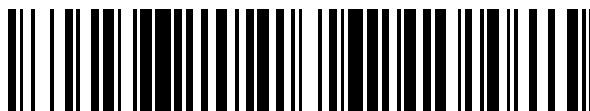


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 683**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2000 PCT/US2000/32583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.0001 WO01039722**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2000 E 00983821 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 1234031**

54 Título: **B7-H1, una nueva molécula inmunorreguladora**

30 Prioridad:

30.11.1999 US 451291

28.08.2000 US 649108

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

14.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHEN, LIEPING

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 629 683 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

B7-H1, una nueva molécula inmunorreguladora.

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 09/451.291 presentada el 30 de noviembre de 1999 y de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 09/649.108 presentada el 28 de agosto de 2000.

5 Antecedentes de la invención

La invención está, en general, en el campo de la inmunorregulación, y concretamente la regulación de la respuesta de células T.

Los linfocitos T de mamíferos reconocen péptidos antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). Los péptidos antígenos se generan por degradación proteolítica de antígenos proteicos dentro de las APC. La interacción de las células T con la APC y la subsiguiente respuesta de las células T son reguladas cualitativa y cuantitativamente por interacciones entre los receptores de la superficie celular de las células T tanto con mediadores solubles como con ligandos en la superficie de APC.

Los documentos post-publicados WO 01/14556 A1 y WO 01/14557 A1 describen moléculas de ácido nucleico aisladas, moléculas de ácido nucleico designadas B7-4, que codifican polipéptidos B7-4. Los polipéptidos B7-4 corresponden a polipéptidos B7-H1 de la presente invención.

Sumario de la invención

La invención se basa en la clonación de moléculas de ADNc humano y de ratón que codifican nuevas moléculas homólogas que coestimulan las respuestas de células T de ambas especies y sobre la caracterización funcional de los polipéptidos que codifican las moléculas de ADNc. El polipéptido humano se denomina hB7-H1 y el polipéptido de ratón mB7-H1. El texto que hace referencia a B7-H1 sin especificar humano frente a ratón se corresponde con ambas formas de B7-H1. La invención presenta polipéptidos hB7-H1, mB7-H1, fragmentos funcionales de los polipéptidos y proteínas de fusión que contienen los polipéptidos. También se incluye en la invención un anticuerpo que se une a un polipéptido B7-H1. La invención presenta procedimientos *in vitro* de coestimular las respuestas de células T, procedimientos de cribado para compuestos que inhiben o potencian las respuestas de células T, y procedimientos *in vitro* para inhibir un efecto coestimulador de hB7-H1. Además, la invención presenta el polipéptido según la invención para su uso como medicamento, un ácido nucleico que codifica ese polipéptido para su uso como medicamento y una célula recombinante para su uso como medicamento así como el uso de una solución o un soporte sólido que comprende el polipéptido según la invención en un tratamiento *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La invención también incorpora un polipéptido B7-H1 aislado para uso como un medicamento cuyo polipéptido está codificado por un ADN que incluye una secuencia de ácido nucleico que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular una célula T y (ii) hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de una secuencia que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. El polipéptido B7-H1 puede incluir una secuencia amino de un resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. La invención también abarca polipéptidos B7-H1 que incluyen una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o cualquiera de estas secuencias de aminoácidos, pero que difieren únicamente en una o más sustituciones conservadoras. Los polipéptidos de la invención incluyen proteínas de fusión que contienen un primer dominio y al menos un dominio adicional. El primer dominio puede ser cualquiera de los polipéptidos B7-H1 descritos anteriormente o un fragmento funcional de cualquiera de estos polipéptidos. El al menos un dominio adicional puede ser una secuencia dirigida heteróloga o líder, una secuencia de aminoácidos que facilita la purificación, detección o solubilidad de la proteína de fusión. El segundo dominio puede ser, por ejemplo, todo o parte de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig). También se incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las proteínas de fusión.

Otra realización de la invención es un procedimiento de coestimular una célula T que implica poner en contacto la célula T con cualquiera de los polipéptidos B7-H1 de la invención, fragmentos funcionales de los mismos o proteínas de fusión de la invención; estas 3 clases de moléculas se denominan, por comodidad, "agentes B7-H1". El contacto puede ser mediante el cultivo de cualquiera de estos agentes B7-H1 con la célula T *in vitro*. Otra realización de la invención es una célula recombinante para uso como un medicamento cuya célula recombinante es la progenie de una célula obtenida de un mamífero y que ha sido transfectada o transformada *ex vivo* con un ácido nucleico que codifica cualquiera de los agentes B7-H1 de modo que la célula expresa el agente B7-H1. La célula puede ser una célula presentadora de antígeno (APC) que expresa el agente B7-H1 en su superficie. Además, la APC puede ser pulsada con un antígeno o un péptido antígeno. Se puede sospechar que el mamífero tiene, por ejemplo, una enfermedad de inmunodeficiencia, un estado inflamatorio o una enfermedad autoinmune. Además, la célula T puede ser una célula T auxiliar, p. ej., una célula T que ayuda a una respuesta efectora (p. ej., un linfocito T citotóxico (CTL) o anticuerpo de célula B). Una respuesta de anticuerpo puede ser, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE o IgA. La coestimulación de una célula T por cualquiera de los agentes B7-H1

puede dar como resultado un aumento en el nivel de ligando CD40 en la superficie de la célula T.

La invención incluye un procedimiento para identificar un compuesto que inhibe una respuesta inmune. El procedimiento implica: proporcionar un compuesto de ensayo; cultivar juntos el compuesto, uno o más agentes de los B7-H1, una célula T y un estímulo activador de células T; y determinar si el compuesto de ensayo inhibe la respuesta de la célula T al estímulo, como una indicación de que el compuesto de prueba inhibe una respuesta inmune. La invención también incorpora un procedimiento para identificar un compuesto que potencia una respuesta inmune. El procedimiento implica: proporcionar un compuesto de ensayo; cultivar, juntos, el compuesto, uno o más de los agentes B7-H1, una célula T y un estímulo activador de células T; y determinar si el compuesto de ensayo potencia la respuesta de la célula T al estímulo, como una indicación de que el compuesto de ensayo potencia una respuesta inmune. En ambos de estos procedimientos, el estímulo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un receptor de células T o a un polipéptido CD3. Alternativamente, el estímulo puede ser un aloantígeno o un péptido antígeno unido a una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC). La APC puede ser transfectada o transformada con un ácido nucleico codificante del agente B7-H1 y el agente B7-H1 puede expresarse en la superficie de la APC.

La invención también presenta un antisuero que comprende un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo policlonal o monoclonal) que se une específicamente a un polipéptido con la SEQ ID NO: 1.

"Polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente y significan cualquier cadena de aminoácidos enlazada a péptidos, independientemente de la longitud o de la modificación postraducciona. La invención también presenta polipéptidos B7-H1 con sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

La expresión polipéptido o fragmento peptídico "aislado" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido o un fragmento peptídico que o bien no tiene una contrapartida natural (p. ej., un peptidomimético), o se ha separado o purificado de componentes que lo acompañan de forma natural, p. ej., en tejidos tales como páncreas, hígado, bazo, ovario, testículo, músculo, tejido articular, tejido neuronal, tejido gastrointestinal o fluidos corporales tales como sangre, suero u orina. Típicamente, el polipéptido o fragmento peptídico se considera "aislado" cuando está al menos 70 %, en peso en seco, exento de las proteínas y de las moléculas orgánicas de origen natural con las que se asocia de forma natural. Preferiblemente, una preparación de un polipéptido (o fragmento peptídico del mismo) de la invención es al menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 %, y lo más preferiblemente al menos 99 %, en peso seco, el polipéptido (o un fragmento peptídico del mismo), respectivamente, de la invención. Así, por ejemplo, una preparación de polipéptido x es al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, y lo más preferiblemente al menos un 99 %, en peso seco, polipéptido x. Dado que un polipéptido que es químicamente sintetizado está, por su naturaleza, separado de los componentes que lo acompañan, de forma natural, el polipéptido sintético o ácido nucleico está "aislado".

Un polipéptido aislado (o fragmento peptídico) de la invención puede obtenerse, por ejemplo, por extracción de una fuente natural (p. ej., de tejidos humanos o fluidos corporales); por expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el péptido; o por síntesis química. Un péptido que se produce en un sistema celular diferente de la fuente de la que se origina de forma natural está "aislado", porque se separará de los componentes que de forma natural lo acompañan. El grado de aislamiento o pureza se puede medir por cualquier procedimiento apropiado, p. ej., cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis por HPLC.

Un "ADN aislado" significa ADN exento de uno o ambos de los genes que flanquean el gen que contiene el ADN de interés en el genoma del organismo en el que se produce de forma natural el gen que contiene el ADN de interés. Por lo tanto, el término incluye un ADN recombinante incorporado en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte. También incluye una molécula separada tal como: un ADNc donde el ADN genómico correspondiente tiene intrones y, por lo tanto, una secuencia diferente; un fragmento genómico; un fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); un fragmento de restricción; un ADN que codifica una proteína no se produce de forma natural, una proteína de fusión o un fragmento de una proteína dada; o un ácido nucleico que es una variante degenerada de un ácido nucleico que se produce de forma natural. Además, incluye una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. También se incluye un ADN recombinante que incluye una porción de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. De lo anterior será evidente que el ADN aislado no significa un ADN presente de cientos a millones de otras moléculas de ADN dentro, por ejemplo, de bibliotecas de ADNc o de ADN genómico o de digestiones de restricción de ADN genómico en, por ejemplo, una mezcla de reacción de digestión de restricción o una rebanada de gel electroforético.

Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido que "coestimula" una célula T es un polipéptido que, tras la interacción con una molécula de superficie celular en la célula T, potencia la respuesta de la célula T. La respuesta de las células T que resulta de la interacción será mayor que la respuesta en ausencia del polipéptido. La respuesta de la célula T en ausencia del polipéptido coestimulador puede ser ninguna respuesta o puede ser una respuesta significativamente menor que en presencia del polipéptido coestimulador. Se entiende que la respuesta de la célula T puede ser una respuesta efectora (por ejemplo CTL o célula B productora de anticuerpo), una respuesta

auxiliar que proporciona ayuda a una o más respuestas efectoras (p. ej., CTL o células B productoras de anticuerpos) o una respuesta supresora.

Tal como se usa en el presente documento, un "estímulo activador" es una molécula que suministra una señal activadora a una célula T, preferiblemente a través del receptor de células T específico del antígeno (TCR). El estímulo activador puede ser suficiente para provocar una respuesta detectable en la célula T. Alternativamente, la célula T puede requerir coestimulación (p. ej., mediante un polipéptido B7-H1) con el fin de responder detectablemente al estímulo activador. Ejemplos de estímulos activadores incluyen, sin limitación, anticuerpos que se unen al TCR o a un polipéptido del complejo CD3 que está físicamente asociado con el TCR sobre la superficie de las células T, aloantígenos o un péptido antígeno unido a una molécula del MHC.

Tal como se usa en el presente documento, un "fragmento" de un polipéptido B7-H1 es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido de longitud completa. En general, los fragmentos tendrán cinco o más aminoácidos de longitud. Un fragmento antígeno tiene la capacidad de ser reconocido y unido por un anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, un "fragmento funcional" de un polipéptido B7-H1 es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido de longitud completa y tiene la capacidad de coestimular una célula T. Los procedimientos para establecer si un fragmento de una molécula B7-H1 es funcional son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos de interés pueden hacerse mediante procedimientos recombinantes, sintéticos o digestivos proteolíticos. Tales fragmentos pueden después ser aislados y ensayados para determinar su capacidad para coestimular células T mediante procedimientos descritos en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ligado operativamente" significa incorporado en un constructo genético de manera que las secuencias de control de expresión controlan eficazmente la expresión de una secuencia que codifica interés.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere no sólo a moléculas de anticuerpo enteras, sino también a fragmentos de unión a antígenos, p. ej., Fab, F(ab')₂, Fv y fragmentos Fv de cadena sencilla. También se incluyen anticuerpos quiméricos.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a un polipéptido B7-H1 aislado codificado por un ADN que incluye una secuencia de ácido nucleico que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular una célula T y (ii) hibrida bajo condiciones rigurosas al complemento de una secuencia que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, es un anticuerpo que no se une a polipéptidos B7-1 o B7-2.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto corriente en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, el presente documento, incluidas las definiciones, prevalecerá. Los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación, aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención.

