt 2040
ttatttgggt aggttttggg gtccaggcca ttttttttac cccttgagg aaataagatg 2100
agggagaaag gagaagggga ggaaacttct cccctcccac cttcaccttt agcttcttga 2160
aaatgggccc ctgcagaata aatctgccag tttttataaa aaaaaaa 2207

```

10

<210> 25  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 25

ES 2 609 429 T3

Met	Ser	Glu	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Asp	Asp	Gly	Asn	Lys	Arg	Trp	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Gly	Pro	Gln	Ala
			20					25					30		
Phe	Ser	Arg	Val	Gln	Ile	Tyr	His	Asn	Pro	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	Arg
		35				40						45			
Val	Val	Gly	Arg	Lys	Met	Gln	Pro	Asp	Gln	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Cys
	50				55						60				
Ala	Ile	Val	Arg	Gly	Val	Lys	Tyr	Asn	Gln	Ala	Thr	Pro	Asn	Phe	His
65				70					75						80
Gln	Trp	Arg	Asp	Ala	Arg	Gln	Val	Trp	Gly	Leu	Asn	Phe	Gly	Ser	Lys
				85					90					95	
Glu	Asp	Ala	Ala	Gln	Phe	Ala	Ala	Gly	Met	Ala	Ser	Ala	Leu	Glu	Ala
			100					105					110		
Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Trp	Ser
		115					120						125		
Val	Pro	Asn	Gly	Pro	Ser	Pro	Glu	Glu	Val	Glu	Gln	Gln	Lys	Arg	Gln
	130					135						140			
Gln	Pro	Gly	Pro	Ser	Glu	His	Ile	Glu	Arg	Arg	Val	Ser	Asn	Ala	Gly
145					150					155					160
Gly	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro
				165					170					175	
Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly
			180					185					190		
Val	Pro	Ala	Ala	Ala	His	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro
		195				200						205			
Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Gln	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro
	210				215						220				
Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Lys	Leu	Arg	Lys	Val	Ser	Lys
225					230					235					240
Gln	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	Thr	Ala	Pro	Lys	Ala	Glu	Ser	Gly
				245					250					255	
Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Met	Glu	Glu	Met	Asn	Ala	Met	Leu	Ala
			260					265					270		
Arg	Arg	Arg	Lys	Ala	Thr	Gln	Val	Gly	Glu	Lys	Thr	Pro	Lys	Asp	Glu
		275					280					285			
Ser	Ala	Asn	Gln	Glu	Glu	Pro	Glu	Ala	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Ser	Glu
	290					295					300				
Ser	Val	Arg	Arg	Pro	Trp	Glu	Lys	Asn	Ser	Thr	Thr	Leu	Pro	Arg	Met
305					310					315					320
Lys	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Gln	Pro	Cys	Thr	Pro
				325					330					335	
Ser	Ser	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asp	Leu	Gln	Arg	Val	Lys	Gln	Glu	Leu	Leu
			340					345					350		
Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Leu	Gln	Lys	Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Ile	Glu
		355					360					365			
Ala	Phe	Val	Gln	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Gly	Ser	Pro				
	370					375					380				

<210> 26  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Enlazador

ES 2 609 429 T3

<400> 26

Gly Ser Gly Gly  
1

5

<210> 27  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10

<220>  
<223> Marcador

<400> 27

15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

20

<210> 28  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25

<220>  
<223> Marcador

<400> 28

His His His His His His  
1 5

30

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

35

<400> 29

```

atgcatggct ggotgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggetgc cttectcgtc 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtggtgacc tggggtggca tgtegettca 240
gtcttcagtg atcgggtggc cccaggcccc agcctaggcc tcacctcca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctgggtg gatttacaag 360
gggagaatat tctgaaggc ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgccccgctt 420
ggaggaacca tggctgctgt gctgggactc atttgcttaa tggtcacagg agtgactgta 480
ctggctagaa agaagtctat tagaatgcat tctatagaaa gtggccttgg gagaacagaa 540
goggagccac aggaatggaa cctgaggagt ctctcatccc ctggaagccc tgtccagaca 600
caaaactgcc ctgctggctc ctgtggagag caggcagaag atgactatgc tgaccacag 660
gaatacttta atgtcctgag ctacagaagc ctagagagct tcattgctgt atcgaagact 720
ggctaa 726
    
```

40

<210> 30  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45

<220>  
<223> Cebador

ES 2 609 429 T3

<400> 30  
 tccacaggtg tccaggaat tcaccatgca tggctggctg ctc 43

5  
 <210> 31  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10  
 <220>  
 <223> Cebador

<400> 31  
 aggcgcgcct ctagattagc cagtcttoga tacagc 36

15  
 <210> 32  
 <211> 414  
 <212> ADN

20  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido

<400> 32

```

    atgcatggct ggctgctcct ggtctgggctc caggggctga tacaggtgctg cttcctcgct 60
    acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
    tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
    aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtggtgacc tgggggtggca tgtcgcttca 240
    gtcttcagtg atcgggtggg cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
    atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gattttacaag 360
    25 gggagaatat tcttgaaggt ccaagaaagc tcagtggtctc agttccagac tgcc 414
  
```

<210> 33  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30  
 <220>  
 <223> Cebador

35  
 <400> 33  
 tccacaggtg tccaggaat tcaccatgca tggctggctg ctc 43

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

<220>  
 <223> Cebador

45  
 <400> 34  
 agggcttgat tgtgggagat ctgggctcgg cagtctggaa ctgagc 46

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

55  
 <220>  
 <223> Cebador

<400> 35

# ES 2 609 429 T3

ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca gggaaatcgc aagatgagga tatttgctgt 60  
c 61

5 <210> 36  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 36  
gcatggagga cagggctga ttgtgggaga tctgggtctc tcattggag gatgtgc 57

15 <210> 37  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 37  
gcatgaattc gcaagatgcg ctggtgtctc ctc 33

25 <210> 38  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Cebador

35 <400> 38  
atgcagatct gggctcaatc tggaacctgg cacc 34

40 <210> 39  
<211> 414  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Cebador

<400> 39  
atgcatggct ggctgtctct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttctctcgt 60  
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaagggtggc 120  
tctgtcatct tacagtgtca cttctctctc gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180  
aagcagcagg accagcttct ggcattttat agtgttgacc tgggggtggca tgtctcttca 240  
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300  
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctgggtgg gatttacaag 360  
gggagaatat tcttgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgcc 414

50 <210> 40  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Cebador

<400> 40  
ccacaggtgt ccaggaatt cgcaagatgc atggctggct gctc 44

ES 2 609 429 T3

<210> 41  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 10 <400> 41  
 ctcaccaga tccttgcg gcagtctgga actgagc 37  
  
 <210> 42  
 <211> 420  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20  
 <400> 42  
  
 atgogctggt gtctctctct gatctgggcc caggggctga ggcaggctcc cctcgctca 60  
 ggaatgatga caggcacaat agaaacaacg gggaacattt ctgcagagaa aggtggctct 120  
 atcatcttac aatgtcacct ctctccacc acggcacaag tgaccagggt caactgggag 180  
 cagcaggacc agcttctggc catttgtaat gctgacttgg ggtggcacat ctccccatcc 240  
 ttcaaggatc gagtggcccc aggtccccgc ctgggctca cctccagtc gctgaccgtg 300  
 aacgatacag gggagtactt ctgcatctat cacacctacc ctgatgggac gtacactggg 360  
 agaatcttcc tggaggtcct agaaagctca gtggctgagc acggtgccag gttccagatt 420  
  
 25 <210> 43  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Marcador  
  
 <400> 43  
 35 ggtctgaacg acatcttca agctcagaaa atcgaatggc acgaa 45  
  
 <210> 44  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Marcador  
  
 <400> 44  
 45 catcacatc accatcac 18  
  
 <210> 45  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 50 <210> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 55 <400> 45  
 cacaggtgc caggaattc gcaagatgcg ctggtgtctc ctc 43  
  
 <210> 46

ES 2 609 429 T3

<211> 123  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Cebador

<400> 46

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

10

<210> 47  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> Cebador

20

<400> 47  
 ggagtgactg tactggctag aaagaag 27

<210> 48  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

25

<220>  
 <223> Cebador

30

<400> 48  
 gagactcctc aggttcatt cct 23

<210> 49  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

35

<220>  
 <223> Cebador

40

<400> 49  
 agctcagtgg ctgagcacgg tgc 23

45

<210> 50  
 <211> 103  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

50

<220>  
 <223> Cebador

<400> 50

acgcttcctg agatctggtt ccggaggctc cgggtggctcc gacctacaga ggggtgaaaca 60  
 ggagcttctg gaagaggtga agaaggaatt gcagaagtga aag 103

55

<210> 51  
 <211> 103  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

60

ES 2 609 429 T3

<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 51  
5  
aaggcgcgcc tctagatcag tgatggtgat ggtgatggcc accggaaccc ctcagctect 60  
ggacgaaggc ttcaatgatt tctcttttca ctttctgcaa ttc 103  
  
<210> 52  
<211> 47  
10 <212> ADN  
<210> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
15  
<400> 52  
ctcagccagg aatccatgc cgagtgaga cgctccgta gatctgg 47  
  
<210> 53  
<211> 47  
20 <212> ADN  
<210> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
25  
<400> 53  
gggggtgggt acaacccag agctgttta aggcgcgct ctagatc 47  
  
<210> 54  
<211> 290  
<212> PRT  
30 <210> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Dominio de tetramerización VASP  
35  
<400> 54

ES 2 609 429 T3

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

5 <210> 55  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 55

cagggtgccca gggaattcat ataggccggc caccatgcgc tgggtgtctec tectgatctg 60  
 ggcc 64

15 <210> 56  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 56  
 agtctgatgg tggggcgaa cctggcaccg tgc 33

# ES 2 609 429 T3

<210> 57  
<211> 33  
<212> ADN  
5 <210> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

10 <400> 57  
gcacggtgcc aggttcgccc ccaccatcag act 33

<210> 58  
<211> 63  
<212> ADN  
15 <210> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

20 <400> 58

aaccccagag ctgttttaag ggcgcctct agactagaaa ccccttggt ttcaactcc 60  
atg 63

25 <210> 59  
<211> 64  
<212> ADN  
<210> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Cebador

<400> 59

cagggtgccca gggaattcat ataggcggc caccatgcgc tgggtgtctcc tctgatctg 60  
ggcc 64

35

<210> 60  
<211> 63  
<212> ADN  
40 <210> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

45 <400> 60

aaccccagag ctgttttaag ggcgcctct agactagaaa ccccttggt ttcaactcc 60  
atg 63

<210> 61  
<211> 1133  
<212> ADN  
50 <210> Secuencia Artificial

<220>  
<223> zB7R1mFc2 humano

55 <400> 61

ES 2 609 429 T3