Otras características y ventajas de la invención, p. ej., potenciar las respuestas inmunitarias en sujetos mamíferos, serán evidentes a partir de la descripción siguiente, de los dibujos y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADNc (SEQ ID NO: 5) que incluye la secuencia codificante (nucleótidos 73-942 de SEQ ID NO: 5) (SEQ ID NO: 2) de hB7-H1.

La Fig. 2a es una representación de la secuencia de aminoácidos de hB7-H1 (SEQ ID NO: 1). Se indican el péptido señal, el dominio similar a Ig-V, el dominio similar a Ig-C y el dominio transmembrana ("TM"). Los sitios potenciales de glicosilación ligados a N están indicados por *.

La Fig. 2b es una representación de las secuencias de aminoácidos de los dominios extracelulares de hB7-H1 (SEQ ID NO: 10), B7-1 humano (hB7-1; SEQ ID NO: 11) y B7-2 humano (hB7-2; SEQ ID NO: 12) alineados para obtener la máxima homología. Los restos de aminoácidos idénticos están sombreados en negrita y los restos conservados están en cajas. Los restos de cisteína conservados se indican con *.

La Fig. 3 es una fotografía de una transferencia de Northern que muestra la expresión del ARNm de hB7-H1 en diversos tejidos humanos.

La Fig. 4 es una serie de histogramas de citometría de flujo con fluorescencia bidimensionales que muestran la expresión en la superficie celular de hB7-H1 sobre células T CD3+ en reposo y activadas, células B CD19+ y monocitos CD14+.

La Fig. 5a es una serie de histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran la unión de CTLA-4Ig, ICOSIg y anticuerpo específico para hB7-H1 para las células 293 transfectadas bien con un vector de control (células "Mock (simuladas)/293") o bien con un vector que contiene un inserto de ADNc que codifica hB7-H1 (células

"hB7-H1/293") o células Raji.

La Fig. 5b es una serie de histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran la unión de hB7-H1Ig y anticuerpo a CD28 a células Jurkat.

5 La Fig. 6a es un gráfico de líneas que muestra la capacidad de hB7-H1Ig inmovilizada para coestimular la respuesta proliferativa de células T humanas a anticuerpos inmovilizados específicos para CD3 humano.

La Fig. 6b es un gráfico de líneas que muestra la capacidad de hB7-H1Ig soluble para coestimular la respuesta proliferativa de células T humanas a PBMC alogénicas irradiadas.

10 Las Fig. 7a-7d son una serie de gráficos de líneas que muestran la capacidad de hB7-H1Ig, B7-1Ig humano o anticuerpo específico para CD28 humano para coestimular la producción de interleucina(IL)-10 (Fig. 7a), interferón- γ (IFN- γ) (Fig. 7b), IL-2 (Fig. 7c) o IL-4 (Fig. 7d) por células T humanas que responden a anticuerpos inmovilizados específico para CD3. La Fig. 7e es un gráfico de líneas que muestra la capacidad de diversas concentraciones de hB7-H1Ig para coestimular la producción de IL-2 por células T humanas que responden a anticuerpos inmovilizados específicos para CD3.

15 La Fig. 8a es un gráfico de barras que muestra la capacidad del anticuerpo específico para IL-2 humana para inhibir la proliferación de células T humanas inducidas por el anticuerpo específico para CD3 humano y coestimulado por células COS transfectadas con, y que expresan, hB7-H1 o B7-1.

La Fig. 8b es un gráfico de barras que muestra la capacidad del anticuerpo específico para IL-2 humana para inhibir la producción de IL-10 por células T humanas estimuladas por anticuerpo inmovilizado específico para CD3 humano y coestimulado bien por hB7-H1Ig o bien por B7-1Ig.

20 La Fig. 9a es una serie de perfiles bidimensionales de citometría de flujo con fluorescencia que muestran la proporción relativa de células T en apoptosis temprana (anexina V positiva, yoduro de propidio (IP) negativo) y tardía (anexina V positiva, IP positivo) después de la activación por anticuerpo inmovilizado específico para CD3 humano y coestimulación con Ig de control o hB7-H1Ig.

25 La Fig. 9b es una serie de perfiles de citometría de flujo con fluorescencia que muestran la expresión de Fas y FasL en células T humanas tras la activación por anticuerpos inmovilizados específicos para CD3 humano y coestimulación con Ig de control o hB7-H1Ig.

La Fig. 10 es una representación de la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica mB7-H1 (SEQ ID NO: 4).

La Fig. 11 es una representación de la secuencia de aminoácidos de mB7-H1 (SEQ ID NO: 3).

30 La Fig. 12a es una representación de la secuencia de aminoácidos de mB7-H1 (SEQ ID NO: 3) alineada con la secuencia de aminoácidos de hB7-H1 (SEQ ID NO: 1). Se indican el péptido señal, el dominio similar a IgV, el dominio similar a IgC, el dominio transmembrana ("TM") y el dominio citoplasmático ("citoplasmático") de mB7-H1.

35 La Fig. 12b es una representación de las secuencias de aminoácidos de mB7-H1, B7-1 de ratón (mB7-1; SEQ ID NO: 13), B7-2 de ratón (mB7-2; SEQ ID NO: 14) y mB7h/B7KF-1 (SEQ ID NO: 15) alineados para máxima homología. Los restos de aminoácidos idénticos están sombreados y los restos de aminoácidos conservados están en cajas. Los restos de cisteína conservados se indican con *.

La Fig. 13 es una serie de histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran niveles relativos de expresión en la superficie celular de mB7-H1 sobre células T CD3+ de ratón en reposo y activadas, células B B220+ de ratón y macrófagos Mac-1+ de ratón.

40 La Fig. 14a es un gráfico de líneas que muestra la capacidad de varias concentraciones de mB7-H1Ig inmovilizada o Ig de control inmovilizada para coestimular la respuesta proliferativa *in vitro* de células T de ratón a una dosis subóptima de anticuerpo inmovilizado específico para CD3 de ratón.

45 La Fig. 14b es un par de gráficos de líneas que muestran la capacidad de mB7-H1Ig inmovilizada, Ig de control inmovilizada o anticuerpo soluble específico de CD28 de ratón para coestimular la respuesta proliferativa *in vitro* del ratón C57BL/6 de tipo salvaje ("wt") (gráfico de la izquierda) o las células T de ratón C57BL/6 deficientes en CD28 (CD28^{-/-}) (gráfico de la derecha) para dos dosis subóptimas de anticuerpo inmovilizado específico de CD3 de ratón.

La Fig. 14c es un gráfico de barras que muestra la capacidad de mB7-H1Ig inmovilizado o de Ig de control inmovilizada para coestimular la respuesta proliferativa *in vitro* de células T de ratón CD4+ o CD8+ purificadas a una dosis subóptima de anticuerpo inmovilizado específico de CD3 de ratón.

50 La Fig. 15a es una serie de gráficos de líneas que muestran la capacidad de mB7-H1Ig inmovilizada, de Ig de control inmovilizada o de anticuerpo soluble específico de CD28 de ratón ("Anti-CD28") para coestimular la producción *in vitro* (en los días uno, dos y tres después del inicio de los cultivos) de diversas citocinas mediante células T C57BL/6 de ratón en respuesta al anticuerpo inmovilizado específico para CD3 de ratón.

La Fig. 15b es un gráfico de líneas que muestra el efecto de mB7-H1Ig inmovilizada en la producción *in vitro* (18, 24, 36 y 48 horas después del inicio de los cultivos) de IL-2 mediante células T C57BL/6 de ratón que responden al anticuerpo inmovilizado específico del CD3 de ratón y coestimulado mediante anticuerpo soluble específico de CD28 ("Anti-CD28") de ratón.

- 5 La Fig. 16a y la Fig. 16b son histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran falta de expresión en la superficie de B7-1 murino (Fig. 16a) y mB7-H1 (Fig. 16b) sobre células P815 transfectadas con un vector de expresión de control ("mock.P815").

- 10 La Fig. 17a y la Fig. 17b son histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran la expresión en la superficie de B7-1 murino (Fig. 17a) y falta de expresión en la superficie de mB7-H1 (Fig. 17b) sobre células P815 transfectadas con un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica B7-1 ("mB7-1⁺ P815").

- 15 La Fig. 18a y la Fig. 18b son histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran falta de expresión en la superficie de mB7-1 (Fig. 18a) y que muestran la expresión en la superficie de mB7-H1 (Fig. 18b) sobre células P815 transfectadas con un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica mB7-H1 ("mB7-H1⁺ P815").

La Fig. 19a y la Fig. 19b son gráficos de líneas que muestran la velocidad de crecimiento de tumores P815 en ratones DBA/2 inyectados subcutáneamente con células P815 transfectadas con un vector de expresión control (Fig. 19a) o un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica mB7-H1 (Fig. 19b).

- 20 La Fig. 20a es un par de gráficos de líneas que muestran la capacidad de las células P815 de control simuladamente transfectadas ("mock.P815"), células P815 transfectadas con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADNc que codifica mB7-H1 ("mB7-H1⁺ P815") o células P815 transfectadas con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADNc que codifica mB7-1 ("mB7-1⁺ P815") para activar CTL de ratón C57BL/6 aloespecífico *in vitro*. Las poblaciones de células efectoras se ensayaron para determinar la actividad citotóxica (" % de Lisis") para diversas relaciones de células efectoras frente a células diana (E/T) contra las células diana P815 de tipo salvaje (gráfico a la izquierda) y EL4 de control (gráfico a la derecha).

- 25 La Fig. 20b es un par de gráficos de líneas que muestran la capacidad de las células P815 de control transfectadas con testigo ("mock. P815"), células P815 transfectadas con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADNc que codifica mB7-H1 ("mB7-H1⁺ P815") o células P815 transfectadas con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADNc que codifica mB7-1 ("mB7-1⁺ P815") para activar CTL de ratón DBA/2 específico de tumor *in vivo*. Las poblaciones de células efectoras se ensayaron para determinar la actividad citotóxica (" % de Lisis") para diversas relaciones E/T frente a las células diana de P815 de tipo salvaje (a la izquierda del gráfico) y de control L1210 (a la derecha del gráfico).

- 30 La Fig. 21 es un par de gráficos de líneas que muestran las respuestas proliferativas *in vitro* a diversas concentraciones de hemocianina de lapa californiana (KLH) de drenaje de células T de nódulo linfático (gráfico a la izquierda) o bazo (gráfico a la derecha) de C57BL/6 inmunizadas intraperitonealmente (i.p.) con trinitrofenol (TNP) conjugado con KLH (TNP-KLH) en adyuvante de Freund incompleto y posteriormente inyectado i.p. con mB7-H1Ig o Ig de control.

- 35 La Fig. 22 es una serie de gráficos de barras que muestran los niveles relativos (medidos por ELISA) de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgM específicos para TNP en los sueros de ratones C57BL/6 inyectados i.p. con TNP-KLH en solución salina tamponada con fosfato y o bien Ig de control, mB7-H1Ig o bien mB7-1Ig.

- 40 La Fig. 23a es una serie de histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran los niveles relativos de expresión en la superficie celular del ligando CD40 (CD40L) (medida por la unión de un anticuerpo específico para CD40L de ratón ("anti-CD40L")) sobre células T CD4⁺ de ratón purificadas (a 4 y 24 horas después del inicio de los cultivos) activadas por anticuerpo inmovilizado específico para CD3 ("anti-CD3") de ratón revestido sobre los fondos de los pocillos de cultivo de tejidos a una concentración de 200 ng/ml y coestimulado por Ig de control inmovilizada, mB7-H1Ig inmovilizada, o anticuerpo soluble específico para CD28 ("anti-CD28") de ratón.