```

gaattcgcaa gatgcgctgg tgtctcctcc tgatctgggc ccaggggctg aggcaggctc 60
ccctcgcctc aggaatgatg acaggcacaa tagaaacaac ggggaacatt tctgcagaga 120
aaggtggctc tatcatctta caatgtcacc tctcctccac cacggcacia gtgaccagag 180
tcaactggga gcagcaggac cagcttctgg ccatttgtaa tgctgacttg ggggtggcaca 240
tctccccatc cttcaaggat cgagtggccc caggtecccg cctgggcctc accctccagt 300
cgctgaccgt gaacgataca ggggagtact tctgcatcta tcacacctac cctgatggga 360
cgtacactgg gagaatcttc ctggaggtcc tagaaagctc agtggctgag cacggtgcca 420
ggttccagat tgagcccaga tctcccacia tcaagccctg tctccatgc aatgccag 480
cacctaacct cgagggtgga ccatccgtct tcatcttccc tccaaagatc aaggatgtac 540
tcatgatctc cctgagcccc atagtcacat gtgtgggtgt ggatgtgagc gaggatgacc 600
cagatgtcca gatcagctgg tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa 660
cccatagaga ggattacaac agtactctcc ggggtgtcag tgccctcccc atccagcacc 720
aggactggat gagtggcaaa gctttcgcac gcgcggtcaa caacaaagac ctcccagcgc 780
ccatcgagag aacctctca aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct 840
tgctccacc agaagaagag atgactaaga aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag 900
acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt ggaccaacia cgggaaaaca gagctaaact 960
acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga 1020
gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg 1080
gtctgcacia tcaccacag actaagagct tctcccggac tccgggtaaa taa 1133

```

5 <210> 62  
 <211> 605  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> hzB7R1VASPpZMP21

<400> 62

```

gaattcgcaa gatgcgctgg tgtctcctcc tgatctgggc ccaggggctg aggcaggctc 60
ccctcgcctc aggaatgatg acaggcacia tagaaacaac ggggaacatt tctgcagaga 120
aaggtggctc tatcatctta caatgtcacc tctcctccac cacggcacia gtgaccagag 180
tcaactggga gcagcaggac cagcttctgg ccatttgtaa tgctgacttg ggggtggcaca 240
tctccccatc cttcaaggat cgagtggccc caggtecccg cctgggcctc accctccagt 300
cgctgaccgt gaacgataca ggggagtact tctgcatcta tcacacctac cctgatggga 360
cgtacactgg gagaatcttc ctggaggtcc tagaaagctc agtggctgag cacggtgcca 420
ggttccagat tgagcccaga tctggttccg gaggctccgg tggtccgac ctacagaggg 480
tgaaacagga gcttctggaa gaggtgaaga aggaattgca gaaagtgaaa gaggaaatca 540
ttgaagcctt cgtccaggag ctgaggggtt ccgggtggcca tcaccatcac catcactgat 600
ctaga 605

```

15 <210> 63  
 <211> 1116  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> zB7R1mFc2 Murino

<400> 63

ES 2 609 429 T3