- 45 La Fig. 23b es una serie de histogramas de citometría de flujo con fluorescencia que muestran los niveles relativos de expresión de la superficie celular del ligando CD40 (CD40L) (medida por la unión de un anticuerpo específico para CD40L ("anti-CD40L")) de ratón sobre células T CD4⁺ purificadas (a 4 y 24 horas después del inicio de los cultivos) activado por anticuerpo inmovilizado específico para CD3 de ratón ("anti-CD3") revestido sobre los fondos de los pocillos de cultivo de tejidos a una concentración de 1.000 ng/ml y coestimulado por Ig de control inmovilizada, mB7-H1Ig inmovilizada, o anticuerpo soluble específico para CD28 de ratón ("anti-CD28").

Descripción detallada

- 55 Utilizando cebadores de PCR con secuencias derivadas de una etiqueta de secuencia expresada (EST) que tenía una homología significativa con B7-1 y B7-2 humana y una biblioteca de ADNc humano como una fuente de molde, se identificaron secuencias de ADNc correspondientes a regiones de un transcrito 5' y 3' de la EST. A continuación

se generó una molécula de ADNc (SEQ ID NO: 5) que incluía un marco de lectura abierto (ORF, en inglés) (SEQ ID NO: 2) que codifica una nueva molécula relacionada con B7 usando cebadores de PCR con secuencias derivadas de los extremos 3' y 5' y se clonó.

5 La traducción de la secuencia de ADNc indicó que el polipéptido (SEQ ID NO: 1) que codificó (hB7-H1) es una proteína transmembrana de tipo I de 290 aminoácidos que contiene un dominio similar a inmunoglobulina (Ig) V, un dominio similar a Ig C, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de 30 aminoácidos. El análisis de transferencia Northern mostró una fuerte expresión del gen que codifica hB7-H1 en corazón, músculo esquelético, placenta y pulmón, y una expresión débil en timo, bazo, riñón e hígado. La expresión era indetectable en cerebro, colon, intestino delgado y células mononucleares de la sangre periférica (PBMC).

10 Utilizando un antisuero producido por inmunización de ratones con una proteína de fusión producida de forma recombinante que incluía la proteína hB7-H1, la expresión por citometría de flujo con fluorescencia indicó una expresión despreciable en células T y B en reposo. Por otra parte, aproximadamente 16 % de los monocitos CD14+ expresaron constitutivamente la molécula en su superficie. La activación de las células T aumentó la expresión de tal manera que aproximadamente el 30 % expresaron la hB7-H1 en la superficie celular. La activación dio como resultado aproximadamente 90 % de los monocitos que expresan hB7-H1, pero sólo aproximadamente el 6 % de células B lo expresaban después de la activación.

La transfección de células 293 dio como resultado una línea celular que expresaba hB7-H1 (hB7-H1/293) que se usó para experimentos de unión. Estos experimentos y otros con una línea de células que expresan CD28 indicaron que ni CTLA4, ICOS, ni CD28 eran receptores para hB7-H1.

20 Los experimentos *in vitro* con células T humanas aisladas y la proteína de fusión que contiene hB7-H1 indicaron que hB7-H1 no tenía actividad directa sobre las células T, potenció ("coestimuló") las respuestas proliferativas de células T inducidas por ambos anticuerpos específicos para los aloantígenos de CD3 y MHC humanos. Esta actividad coestimuladora fue significativamente más potente cuando el hB7-H1 se inmovilizó en los pocillos de plástico de cultivo de tejido utilizados para los cultivos que cuando lo estaba en forma de solución. Experimentos similares indicaron que hB7-H1 tenía un efecto potenciador drástico y selectivo en la producción de interleucina(IL)-10 inducida por la activación de células T. Además, esta actividad de potenciación de IL-10 parecía depender de al menos pequeñas cantidades de IL-2. El análisis de células T activadas por anticuerpo anti-CD3 y hB7-H1Ig indicó que hB7-H1 mejora la apoptosis y la expresión de Fas y FasL.

30 Además, utilizando una estrategia similar a la usada para clonar ADNc de hB7-H1, se clonó una molécula de ADNc que contenía un ORF que codifica el B7-H1 de ratón (mB7-H1), se obtuvo la secuencia de nucleótidos del ORF (SEQ ID NO: 4), y se derivó la secuencia de aminoácidos de la secuencia codificada (SEQ ID NO: 3). La mB7-H1 es exactamente de la misma longitud (290 aminoácidos) y tiene la misma estructura de dominio que hB7-H1. Además, mB7-H1 tiene una distribución de tejido similar a hB7-H1. La mB7-H1 co-estimuló la respuesta de células T de ratón con su efecto que era más potente sobre CD4+ que sobre células T CD8+. Además, al igual que hB7-H1, mB7-H1 coestimula la producción de altos niveles de IL-10 mediante células T. La mB7-H1 también potenció la producción tanto de interferón- γ (IFN- γ) como el factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) mediante células T. Aunque mB7-H1 no mostró capacidad significativa para potenciar las respuestas de CTL, aumentó en gran medida las respuestas de anticuerpos y, en particular, las respuestas de anticuerpo IgG2a. Por último, la coestimulación de las células T con mB7-H1 causó un aumento en el nivel de ligando CD40 (CD40L) sobre la superficie de las células T.

45 La B7-H1 puede ser útil como un aumentador de las respuestas inmunitarias (p. ej., respuestas de célula T auxiliar y de anticuerpo) tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, a la vista de (a) su capacidad para potenciar selectivamente la producción de IL-10, (b) su capacidad para potenciar la apoptosis, y (c) su expresión en placenta y en pulmón, ambos órganos normalmente protegidos de respuestas innecesarias inmunitarias e inflamatorias mediadas por células, la B7-H1 puede ser útil en el control de estados patológicos mediados por células (p. ej., los inducidos por agentes infecciosos tales como *Mycobacterium tuberculosis* o *M. leprae*) u otras respuestas patológicas mediadas por células tales como las implicadas en enfermedades autoinmunes (p. ej., artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS) o diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM)).

Moléculas de ácido nucleico B7-H1

50 Las moléculas de ácido nucleico B7-H1 de la invención pueden ser ADNc, ADN genómico, ADN sintético, o ARN, y pueden ser de cadena doble o de una sola cadena (es decir, una cadena sentido o una antisentido). Los segmentos de estas moléculas también se consideran dentro del alcance de la invención y pueden ser producidos, por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o ser generados por tratamiento con una o más endonucleasas de restricción. Una molécula de ácido ribonucleico (ARN) puede ser producida por transcripción *in vitro*.

55 Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico codifican polipéptidos que, independientemente de su longitud, son solubles en condiciones fisiológicas normales. De forma natural, las formas de membrana no serían solubles.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden contener secuencias que aparecen de forma natural o secuencias que difieren de las que aparecen de forma natural, pero, debido a la degeneración del código genético,

codifican el mismo polipéptido (por ejemplo, los polipéptidos con SEQ ID NOS: 1 y 3). Además, estas moléculas de ácido nucleico no están limitadas a secuencias codificantes, p. ej., pueden incluir algunas o todas las secuencias no codificantes que se encuentran aguas arriba o aguas abajo de una secuencia codificante. Incluyen, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico con SEQ ID NO: 5.

- 5 Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden sintetizar (por ejemplo, mediante síntesis basada en fosforamidita) u obtenidas a partir de una célula biológica, tal como la célula de un mamífero. Así, los ácidos nucleicos pueden ser los de un humano, primate no humano (p. ej., mono), ratón, rata, conejillo de indias, vaca, oveja, caballo, cerdo, conejo, perro o gato.

- 10 Además, las moléculas de ácido nucleico de la invención aisladas abarcan segmentos que no se encuentran como tales en el estado natural. Así, la invención abarca moléculas de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican hB7-H1 o mB7-H1) incorporadas en un vector (por ejemplo, un plásmido o un vector vírico) o en el genoma de una célula heteróloga (o en el genoma de una célula homóloga, en una posición distinta de la localización cromosómica natural). Las moléculas de ácido nucleico recombinante y sus usos se comentan adicionalmente más adelante.

- 15 Ciertas moléculas de ácido nucleico de la invención son moléculas antisentido o son transcritas en moléculas antisentido. Estas pueden usarse, por ejemplo, para regular a la baja la traducción del ARNm B7-H1 dentro de una célula.

- 20 Las técnicas asociadas con la detección o regulación de genes son bien conocidas por los expertos en la técnica y dichas técnicas pueden usarse para diagnosticar y/o tratar trastornos asociados con la expresión aberrante de B7-H1. Las moléculas de ácido nucleico de la invención se comentan más adelante en el contexto de su utilidad terapéutica.

- 25 Se puede identificar un gen o proteína de la familia B7-H1 basado en su similitud con el gen o proteína B7-H1 correspondiente, respectivamente. Por ejemplo, la identificación se puede basar en la identidad de secuencia. La invención presenta moléculas de ácido nucleico aisladas que son al menos 50 % (o 55 %, 65 %, 75 %, 85 %, 95 % o 98 %) idénticas a: (a) una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o 3; (b) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o 4; o (c) una molécula de ácido nucleico que incluye un segmento de al menos 30 (p. ej., al menos 50, 60, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800 u 865) nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

- 30 La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se lleva a cabo utilizando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90, 5873-5877, 1993. Tal algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a ácidos nucleicos que codifican B7-H1. Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a B7-H1. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, se utilizó Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402. Cuando se utilizan programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y NBLAST) (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

- 40 La hibridación también se puede usar como una medida de homología entre dos secuencias de ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico que codifica B7-H1, o una parte de la misma, se puede usar como sonda de hibridación según técnicas de hibridación estándar. La hibridación de una sonda B7-H1 para ADN de una fuente de ensayo (por ejemplo, una célula de mamífero) es una indicación de la presencia de ADN B7-H1 en la fuente de ensayo. Las condiciones de hibridación son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 6.3.1-6.3.6, 1991. Las condiciones de hibridación moderadas se definen como equivalentes a la hibridación en 2X de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 30 °C, seguido por uno o más lavados en 1X SSC, SDS al 0,1 % a 50-60 °C. Las condiciones muy rigurosas se definen como equivalentes a la hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 50-65 °C.

- 50 La invención también abarca: (a) vectores que contienen cualquiera de las secuencias codificantes relacionadas con B7-H1 anteriores y/o sus complementos (es decir, secuencia "antisentido"); (b) vectores de expresión que contienen cualquiera de las secuencias codificantes relacionadas con B7-H1 anteriores asociadas operativamente con cualquier elemento regulador de la transcripción/traducción (cuyos ejemplos se dan a continuación) necesarios para la expresión directa de las secuencias codificantes; (c) vectores de expresión que contienen, además de secuencias que codifican un polipéptido B7-H1, secuencias de ácido nucleico que no están relacionadas con secuencias de ácido nucleico que codifican B7-H1, tales como moléculas que codifican un reportero, marcador o un péptido señal, p. ej., fusionado con B7-H1; y (d) células anfitrionas diseñadas genéticamente que contienen cualquiera de los vectores de expresión anteriores y expresan de este modo las moléculas de ácido nucleico de la invención.

Las moléculas de ácido nucleico recombinante pueden contener una secuencia que codifica hB7-H1 o mB7-H1, o

B7-H1 que tiene una secuencia señal heteróloga. El polipéptido B7-H1 de longitud completa, un dominio de B7-H1, o un fragmento de los mismos se pueden fusionar con polipéptidos adicionales, como se describe más adelante. De forma similar, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden codificar la forma madura de B7-H1 o una forma que incluye un polipéptido exógeno que facilita la secreción.