```

atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcget 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatztat agtggtgacc tgggggtggca tgtcgttca 240
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcacctteca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggc ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgcggagccc 420
agatctccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcgagggt 480
ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc 540
ccatagtcga catgtgtggt ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc 600
tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaaccatag agaggattac 660
aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc cccatccagc accaggactg gatgagtggc 720
aaagctttcg catgctgggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccata 780
tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgctcc accagaagaa 840
gagatgacta agaaacaggc cactctgacc tgcattggtc cagacttcat gcctgaagac 900
atctacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca 960
gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac 1020
tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca gtgggtccag aggggtctgca caatcaccac 1080
acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaataa 1116

```

5 <210> 64  
 <211> 582  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> zB7R1VASPpZMP21 Murino  
 <400> 64

```

atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcget 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatztat agtggtgacc tgggggtggca tgtcgttca 240
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcacctteca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggc ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgcggagccc 420
agatctgggt cgggaggctc cgttgggtcc gacctacaga ggggtgaaaca ggagcttctg 480
gaagagggtg agaaggaatt gcagaaagtg aaagagaaa tcattgaagc cttcgtccag 540
gagctgaggg gttccggtgg ccatcaccat caccatcact ga 582

```

15 <210> 65  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 65  
 ggagtgactg tactggctag aaagaag 27

25 <210> 66  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador

35 <400> 66  
 gagactcctc aggtccatt cct 23

<210> 67

ES 2 609 429 T3

<211> 24  
 <212> ADN  
 <210> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador

<400> 67  
 ccttgggaga acagaagcgg agcc 24

10 <210> 68  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 68

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

ES 2 609 429 T3

305						310					315				320
Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp
				325					330					335	
Met	Ser	Gly	Lys	Ala	Phe	Ala	Cys	Ala	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro
			340					345					350		
Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala
		355					360					365			
Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys
	370					375					380				
Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile
385					390					395					400
Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn
				405					410					415	
Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys
			420					425					430		
Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys
		435					440					445			
Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe
	450					455					460				
Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys										
465					470										

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

5

<400> 69

ES 2 609 429 T3

Met	His	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Gln	Gly	Leu	Ile	Gln	Ala
1				5					10					15	
Ala	Phe	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr	Ile	Asp	Thr	Lys	Arg
			20					25					30		
Asn	Ile	Ser	Ala	Glu	Glu	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Leu	Gln	Cys	His	Phe
		35				40						45			
Ser	Ser	Asp	Thr	Ala	Glu	Val	Thr	Gln	Val	Asp	Trp	Lys	Gln	Gln	Asp
	50				55						60				
Gln	Leu	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ser	Val	Asp	Leu	Gly	Trp	His	Val	Ala	Ser
65					70					75					80
Val	Phe	Ser	Asp	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Phe
				85					90						95
Gln	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	Tyr	His
			100					105					110		
Thr	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ile	Tyr	Lys	Gly	Arg	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	Gln
		115					120					125			
Glu	Ser	Ser	Val	Ala	Gln	Phe	Gln	Thr	Ala	Glu	Pro	Arg	Ser	Pro	Thr
	130				135							140			
Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly
145					150					155					160
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met
				165					170						175
Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu
			180					185					190		
Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val
		195					200						205		
His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu
	210					215					220				
Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly
225					230					235					240
Lys	Ala	Phe	Ala	Cys	Ala	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				245					250					255	
Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val
			260					265					270		
Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr
		275					280					285			
Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu
	290					295					300				
Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro
305					310						315				320
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val
				325					330					335	
Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val
			340					345					350		
His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr
		355					360						365		
Pro	Gly	Lys													
	370														

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se unen específicamente con un polipéptido de zB7R1, en donde dicho polipéptido DE zB7R1 consiste en:

- 5
- (i) una secuencia de restos de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 16-140 de la SEQ ID NO: 2;
  - (ii) una secuencia de restos de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con los restos de aminoácidos 27-208 de la SEQ ID NO: 6; o
- 10
- (ii) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7;

en donde dicho anticuerpo estimula la señalización mediada por zB7R1.

2. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha estimulación de zB7R1 se consigue imitando o aumentando la interacción de zB7R1 con su contrarreceptor, tal como en donde el contrarreceptor es CD155.

3. Un método *in vitro* para reducir la actividad de linfocitos T, que comprende poner en contacto un linfocito T positivo para zB7R1 con un agonista de zB7R1, en donde dicho agonista comprende un anticuerpo anti zB7R1 de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, y en donde dicho contacto aumenta la atenuación de al menos una actividad de linfocito T mediada por señalización de zB7R1.

4. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias tales como artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, endotoxemia, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis, enfermedad de Crohn, diverticulosis, asma, pancreatitis, diabetes tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órgano o de médula ósea, traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis, esplenomegalia, enfermedad de injerto contra hospedador, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES) y miastenia grave.

5. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la afección inflamatoria es artritis reumatoide.

6. Una formulación que comprende:

- un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2; y
- un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de artritis reumatoide.