Los elementos reguladores de transcripción/traducción mencionados anteriormente y que se describen adicionalmente más adelante, incluyen, pero no se limitan a, promotores, potenciadores, operadores y otros elementos, inducibles y no inducibles, que son conocidos por los expertos en la técnica, y que conducen o, si no, regulan la expresión génica. Tales elementos reguladores incluyen pero no se limitan al gen temprano inmediato del citomegalovirus hCMV, a los promotores tempranos o tardíos del adenovirus SV40, al sistema *lac*, al sistema *trp*, al sistema *TAC*, al sistema *TRC*, las regiones principales de operador y promotor del fago A, las regiones de control de la proteína de la capa fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato-cinasa, los promotores de la fosfatasa ácida y los promotores de los factores de apareamiento α de levaduras.

De manera similar, el ácido nucleico puede formar parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales, por ejemplo, secuencias que funcionan como un marcador o reportero. Ejemplos de genes marcadores o reporteros incluyen β -lactamasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), adenosina desaminasa (ADA), aminoglucósido fosfotransferasa (*neo^r*, G418^r), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina cinasa (TK), *lacZ* (que codifica β -galactosidasa) y xantina guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Como con muchos de los procedimientos estándar asociados con la práctica de la invención, los expertos en la técnica estarán al tanto de reactivos útiles adicionales, por ejemplo, secuencias adicionales que pueden servir a la función de un marcador o reportero. Generalmente, el polipéptido híbrido incluirá una primera porción y una segunda porción; siendo la primera porción un polipéptido B7-H1 y siendo la segunda porción, por ejemplo, el reportero descrito anteriormente o una región constante de Ig o una parte de una región constante de Ig, p. ej., los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG2a.

Los sistemas de expresión que se pueden usar para los fines de la invención incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófago, ADN plásmido o ADN cósmido que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinantes de levaduras que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención (que contienen preferiblemente la secuencia de ácido nucleico que codifica B7-H1 (p. ej., la contenida en SEQ ID NO: 1 o 3)); sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, baculovirus) que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformadas con vectores de expresión recombinantes de plásmidos (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de nucleótidos B7-H1; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI38 y NIH 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus y el promotor 7.5K del virus de la vacuna). También son útiles como células anfitrionas las células primarias o secundarias obtenidas directamente de un mamífero, transfectadas con un vector plásmido o infectadas con un vector vírico.

Polipéptidos y fragmentos de polipéptidos

Los polipéptidos de la invención incluyen hB7-H1, mB7-H1 y fragmentos funcionales de estos polipéptidos. Los polipéptidos adoptados por la invención también incluyen proteínas de fusión que contienen un polipéptido B7-H1 como se define en las reivindicaciones, fusionado con la secuencia de aminoácidos no vinculada. Las secuencias no vinculadas pueden ser dominios funcionales adicionales o péptidos señal. Los péptidos señal se describen con mayor detalle, y se ejemplifican, más adelante. Los polipéptidos pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente pero con una o más (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 12, 14, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más) sustituciones conservadoras.

En el presente documento se describen polipéptidos que pueden purificarse a partir de fuentes naturales (p. ej., sangre, plasma sérico, tejidos o células tales como células T o cualquier célula que produzca de forma natural B7-H1). Los péptidos más pequeños (menos de 50 aminoácidos de longitud) también se pueden sintetizar convenientemente por medios químicos estándar. Además, tanto los polipéptidos como los péptidos pueden producirse mediante técnicas estándar de ADN recombinante *in vitro* y recombinación *in vivo*/recombinación genética (p. ej., transgénesis), utilizando las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos o péptidos apropiados. Pueden usarse procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias de codificación correspondientes y señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.) [Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989] y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, [Green Publishing Associates y Wiley Interscience, NY, 1989].

Los polipéptidos y fragmentos de la invención también incluyen los descritos anteriormente, pero modificados para uso *in vivo* mediante la adición, en los extremos terminales de amino- y/o carboxilo-, de un agente bloqueante para

facilitar la supervivencia del polipéptido correspondiente *in vivo*. Esto puede ser útil en aquellas situaciones en las que los terminales de péptidos tienden a ser degradados por proteasas antes de la captación celular. Tales agentes bloqueantes pueden incluir, sin limitación, secuencias peptídicas adicionales vinculadas o no vinculadas que se pueden unir a los restos terminales de amino y/o carboxilo del péptido a administrar. Esto puede hacerse químicamente durante la síntesis del péptido o mediante tecnología de ADN recombinante por procedimientos conocidos por artesanos de habilidad media.

Alternativamente, los agentes bloqueantes tales como ácido piroglutámico u otras moléculas conocidas en la técnica pueden unirse a los restos terminales amino y/o carboxilo, o el grupo amino en el extremo amino o el grupo carboxilo en el extremo carboxilo puede ser sustituido por un resto diferente. Del mismo modo, los péptidos se pueden acoplar covalentemente o no covalentemente a proteínas "portadoras" farmacéuticamente aceptables antes de la administración.

También son de interés los compuestos peptidomiméticos que se diseñan basándose en las secuencias de aminoácidos de los fragmentos peptídicos funcionales. Los compuestos peptidomiméticos son compuestos sintéticos que tienen una conformación tridimensional (es decir, un "resto peptídico") que es sustancialmente igual que la conformación tridimensional de un péptido seleccionado. El resto peptídico proporciona el compuesto peptidomimético con la capacidad de coestimular células T de una manera cualitativamente idéntica a la del fragmento de péptido funcional B7-H1 del que se derivó el peptidomimético. Los compuestos peptidomiméticos pueden tener características adicionales que potencian su utilidad terapéutica, tal como una permeabilidad celular aumentada y una semivida biológica prolongada.

Los peptidomiméticos tienen típicamente una cadena principal que es parcial o completamente no peptídica, pero con grupos laterales que son idénticos a los grupos laterales de los restos de aminoácidos que se producen en el péptido en el que se basa el peptidomimético. Varios tipos de enlaces químicos, p. ej., éster, tioéster, tioamida, retroamida, enlaces reducidos de carbonilo, dimetileno y cetometileno, se conocen en la técnica para ser sustitutos generalmente útiles de enlaces peptídicos en la construcción de peptidomiméticos resistentes a proteasas.

Procedimientos de coestimulación de una célula T

Los procedimientos de la invención implican poner en contacto una célula T con un polipéptido B7-H1 de la invención, o un fragmento funcional del mismo, con el fin de coestimular la célula T. Dichos polipéptidos o fragmentos funcionales pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de tipo salvaje o pueden contener una o más (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 12, 14, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más) sustituciones conservadoras. El contacto puede ocurrir antes, durante o después de la activación de la célula T. El contacto de la célula T con el polipéptido B7-H1 será preferiblemente sustancialmente al mismo tiempo que la activación. La activación puede ser, por ejemplo, exponiendo la célula T a un anticuerpo que se une al TCR o a uno de los polipéptidos del complejo CD3 que está físicamente asociado con el TCR. Alternativamente, la célula T puede estar expuesta a un aloantígeno (p. ej., un aloantígeno de MHC) sobre, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno (APC) (p. ej., una célula dendrítica, un macrófago, un monocito o una célula B) o un péptido antígeno producido por procesamiento de un antígeno de proteína por cualquiera de las APC anteriores y presentado a la célula T por moléculas de MHC en la superficie de la APC. La célula T puede ser una célula T CD4+ o una célula T CD8+. La molécula B7-H1 puede añadirse a la solución que contiene las células, o puede expresarse en la superficie de una APC, p. ej., una APC que presenta un aloantígeno o un péptido antígeno unido a una molécula de MHC. Alternativamente, si la activación es *in vitro*, la molécula B7-H1 puede unirse al suelo de un recipiente de cultivo correspondiente, p. ej., un pocillo de una placa de microtitulación de plástico.

Los procedimientos pueden realizarse *in vitro*. La aplicación *in vitro* de B7-H1 puede ser útil, por ejemplo, en estudios científicos básicos de mecanismos inmunes o para la producción de células T activadas para su uso en estudios sobre la función de las células T o, por ejemplo, inmunoterapia pasiva. Además, B7-H1 se podría añadir a ensayos *in vitro* (p. ej., en ensayos de proliferación de células T) diseñados para ensayar la inmunidad a un antígeno de interés en un sujeto del que se obtuvieron las células T. Se esperaría que la adición de B7-H1 a tales ensayos diera como resultado una respuesta *in vitro* más potente y, por lo tanto, más fácilmente detectable.

Las proteínas B7-H1 y sus variantes son generalmente útiles como agentes terapéuticos estimuladores de la respuesta inmune. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden usarse para el tratamiento de estados de enfermedad caracterizados por inmunosupresión: p. ej., cáncer, SIDA o complejo relacionado con SIDA, otros estados inducidos víricamente o ambientalmente, y ciertas deficiencias inmunitarias congénitas. Los compuestos también se pueden emplear para aumentar la función inmunitaria que ha sido alterada por el uso de radioterapia de fármacos inmunosupresores tales como ciertos agentes quimioterapéuticos y, por lo tanto, son particularmente útiles cuando se administran conjuntamente con tales fármacos o radioterapia. Además, en vista de la capacidad de B7-H1 para coestimular la producción de niveles especialmente altos de IL-10, pueden usarse moléculas B7-H1 para tratar estados que implican respuestas inmunitarias celulares, por ejemplo, afecciones inflamatorias, p. ej., las Inducidas por agentes infecciosos tales como *Mycobacterium tuberculosis* o *M. leprae*, u otras respuestas patológicas mediadas por células tales como las implicadas en enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS) o diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM)).

Enfoques *In Vivo*

En un enfoque *in vivo*, al sujeto se administra el propio polipéptido B7-H1 (o un fragmento funcional del mismo). Generalmente, los compuestos de la invención se suspenderán en un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina fisiológica) y se administrarán por vía oral o por infusión intravenosa o se inyectarán por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonar. Se suministran preferiblemente directamente a un tejido linfóide apropiado (p. ej., bazo, nódulo linfático o tejido linfóide asociado a mucosa (MALT)). La dosis requerida depende de la elección de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, de la naturaleza de la enfermedad del paciente, del tamaño, del peso, de la superficie específica, de la edad y del sexo del sujeto, de otros fármacos que se administran y del criterio del médico interviniente. Las dosis adecuadas están en el intervalo de 0,01-100,0 µg/kg. Se esperan amplias variaciones en la dosificación necesaria en vista de la variedad de polipéptidos y fragmentos disponibles y de las diferentes eficacias de varias rutas de administración. Por ejemplo, será esperable que la administración oral requiera dosis más altas que la administración por inyección i.v.. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas estándar para la optimización como bien se sabe en la técnica. Las administraciones pueden ser simples o múltiples (p. ej., 2- o 3-, 4-, 6-, 8-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150- o más veces). La encapsulación del polipéptido en un vehículo de administración adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de la administración, particularmente por administración oral.

Alternativamente, un polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido B7-H1 o el fragmento funcional se puede administrar a una célula apropiada del animal. La expresión de la secuencia codificante se dirigirá preferiblemente al tejido linfóide del sujeto mediante, por ejemplo, la administración del polinucleótido al tejido linfóide. Esto puede conseguirse mediante, por ejemplo, el uso de un vehículo de administración de micropartículas o microcápsulas biodegradables poliméricas, dimensionado para optimizar la fagocitosis por células fagocíticas tales como macrófagos. Por ejemplo, pueden usarse micropartículas de PLGA (poli-lacto-co-glicolida) de aproximadamente 1-10 µm de diámetro. El polinucleótido está encapsulado en estas micropartículas, que son absorbidas por macrófagos y poco a poco biodegradadas dentro de la célula, liberando así el polinucleótido. Una vez liberado, el ADN es expresado dentro de la célula. Se pretende que un segundo tipo de micropartícula no sea absorbido directamente por células, sino que sirva principalmente como un depósito de liberación lenta de ácido nucleico que sea absorbido por células sólo después de la liberación de la micropartícula a través de la biodegradación. Por lo tanto, estas partículas poliméricas deben ser lo suficientemente grandes para impedir la fagocitosis (es decir, mayor de 5 µm y preferiblemente mayor de 20 µm).

Otra forma de conseguir la captación del ácido nucleico consiste en usar liposomas, preparados por procedimientos estándares. Los vectores se pueden incorporar solos en estos vehículos de administración o co-incorporarse con anticuerpos específicos de tejido. Alternativamente, se puede preparar un conjugado molecular compuesto de un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina por fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor en células diana [Cristiano et al. (1995), *J. Mol. Med.* 73, 479]. Alternativamente, el acceso específico del tejido linfóide puede conseguirse mediante el uso de elementos reguladores transcripcionales específicos de tejido linfóide (TRE) tales como un linfocito B, un linfocito T o un TRE específico de células dendríticas. Se conocen TRE específicos del tejido linfóide [Thompson et al., (1992), *Mol. Cell. Biol.* 12, 1043-1053; Todd et al., (1993), *J. Exp. Med.* 177, 1663-1674; Penix et al. (1993), *J. Exp. Med.* 178, 1483-1496]. La administración de "ADN desnudo" (es decir, sin un vehículo de administración) a un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo, es otro medio para lograr la expresión *in vivo*.

En los polinucleótidos correspondientes (p. ej., vectores de expresión), la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido B7-H1 o el fragmento funcional de interés con una metionina iniciadora y, opcionalmente, una secuencia de acceso está operativamente unida a una combinación de promotor o de promotor-potenciador.

Las secuencias de aminoácidos cortas pueden actuar como señales para dirigir las proteínas a compartimentos intracelulares específicos. Por ejemplo, péptidos señal hidrófobos (p. ej., MAISGVPVLGFFIIAVLMSAQESWA (SEQ ID NO: 6)) se encuentran en el extremo amino de proteínas destinadas a la ER. Aunque la secuencia KFERQ (SEQ ID NO: 7) (y otras secuencias estrechamente vinculadas) es conocida por dirigir polipéptidos intracelulares a lisosomas, otras secuencias (p. ej., MDDQRDLISNNEQLP (SEQ ID NO: 8) dirigen polipéptidos a endosomas. Además, se ha demostrado que la secuencia peptídica KDEL (SEQ ID NO: 9) actúa como una señal de retención para la ER. Cada uno de estos péptidos señal, o una combinación de los mismos, puede usarse para el tráfico de los polipéptidos B7-H1 o fragmentos funcionales de la invención según se desee. Los ADN que codifican los polipéptidos B7-H1 o los fragmentos funcionales que contienen señales de acceso se generarán por PCR u otras técnicas estándar de ingeniería genética o de síntesis.

Un promotor es un TRE compuesto de una región de una molécula de ADN, típicamente dentro de 100 pares de bases aguas arriba del punto en donde comienza la transcripción. Los potenciadores proporcionan especificidad de expresión en términos de tiempo, ubicación y nivel. A diferencia de un promotor, un potenciador puede funcionar cuando está localizado a distancias variables desde el sitio de transcripción, siempre que esté presente un promotor. También se puede colocar un potenciador aguas abajo del sitio de iniciación de la transcripción. Para llevar una secuencia codificante bajo el control de un promotor, es necesario situar el sitio de iniciación de la traducción del marco de lectura de la traducción del péptido o polipéptido entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos

aguas abajo (3') del promotor. La secuencia codificante del vector de expresión está operativamente ligada a una región de terminación de la transcripción.

Vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos y vectores víricos tales como el virus herpes, retrovirus, virus vacuna, virus vacuna atenuados, virus de la viruela del canario, adenovirus y virus adeno-asociados, entre otros.

- 5 Los polinucleótidos se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano, p. ej., una solución salina fisiológica. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del polinucleótido que es capaz de producir un resultado médicamente deseable (p. ej., una respuesta de célula T potenciada) en un animal tratado. Como es bien conocido en las técnicas médicas, la dosificación para un paciente cualquiera depende de muchos factores, que incluye el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente. Las dosificaciones variarán, pero una dosificación preferida para la administración de polinucleótido es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de polinucleótido. Esta dosis se puede administrar repetidamente, según sea necesario. Las vías de administración pueden ser cualquiera de las enumeradas anteriormente.

Enfoques *Ex Vivo*

- 20 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) pueden ser retiradas del paciente o un donante adecuado y expuestas *ex vivo* a un estímulo activador (véase anteriormente) y un polipéptido B7-H1 o fragmento polipeptídico (ya sea en forma soluble o unido a un soporte sólido por metodologías estándares). Las PBMC que contienen células T muy activadas se introducen a continuación en el mismo paciente o en uno diferente.

- 25 Una estrategia *ex vivo* alternativa puede implicar la transfección o transducción de células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifican secuencias de polipéptido B7-H1 o ácido nucleico que codifica un fragmento funcional descritas anteriormente. Las células transfectadas o transducidas se devuelven después al sujeto. Aunque tales células serían preferiblemente células hematopoyéticas (p. ej., células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas o células B), también podrían ser cualesquiera de una amplia gama de tipos que incluyen, sin limitación, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares en los que actúan como una fuente del polipéptido B7-H1 o fragmento funcional mientras sobrevivan en el sujeto. El uso de células hematopoyéticas, que incluyen las APC anterior, sería particularmente ventajoso ya que se esperaría que tales células alojaran, entre otros, tejido linfóide (p. ej., nódulos linfáticos o bazo) y, de ese modo, el polipéptido B7-H1 o el fragmento funcional se producirían en gran concentración en el sitio donde ejercen su efecto, es decir, potenciación de una respuesta inmune. Además, si se usan las APC, las APC que expresan la molécula B7-H1 exógena puede ser las mismas APC que presentan un aloantígeno o péptido antígeno a la célula T correspondiente. La B7-H1 puede ser secretada por las APC o expresada en su superficie. Antes de devolver las APC recombinantes al paciente, pueden exponerse opcionalmente a fuentes de antígenos o péptidos antígenos de interés, p. ej., los de tumores, microorganismos infecciosos o autoantígenos. Los mismos constructos genéticos y secuencias de tráfico descritas para el enfoque *in vivo* se pueden usar para esta estrategia *ex vivo*. Además, las células tumorales, preferiblemente obtenidas de un paciente, se pueden transfectar o transformar mediante un vector que codifica un polipéptido B7-H1 o un fragmento funcional del mismo. Las células tumorales, preferiblemente tratadas con un agente (p. ej., irradiación ionizante) que destruye su capacidad proliferativa, son luego devueltas al paciente donde, debido a su expresión del B7-H1 exógeno (en su superficie celular o por secreción), pueden estimular respuestas inmunitarias potenciadas de células T tumorocidas. Se entiende que las células tumorales que, después de la transfección o de la transformación, se inyectan en el paciente, pueden haberse obtenido también originalmente de un individuo distinto del paciente.

- 45 Los procedimientos *ex vivo* incluyen las etapas de cosecha de células de un sujeto, cultivar las células, transducción de ellas con un vector de expresión y mantener las células en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido B7-H1 o fragmento funcional. Estos procedimientos son conocidos en la técnica de la biología molecular. La etapa de transducción se lleva a cabo mediante cualquier medio estándar utilizado para terapia génica *ex vivo*, incluido el fosfato de calcio, lipofección, electroporación, infección vírica y transferencia génica biolística. Alternativamente, pueden usarse liposomas o micropartículas poliméricas. Las células que se han transducido con éxito se seleccionan entonces, por ejemplo, por expresión de la secuencia codificante o de un gen resistente a fármacos. Las células pueden entonces ser irradiadas letalmente (si se desea) e inyectadas o implantadas en el paciente.

Procedimientos de cribado de compuestos que inhiben o potencian respuestas inmunológicas

- 55 La invención proporciona procedimientos para ensayar compuestos (moléculas pequeñas o macromoléculas) que inhiben o potencian una respuesta inmune. Tal procedimiento puede implicar, p. ej., cultivar un polipéptido B7-H1 de la invención (o un fragmento funcional del mismo) con células T en presencia de un estímulo de células T (véase anteriormente). Los polipéptidos B7-H1 útiles incluyen aquellos con secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de tipo salvaje o pueden contener una o más (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 12, 14, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más) sustituciones conservadoras. El polipéptido

B7-H1 puede estar en solución o unido a la membrana (p. ej., expresado en la superficie de las células T) y puede ser natural o recombinante. Los compuestos que inhiben la respuesta de células T serán probablemente compuestos que inhiben una respuesta inmune mientras que aquellos que potencian la respuesta de células T serán probablemente compuestos que potencian la respuesta inmune.

- 5 La invención se refiere también al uso de B7-H1 o fragmentos funcionales del mismo para cribar compuestos inmunomoduladores que pueden interactuar con B7-H1. Un experto en la técnica sabría cómo utilizar el modelado molecular estándar u otras técnicas para identificar moléculas pequeñas que se unirían a sitios interactivos de células T de B7-H1. Uno de tales ejemplos se proporciona en Broughton (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 392-398.

- 10 Un compuesto candidato cuya presencia requiere al menos 1,5 veces (p. ej., 2 veces, 4 veces, 6 veces, 10 veces, 150 veces, 1.000 veces, 10.000 veces o 100.000 veces) más B7-H1 con el fin de alcanzar un nivel arbitrario definido de activación de células T que en ausencia del compuesto puede ser útil para inhibir una respuesta inmune. Por otra parte, un compuesto candidato cuya presencia requiere al menos 1,5 veces (por ejemplo, 2 veces, 4 veces, 6 veces, 10 veces, 100 veces, 1.000 veces, 10.000 veces o 100.000 veces) menos B7-H1 para lograr un nivel arbitrario definido de activación de células T que en ausencia del compuesto puede ser útil para potenciar una respuesta
- 15 inmune. Los compuestos capaces de interferir con, o modular, la función B7-H1 son buenos candidatos para agentes inmunorreguladores inmunosupresores, p. ej., para modular una respuesta autoinmune o suprimir el rechazo del injerto alogénico o xenogénico.

Anticuerpos B7-H1

- 20 La invención presenta anticuerpos que se unen a uno cualquiera o ambos de los polipéptidos B7-H1 o fragmentos de tales polipéptidos. Tales anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales presentes en el suero o plasma de animales (p. ej., ratones, conejos, ratas, conejillos de indias, ovejas, caballos, cabras, vacas o cerdos) que han sido inmunizados con el polipéptido B7-H1 o fragmento peptídico correspondiente usando procedimientos, y opcionalmente adyuvantes, conocidos en la técnica. Tales anticuerpos policlonales se pueden aislar a partir de suero o plasma por procedimientos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales que se unen a los
- 25 polipéptidos o fragmentos anteriores están también incorporados por la invención. Los procedimientos de fabricación y cribado de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica.

- Una vez que se ha seleccionado y clonado el hibridoma productor de anticuerpo deseado, el anticuerpo resultante puede producirse mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el hibridoma puede cultivarse *in vitro* en un medio adecuado durante un período de tiempo adecuado, seguido por la recuperación del
- 30 anticuerpo deseado a partir del sobrenadante. El período de tiempo y el medio son conocidos o pueden ser determinados fácilmente.

- Además, los anticuerpos recombinantes específicos para B7-H1, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos mediante técnicas de
- 35 ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando procedimientos descritos en Robinson et al., publicación de patente internacional PCT/US86/02269; Akira et al., solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, solicitud de patente europea 171.496; Morrison et al., solicitud de patente europea 173.494; Neuberger et al., solicitud PCT WO 86/01533; Cabilly et al., patente de EE.UU. N° 4.816.567; Cabilly et al., solicitud de patente europea 125.023; Better et al., (1988) *Science* 240, 1041-43; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139, 3521-26; Sun et al., (1987) *PNAS* 84, 214-18; Nishimura et al., (1987) *Canc. Res.* 47, 999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314, 446-49; Shaw et al., (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1553-59; Morrison, (1985) *Science* 229, 1202-07; Oi et al., (1986) *BioTechniques* 4, 214; Winter, patente de EE.UU. N° 5.225.539; Jones et al., (1986) *Nature* 321, 552-25; Veroeyan et al., (1988) *Science* 239, 1534; y Beidler et al., (1988) *J. Immunol.* 141, 4053-60.
- 40

- También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos de anticuerpos y derivados que contienen al menos la porción funcional del dominio de unión al antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a B7-H1. Los fragmentos de anticuerpo que contienen el dominio de unión de la molécula pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a: fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse por digestión con pepsina de moléculas de anticuerpo; fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de fragmentos F(ab')₂; y fragmentos Fab que pueden ser generados por tratamiento
- 50 de moléculas de anticuerpo con papaína y un agente reductor. Véase, p. ej., National Institutes of Health, 1 Current Protocols In Immunology, Coligan et al., ed. 2.8, 2.10 (Wiley Interscience, 1991). Los fragmentos de anticuerpo también incluyen fragmentos Fv (p. ej., Fv de cadena sencilla (scFv)), es decir, productos de anticuerpo en los que no hay restos de aminoácidos de región constante. Tales fragmentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.642.334 que se incorpora en el presente documento por referencia en su
- 55 totalidad.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, no limitar, la invención.

Ejemplo 1. Materiales y Procedimientos

Clonación del ADNc de hB7-H1 y construcción de proteínas de fusión de Ig. Los extremos 5' y 3' del ADNc de hB7-

H1 se amplificaron por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de placenta humana sintetizada por el kit de síntesis de ADNc de PCR SMART (Clontech, Palo Alto, CA). Los pares de cebadores utilizados para la PCR se derivaron del plásmido de la biblioteca de placenta y del clon AA292201 de la etiqueta de secuencia expresada (EST). Un clon de ADNc que incluía un ORF que codifica ADNc de hB7-H1 se amplificó por PCR a partir de la misma biblioteca de ADNc mediante cebadores específicos y se clonó en el vector pcADN3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenció. Las secuencias de aminoácidos de hB7-H1, B7-1 y B7-2 se analizaron utilizando el algoritmo ClustalW con la matriz BLOSUM 30 (MacVector, Oxford Molecular Group). La proteína de fusión hB7-H1lg se preparó fusionando el dominio extracelular de hB7H-1 al dominio CH2-CH3 de IgG2a de ratón en el plásmido de expresión pmIgV y el constructo resultante se transfectó en células CHO. También se usó un procedimiento análogo para la preparación de las proteínas de fusión B7-1lg, CTLA4lg e ICOSlg. Las proteínas de fusión se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo mediante el paso sobre columnas de afinidad Protein G-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y las proteínas de fusión purificadas se dializaron en PBS exenta de endotoxinas.

Transfección de ADN. Los plásmidos que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican hB7-H1 de longitud completa (pcADN3-hB7-H1), B7-1 (pCDM8-B7.1) o vectores parentales de control sin secuencias codificantes se transfectaron en células 293 o células COS mediante fosfato de calcio o transfección de DEAE-Dextrano (Promega, Madison, WI). Después de 48 horas de incubación, los niveles de expresión de hB7-H1 o B7-1 en transfectantes se determinaron mediante citometría de flujo con fluorescencia (FFC) con un antisuero específico para hB7-H1 o anticuerpo monoclonal anti-B7-1 (mAb) (PharMingen), respectivamente.

Ratones y líneas celulares. Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 (B6), DBA/2 y BALB/c del National Cancer Institute (Frederick, MD). Los ratones CD28^{-/-} con un fondo genético B6 fueron generosamente proporcionados por el Dr. Moses Rodrigues (Departament of Immunology, Mayo Clinic, Rochester, MN). Mastocitoma P815, linfoma L1210, linfoma de células T de ratón EL4 y células epiteliales 293 de riñón humano se adquirieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las líneas celulares se mantuvieron en un medio completo que contenía RPMI-1640 (Life Technologies, Rockville, MD) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (HyClone, Logan, UT), HEPES 25 mM, penicilina G (100 U/ml) y sulfato de estreptomycin (100 µg/ml).

Ensayos de células T y citocinas. Para los estudios con células T humanas, se aislaron PBMC de la sangre de donantes voluntarios humanos sanos mediante centrifugación por gradiente de Ficoll-Hypaque. Las PBMC se pasaron a través de una columna de lana de nailon para obtener células T purificadas (~85 % de células CD3⁺) o se sometieron a purificación adicional (>95 % de células CD3⁺) usando un sistema de esferas magnéticas MACS anti-CD4/8 (Miltenyl Biotec, Alemania). Para los ensayos de coestimulación, células T purificadas a una concentración de 1×10^5 células/pocillo se cultivaron por triplicado en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de microtitulación de fondo plano que fueron pre-revestidas durante la noche con anticuerpo específico para CD3 humano (HIT3a, PharMingen, Palo Alto, CA) y bien hB7-H1lg (5 µg/ml) o Ig de control (proteína de fusión purificada de IgG2a de ratón o 4-1BBlg de murino). En algunos experimentos, los pocillos de microtitulación se revistieron sólo con anticuerpo específico para CD3 y se usaron células COS transfectadas con B7-1 o hB7-H1 (10^4 células/pocillo) como fuente de las moléculas coestimuladoras. Para medir la producción de citocinas, se recogieron los sobrenadantes a las 24, 48 y 72 horas después del inicio de los cultivos y se determinaron las concentraciones de IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-10 mediante ELISA sándwich (PharMingen) según la instrucciones del fabricante. Se incluyeron pocillos que contenían B7-1lg o anticuerpo específico para CD28 humano (CD28.2, PharMingen) para comparación o como un control positivo, respectivamente. La proliferación de células T se determinó mediante la adición de 1,0 µCi de [³H]-timidina por pocillo al día 2 seguido por al menos 18 horas de cultivo adicional. La [³H]-timidina incorporada se determinó usando un contador de centelleo líquido Trilux MicroBeta (Wallac, Finlandia).

Para ensayos de reacción de linfocitos mixtos (MLR), se co-cultivaron células T humanas purificadas (2×10^5 células/pocillo) por triplicado con PBMC humanas alogénicas (irradiadas con 4.000 rad) a 2×10^5 células/pocillo en presencia de hB7-H1lg soluble o Ig de control. Cuatro días después, la proliferación de células T se determinó por incorporación de [³H]-timidina. Se añadió mAb neutralizante específico para la IL-2 humana (Clon MQ1-17H12, PharMingen) a 8 µg/ml al comienzo de los cultivos de células T. La polimixina B (10 µg/ml) se incluyó también en los ensayos de proliferación celular y secreción de citocinas para neutralizar completamente cualquier endotoxina contaminante.

Para los estudios con células T de ratón, las células T se purificaron pasando células de nódulo linfático o bazo a través de una columna de lana de nailon. Las células T CD4⁺ o CD8⁺ se seleccionaron positivamente mediante clasificación magnética usando mAb conjugado con FITC contra CD4 o CD8 y microesferas revestidas con anticuerpo específico para isotiocianato de fluoresceína (FITC) (MiltenylBiotec, Auburn, CA) según las instrucciones del fabricante. La pureza de las células T CD4⁺ y CD8⁺ aisladas era >95 % por FFC con mAb específico para CD4 y CD8 de ratón, respectivamente. Las células T purificadas a 2×10^6 /ml a partir de bazos de ratón se cultivaron en placas de 96 pocillos que fueron pre-revestidas con mAb específico para CD3 de ratón en presencia de mB7-H1lg o IgG2a de ratón de control ("Ig de control") también revestido sobre los fondos de los pocillos de cultivo. Se utilizó mAb específico para CD28 de ratón (2,5 µg/ml) en forma soluble como un coestimulador positivo de control. La proliferación de células T se determinó mediante la incorporación de [³H]-timidina (1,0 µCi/pocillo) añadida 15 h antes de la cosecha de los cultivos de 3 días. La incorporación de [³H]-timidina se determinó mediante un contador de centelleo líquido Trilux MicroBeta (Wallac, Turku, Finlandia). Para detectar citocinas, los sobrenadantes se

recogieron entre las 18 y las 72 horas de cultivo y las concentraciones de IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-4 y GM-CSF se midieron mediante ELISA sándwich según las instrucciones del fabricante (PharMingen).

Análisis de ácidos nucleicos. El análisis de transferencia Northern de ARN humano se llevó a cabo utilizando membranas de transferencia Northern de tejido múltiple humano comercialmente disponibles (Clontech, Palo Alto, CA). Las membranas se incubaron en solución de hibridación ExpressHyb (Clontech) durante 30 min a 68 °C. La sonda de ADNc cebada al azar era ADNc que codifica hB7-H1 de longitud completa (870 pb) marcada usando [³²P]-dCTP. Como control se usó una sonda de ADNc de β -actina humana marcada con ³²P (2,0 kb). La hibridación se llevó a cabo durante 1 hora a 68 °C, las membranas se lavaron 3 veces en 2 x SSC que contenía SDS al 0,05 %, y después se expusieron a -80 °C a película de rayos X.

La distribución de tejido de ARNm de mB7-H1 se llevó a cabo utilizando membranas de transferencia de punto de ARN de ratón de tejido múltiple comercialmente disponibles (Clontech) según las instrucciones del fabricante. La sonda de ADNc cebada al azar era ADNc que codifica mB7-H1 de longitud completa y se etiquetó usando [³²P]-dCTP. La hibridación se realizó durante 16 h a 65 °C. Después de lavar cuatro veces con 2x SSC que contenía SDS al 0,05 %, las membranas se expusieron a -80 °C a películas de rayos X.

Anticuerpos y proteínas de fusión. Se prepararon anticuerpos de conejo frente a la proteína mB7-H1 mediante Cocalico Biologicals (Reamstown, PA) por inmunización de conejos con un péptido hidrófilo conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH) que abarca los aminoácidos 95-119 de mB7-H1 ("péptido 95-119") (GNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYG) (SEQ ID NO: 16). El anticuerpo policlonal se purificó a partir de suero de conejo usando una columna de afinidad que contenía material de matriz insoluble conjugado con el péptido 95-119. Ambos análisis ELISA y FFC de células COS transfectadas con un vector de expresión que contenía ADNc que codifica mB7-H1 demostraron que el anticuerpo policlonal se unía específicamente a mB7-H1. El mAb purificado específico para CD3 de ratón y CD28 de ratón y mAb conjugado con FITC específico para CD4 de ratón, CD8 de ratón y CD40L de ratón, mAb conjugado con ficoeritrina (PE) específico para CD3 de ratón, B220 de ratón y Mac-1 de ratón se adquirieron de PharMingen (San Diego, CA). El anticuerpo de cabra conjugado con FITC específico para IgG de conejo se adquirió de Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). La IgG de conejo y la IgG de hámster purificadas se adquirieron de Rockland (Gilbertsville, PA).

Para preparar la proteína de fusión mB7-H1Ig, ADNc que codifica el dominio extracelular mB7-H1 se generó por RT-PCR usando el cebador sentido 5'-CAGGAATTCACCATGAGGATATTTGCTG-3' (SEQ ID NO: 17) y el cebador antisentido 5'-CATCAGATCTATGTGAGTCCTGTTCTGTG-3' (SEQ ID NO: 18) de ARNm de células T de ratón. Después de la digestión con EcoRI y BglII, los productos de PCR se fusionaron con el dominio CH2-CH3 de la cadena pesada de IgG2a de ratón en el plásmido de expresión pmlgV [Dong et al., (1999) *Nature Med.* 5, 1365-1369]. El plásmido resultante, pmB7-H1Ig, se transfectó en células CHO. Las células transfectadas de forma estable se cultivaron en medios de CHO sin suero (Life Technologies). El mB7-H1Ig en los sobrenadantes se purificó usando una columna de proteína G-Sepharose (Pierce, Rockford, IL) y se dializó en PBS exento de LPS. La concentración de endotoxina era menor que 1 pg/mg de proteína purificada según los ensayos de lisado de amebocitos de *Limulus* (CAPE COD, Woods Hoke, MA). La proteína de fusión mB7-1Ig que contiene el dominio extracelular de mB7-1 fusionado al dominio CH2-CH3 de la cadena pesada de IgG-2a de ratón se preparó por un procedimiento análogo.

Análisis de citometría de flujo con fluorescencia. Para preparar un antisuero específico para hB7-H1, los ratones fueron inmunizados con hB7-H1Ig purificado emulsionado en adyuvante de Freund completo (Sigma) y se reforzaron tres veces con hB7-H1Ig en adyuvante de Freund incompleto. Se recogió el suero y se determinó la especificidad por ELISA y por tinción FACS (dilución 1:1.000) de células 293 transfectadas con ADNc hB7-H1 o células COS. Como control se utilizó preinyección con suero de ratón.

Para preparar células T y B humanas activadas, se activaron PBMC humanas recién aisladas (10×10^6 células/ml) con 5 μ g/ml de PHA (Sigma) o 10 μ g/ml de LPS (Sigma), respectivamente. Para la preparación de monocitos activados, se cultivaron PBMC adherentes en 1.500 UI/ml de IFN- γ humano recombinante (Biosource, Camarillo, CA) y 100 ng/ml de LPS. Todos los cultivos se cosecharon y analizaron a las 48 horas. Para tinción por inmunofluorescencia directa, las células T se incubaron a 4 °C con 1 μ g de mAb conjugado con fluoresceína (FITC) o con ficoeritrina (PE) durante 30 minutos y se analizaron mediante citometría de flujo FACSscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) con el software Cell Quest software (Becton Dickinson) como se describió anteriormente. El mAb específico para CD3 (UCHT1), CD4 (RPA-T4), CD8 (RPA-T8), CD14 (M5E2), CD19 (B43), CD28 (CD28.2), CD80 (BB1) se adquirieron de PharMingen. Para la tinción con inmunofluorescencia indirecta, las células se incubaron primero con anticuerpo anti-hB7-H1 (1:1.000), 5 μ g de ICOSlg o CTLA4Ig a 4 °C. Después de 30 minutos, las células se lavaron y se incubaron adicionalmente con F(ab')₂ de cabra de IgG anti-humano o anti-ratón, conjugado con FITC (Biosource, Camarillo, CA) o con PE (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) durante 30 minutos a 4 °C. Como Ig de control se usó la proteína IgG1 humana o de ratón (Sigma) o 4-1BBIg de ratón (dominio extracelular 4-1BB de ratón fusionado con el Fc de IgG1 humana o IgG2a de ratón). En algunos experimentos, los receptores Fc se bloquearon mediante Ig humana o de ratón antes de la incubación con mAb conjugados con FITC o PE.

Para el análisis de inmunofluorescencia indirecta de células de ratón, las células se incubaron con los anticuerpos a

4 °C durante 30 minutos en presencia de mAb bloqueante específico para CD16/32 (receptor Fc) (Pharmingen). Las células se lavaron y se incubaron adicionalmente con IgG anti-conejo conjugada con FITC. Las células fueron teñidas después con mAb conjugado con PE específico para CD3 de ratón, B220 de ratón o Mac-1 de ratón. La fluorescencia se analizó con un citómetro de flujo FACS Calibur y se analizó con el software Cell Quest (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Para preparar células T de ratón activadas, células T de ratón purificadas con lana y nailon (>75 % de células CD3⁺) a una concentración de 2×10^6 /ml se cultivaron con mAb específico para CD28 de ratón (5 µg/ml) y CD3 de ratón (5 µg/ml). Para la preparación de células B de ratón activadas, se cultivaron esplenocitos de ratón con LPS (10 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO). Los macrófagos de ratón se obtuvieron a partir de las cavidades peritoneales de ratones que habían sido inyectados con tioglicolato 7 días antes. Para la activación, las células de exudado peritoneal de ratón (PEC) se cultivaron con IFN- γ (10 U/ml) y LPS (100 ng/ml). Todos los cultivos se cosecharon y las células se analizaron a las 48 h. Para detectar la expresión de CD40L, las células T CD4⁺ se purificaron por clasificación magnética (véase anteriormente), se cultivaron como se indica, y se incubaron con mAb conjugado con FITC a CD40L.

Generación de linfocitos T citotóxicos (CTL). Para generar actividad de CTL específica de aloantígeno *in vitro*, células T purificadas con lana de nailon ($2,5 \times 10^6$ /ml) de esplenocitos B6 se estimularon en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos con células ($2,5 \times 10^5$ /ml) mock.P815 irradiadas (10.000 rad), mB7-1⁺ P815 o mB7-H1⁺ P815 durante 5 días. Después de la estimulación del día 5, se midieron las actividades de CTL frente a P815 (H-2^d) y EL4 (H-2^b) en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr [Chen et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179, 523-532; Li et al. (1996) *J. Exp. Med.* 183, 639-644].

Para generar actividad *in vivo* de CTL específica de tumor, se inocularon subcutáneamente (s.c.) ratones DBA/2 con 1×10^6 células mock.P815, mB7-1⁺ P815, o mB7-H1⁺ P815. Los nódulos linfáticos drenantes se retiraron 7-10 d después de la inyección del tumor y las células de los nódulos linfáticos suspendidas (3×10^6 /ml) se volvieron a estimular en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos con células P815 de tipo salvaje (3×10^5 /ml) irradiadas (10.000 rad) durante 5 días. Las células se cosecharon y su actividad CTL se midió en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr frente a células diana tumorales P815 de tipo salvaje.

Inducción y ensayo *in vivo* de anticuerpo específico de TNP. El trinitrofenol (TNP) conjugado con KLH (TNP-KLH, 100 µg/ratón) (Biosearch Technologies, Novato, CA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) se inyectó i.p. en ratones B6 en el día 0. En los días 1 y 4, los ratones se inyectaron i.p. con 100 µg de Ig de control, mB7-1Ig, o mB7-H1Ig. Los sueros se recogieron los días 7 y 14. Para medir los anticuerpos específicos de TNP en los sueros, 0,3 mg/ml de TNP-BSA (Biosearch Technologies) se revistieron sobre los fondos de los pocillos de las placas ELISA de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Los sitios de unión no específicos en las placas de ELISA se bloquearon con FBS al 10 % en PBS durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado a fondo, las muestras (diluidas por 1/200-1/2.000 con PBS) se añadieron y se incubaron durante 2 h. Las placas se lavaron después y a los pocillos se añadieron anticuerpos de rata con biotina específicos para IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón (PharMingen). Las placas se incubaron adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, a los pocillos se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y las soluciones se midieron en todos los pocillos. A los pocillos se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (Sigma). Se midió la DO₄₅₀ de las soluciones en todos los pocillos.

Proliferación de células T en respuesta a KLH. Ratones B6 se inmunizaron con 100 µg de TNP-KLH en IFA s.c. o en PBS i.p. en el día 0 y se inyectaron i.p. con 100 µg de mB7-H1Ig o de Ig de control en los días 1 y 4. Para detectar respuestas de células T a KLH, los nódulos linfáticos drenantes y bazo se extrajeron de los ratones inmunizados el día 7 y 14, respectivamente. Las células de nódulos linfáticos o bazo en suspensión se cultivaron con KLH a 1,56-100 µg/ml como se indicó. La proliferación de células T en respuesta a KLH se determinó mediante la adición de 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina 15 h antes de la cosecha de los cultivos el día 3. Se midió la incorporación de [³H]-timidina con un contador de centelleo líquido TriLux MicroBeta (Wallac).

Ejemplo 2. Clonación molecular y patrón de expresión del gen hB7-H1

Una búsqueda de homología de la base de datos EST de ADNc humana usando secuencias de aminoácidos B7-1 y B7-2 humanas publicadas reveló una secuencia EST (GeneBank n.º AA292201) que codifica un homólogo para moléculas B7-1 y B7-2 humanas. Las secuencias 5'- y 3'- se obtuvieron mediante varias reacciones en cadena independientes de polimerasa acoplada a transcriptasa inversa (RT-PCR) de una biblioteca de ADNc de placenta humana utilizando un vector y secuencias EST como cebadores. Un fragmento de 3.616 pb que incluía el ORF que codifica hB7-H1 se clonó y secuenció (SEQ ID NO: 5) (Fig. 1). La secuencia de codificación para hB7-H1 (SEQ ID NO: 2) abarca los nucleótidos 73-942 de la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos de hB7-H1 de longitud completa (SEQ ID NO: 1) se muestra en la Fig. 2a. El dominio extracelular de hB7-H1 tiene mayor homología con B7-1 (20 % de identidad de aminoácidos) que con B7-2 (15 %) (Fig. 2b), mientras que su dominio citoplasmático es muy divergente del de B7-1 y B7-2 basado en el análisis que utiliza el software McVector 6.5. El marco de lectura abierto del gen codifica una proteína transmembrana de tipo I de 290 aminoácidos que consiste en un péptido señal de 22 aminoácidos, un dominio similar a Ig V y dominios similares a Ig C, un dominio transmembrana hidrófobo y una cola citoplasmática de 30 aminoácidos (Fig. 2a). Cuatro cisteínas estructurales (marcadas con asteriscos en la Fig. 2b), que aparentemente están implicadas en la formación de los enlaces disulfuro de los dominios Ig V e Ig C

están bien conservadas en todos los miembros B7 (Fig. 2b) [Fargeas, C.A. et al. (1995) *J. Exp. Med.* 182, 667-675; Bajorath, J. et al. (1994) *Protein Sci.* 3, 2148-50; Linsley, P.S. et al. (1994) *Immunity* 1, 793-801; Inaba, K. et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 1849-60; Freeman, G. J. et al. (1995) *Immunity* 2, 523-532]. Además, el resto de tirosina en B7-1 (en la posición 87) y en B7-2 (en la posición 82) del dominio similar a Ig V se conserva en hB7-H1 (en la posición 81) (Fig. 2b).

El análisis por transferencia de Northern reveló que la expresión del ARNm de hB7-H1 era significativa en el corazón, músculo esquelético, placenta y pulmón, pero era débil en timo, bazo, riñón e hígado (Fig. 3). El ARNm de hB7-H1 no era detectable en cerebro, colon, intestino delgado y células mononucleares de la sangre periférica (PBMC). En la mayoría de los tejidos en los que se detectó el ARNm de hB7-H1, se encontraron dos transcritos de aproximadamente 4,1 y 7,2 kb.

Se construyó un plásmido de expresión que contenía el dominio extracelular de hB7-H1 fusionado en marco con la porción Fc (dominios CH2 y CH3) de la IgG2a de ratón. El producto resultante, proteína de fusión hB7-H1Ig, se purificó a partir de los sobrenadantes de células CHO transfectadas con el plásmido y se usó para la inmunización de los ratones para preparar un antisuero específico de hB7-H1. El análisis por citometría de flujo con fluorescencia utilizando el antisuero específico para hB7-H1 mostró que las células T CD3+ y B CD19+ recién aisladas expresan niveles despreciables de hB7-H1 mientras que una fracción (~16 %) de monocitos CD14+ expresan de forma constituyente hB7-H1. Sin embargo, el hB7-H1 puede ser regulado al alza por activación celular. Aproximadamente el 30 % de células T CD3+ tratadas con PHA y 90 % de monocitos CD14+ (tratados con IFN- γ y LPS) expresan hB7-H1. Sólo el 6 % de las células B CD19+ después de la activación del LPS expresan hB7-H1 (Fig. 4). Los resultados de confirmación se obtuvieron mediante análisis por RT-PCR.

La transfección del plásmido pcADN3-hB7-H1 en células 293 (células B7-H1/293) condujo a la expresión de hB7-H1 como se detectó por el antisuero específico de hB7-H1 (Fig. 5a). La unión del anticuerpo se eliminó mediante la inclusión de hB7-H1Ig soluble en la mezcla de tinción (Fig. 5a, flecha), demostrando así la especificidad del antisuero. Ni CTLA4Ig ni ICOSIg se unieron a células hB7-H1/293. Aunque tanto CTLA4Ig como ICOSIg se unieron a células Raji, la unión no se bloqueó por la inclusión de hB7-H1Ig (Fig. 5a, flechas). Tomados conjuntamente con la observación de que hB7-H1Ig no se unió a las células Jurkat (Fig. 5b, panel a la derecha), a pesar de su expresión constituyente de CD28 (Fig. 5b, panel a la izquierda), los resultados anteriores indican que hB7-H1 no es un ligando para CD28, CTLA-4 o ICOS.

Ejemplo 3. Coestimulación de la proliferación de células T por hB7-H1

Para evaluar si hB7-H1 coestimula el crecimiento de células T, las células T purificadas (>95 % de pureza) de PBMC de donantes humanos sanos fueron estimuladas con hB7-H1Ig en presencia de dosis subóptimas de mAb específico para CD3 humano. La proliferación de células T en cultivos el día 3 se determinó por incorporación de [3 H]-timidina. hB7-H1Ig, inmovilizada sobre placas de cultivo, aumentó la proliferación de células T hasta 10 veces en comparación con la Ig de control en presencia de 5-20 ng/ml de mAb específico para CD3 humano, también inmovilizado sobre las placas de cultivo. En ausencia de mAb específico para CD3 humano, hB7-H1Ig a una concentración de hasta 5 μ g/ml no indujo proliferación de células T (Fig. 6a). Si se incluía hB7-H1Ig en los cultivos sin inmovilización, su efecto coestimulador disminuía significativamente. En consonancia con esta observación, la inclusión de hB7-H1Ig soluble a niveles de 0,6-5 μ g/ml en MLR allogénico aumentaba moderadamente (~2 veces) la proliferación de células T (Fig. 6b). Así, hB7-H1 puede promover y coestimular respuestas proliferativas de células T a estímulos de células T policlonales y a antígenos allogénicos.

Ejemplo 4. La coestimulación con hB7-H1 induce preferentemente la producción de IL-10 y el efecto coestimulador requiere IL-2

Los niveles de IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-10 producidos por células T después de la coestimulación con hB7-H1Ig, B7-1Ig o mAb específicos para CD28 humano se midieron en presencia de mAb específico para CD3 humano (Fig. 7a-7d). Al igual que B7-1Ig y anti-CD28, el anticuerpo inmovilizado hB7-H1Ig aumentó espectacularmente la producción de IL-10 por células T en respuesta al mAb inmovilizado específico para CD3 humano después de la estimulación durante 48 y 72 horas (Fig. 7a). La IL-10 no se detectaba si las células T se coestimulaban con la Ig de control inmovilizada. El nivel de IFN- γ se elevaba también significativamente por coestimulación con hB7-H1Ig inmovilizada (Fig. 7b). En contraste con B7-1Ig y mAb específicos para CD28 humana, la hB7-H1Ig coestimulaba niveles bajos o insignificantes de IL-2 (Fig. 7c) e IL-4 (Fig. 7d), respectivamente. Estas observaciones eran reproducibles en seis experimentos independientes. Estos resultados muestran que la coestimulación por hB7-H1 estimula preferentemente la producción de IL-10.

La producción de IL-2, aunque baja, alcanzaba su máximo a la 24 horas tras la coestimulación de hB7-H1 (Fig. 7c), mientras que la secreción de IL-10 empezaba a aumentar sólo después de 48 y 72 horas (Fig. 7a). El aumento de las concentraciones de hB7-H1Ig condujo a un pequeño aumento (<1 ng/ml) de secreción de IL-2 (Fig. 7e). Para determinar las funciones de la IL-2 de producción temprana, se ensayaron los efectos de mAb específico para la IL-2 humana sobre la proliferación de células T y la producción de IL-10 en la coestimulación mediada por B7H. Similar a la proliferación de células T inducida por células B7-1-COS y mAb inmovilizado específico para CD3 humano, la proliferación de células T inducida por células hB7-H1-COS y mAb específico para CD3 humano se bloqueaba

mediante la inclusión de mAb específico para IL-2 humana (Fig. 8a). Además, la secreción de IL-10 a partir de células T coestimuladas por hB7-H1lg también era inhibida por el mAb específico para la IL-2 humana (Figura 8b). Por lo tanto, la coestimulación por hB7-H1 de tanto el crecimiento de células T como de la secreción de IL-10 es un proceso dependiente de IL-2.

5 Ejemplo 5. La coestimulación de hB7-H1 aumenta la apoptosis de células T activadas.

Para determinar el efecto de la ligadura de hB7-H1 sobre la viabilidad de células T activadas, la proporción de células T vivas que quedaban después de la activación con una dosis óptimamente activa de mAb específica para CD3 humano en presencia de hB7-H1lg inmovilizado se determinó por tinción con azul de tripano. Se observó una disminución constante de las células T vivas. Al final del cultivo, las células T se tiñeron con anexina V y yoduro de propidio (IP) para distinguir la fase temprana y la fase tardía de la apoptosis, respectivamente. Las células apoptóticas en fase temprana (anexina V positiva, IP negativo) se incrementaron significativamente hasta 24,8 % en presencia de hB7-H1lg en comparación con 14,2 % en ausencia de hB7-H1lg en 5 experimentos ($P = 0,001$). Un experimento representativo se muestra en la Fig. 9a (panel superior). Se obtuvieron resultados similares utilizando células Jurkat tratadas con hB7-H1lg (Ig de control: 38,3 % frente a hB7-H1lg: 54,6 %) (Fig. 9a, panel inferior). El aumento de la apoptosis se asoció con regulación al alza de la expresión de Fas y FasL en células T coestimuladas con hB7-H1 (Fig. 9b). Estos resultados indicaron que la coestimulación con hB7-H1 aumentó moderadamente la apoptosis de células T inducida por la activación, y el aumento de la apoptosis se asoció con una elevada expresión de Fas y FasL.

Ejemplo 6. Producción de anticuerpos monoclonales específicos para hB7-H1.

Usando protocolos estándar, se inmunizaron ratones BALB/c con hB7-H1lg purificada y esplenocitos de los ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma de ratón X63-AG8.653. Se halló que cinco líneas de hibridoma secretaban anticuerpos específicos para hB7-H1 ya que, como se detectó por citometría de flujo con fluorescencia, los sobrenadantes de los cultivos de estas líneas de hibridoma teñían positivamente células hB7-H1/293 pero no se teñían células vector de control/293. Además, algunos de los anticuerpos inhibían la actividad coestimuladora de hB7-H1.

Ejemplo 7. Clonación Molecular y patrón de expresión de un gen B7-H1 de ratón (mB7-H1)

Comenzando con dos clones EST de ratón superpuestos (AA823166 y AA896104), y utilizando una estrategia similar a la del gen hB7-H1, se clonó un fragmento de ADNc que incluía un ORF que codifica mB7-H1. Se obtuvo la secuencia codificante para mB7-H1 (SEQ ID NO: 4) (Fig. 10) y de ella se derivó la secuencia de aminoácidos de mB7-H1 (SEQ ID NO: 3) (Fig. 11). La longitud de mB7-H1 es idéntica a la de hB7-H1 y tiene los mismos restos de cisteína conservados que se encuentran en hB7-H1 (véase el Ejemplo 2). Un fragmento de ADNc que codifica mB7-H1 de longitud completa se clonó en el vector pcADN3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para dar mB7-H1.pcADN3.

La mB7-H1, como la hB7-H1, es una proteína transmembrana de tipo I de 290 aminoácidos que tiene 69 % de homología global de aminoácidos con hB7-H1 (Fig. 12a). Similar a otros miembros de la familia B7, mB7-H1 consiste en un dominio similar a Ig V, un dominio similar a Ig C, un dominio transmembrana hidrófobo y una cola citoplasmática. La mB7-H1 comparte 20 % de homología con B7-1 de ratón, 14 % con B7-2 de ratón y 19 % con B7h/B7RP-1 de ratón, basado en análisis que utiliza el software McVector 6.5 (Programa Clustal W) (Fig. 12b).

El análisis de ARN reveló que el ARNm de mB7-H1 es significativa en corazón, bazo, pulmón, músculo esquelético e hígado de ratón, y menos significativa pero presente en riñón, hígado, timo y tiroides de ratón. Así, el patrón de expresión de ARNm mB7-H1 es similar al del ARNm B7-H1 humano. Se observó una expresión despreciable del ARNm mB7-H1 en páncreas y testículos.

El análisis FFC utilizando el anticuerpo anti-mB7-H1 mostró que las células T $CD3^+$ de ratón en reposo no expresan mB7-H1 (Fig. 13, panel superior). Sin embargo, una pequeña fracción de células B $B220^+$ de ratón y macrófagos $Mac-1^+$ de ratón expresaron un bajo nivel de mB7-H1 (Fig. 13, panel superior). La estimulación de células T de ratón con anticuerpos específicos para CD3 de ratón y CD28 de ratón aumentó moderadamente la expresión de mB7-H1 en células T. La activación de células B de ratón con LPS y macrófagos con LPS más IFN- γ aumentó significativamente la expresión de mB7-H1 en sus superficies (Fig. 13, panel inferior). Así, mB7-H1, como hB7-H1, es una molécula inducible de la superficie celular.

Ejemplo 8. Coestimulación de la proliferación de células T de ratón mediante mB7-H1.

Para investigar el efecto coestimulador de mB7-H1, células T de ratón purificadas con lana de nailon se activaron con una dosis subóptima de mAb específica para CD3 de ratón (revestida sobre el fondo de los pocillos de cultivo a una concentración de 200 ng/ml) y se coestimularon con diversas concentraciones de mB7-H1lg. La mB7-H1lg potenció la proliferación de células T hasta 5 veces más en comparación con la Ig de control (Fig. 14a). El efecto coestimulador del mB7-H1lg era dependiente de la dosis y dependiente de la presencia de mAb específico para CD3 de ratón ya que en ausencia de mAb específico para CD3 de ratón, mB7-H1lg (hasta una concentración de mB7-H1lg de 10 μ g/ml) fracasaba en su intento de estimular la proliferación de células T. Cuando se cultivaron células T de ratón purificadas con lana de nailon con células 293 transfectadas con mB7-H1.pcADN3 o vector de control en

presencia de dosis subóptimas de mAb específico para CD3 de ratón, las células 293 transfectadas con mB7-H1 también potenciaron sustancialmente la proliferación de células T en comparación con la proliferación de células T en presencia de células 293 transfectadas con el vector de control. Así, similar a hB7-H1, la mB7-H1 coestimula la proliferación de células T.

- 5 La función de CD28 en la coestimulación de mB7-H1 se evaluó comparando los efectos de la coestimulación de mB7-H1Ig en células T aisladas de ratones CD28^{-/-} y de ratones normales. Se activaron células T de ratón purificadas con lana de nailon con dos dosis subóptimas de anticuerpo específico para CD3 de ratón (revestidas sobre el fondo de los pocillos de placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una concentración de 0,125 µg/ml o 0,25 µg/ml) y bien anticuerpo soluble específico para CD28 de ratón (2,5 µg/ml) o bien mB7-H1Ig o Ig de control
- 10 (ambos revestidos sobre el fondo de los pocillos de placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una concentración de 10 µg/ml). Como se muestra en la Fig. 14b, mientras que no hubo ningún efecto coestimulador del mAb anti-CD28 en las células T CD28^{-/-}, mB7-H1Ig indujo la proliferación tanto de las células T CD28^{-/-} (Fig. 14b, panel derecho) como de las CD28^{+/+} ("wt"; Fig. 14b, panel izquierdo) en un grado similar. Por lo tanto, mB7-H1 puede coestimular el crecimiento de células T de una manera independiente de CD28.
- 15 Con el fin de comprobar si mB7-H1 coestimula preferentemente células T CD4⁺ o CD8⁺, se estimularon células T CD4⁺ y CD8⁺ purificadas con mB7-H1Ig (misma concentración que en el experimento mostrado en la Fig. 14b) y mAb específico para CD3 de ratón (revestido sobre el fondo de los pocillos de placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una concentración de 200 ng/ml). La proliferación de células T CD4⁺ aumentó aproximadamente 10 veces por mB7-H1Ig y la proliferación de células T CD8⁺ sólo aumentó 2-3 veces mB7-H1Ig (Fig. 14c). Así, el efecto
- 20 coestimulador de mB7-H1 es más potente en células T CD4⁺ que en células CD8⁺.

Ejemplo 9. Coestimulación de la producción de citocinas por mB7-H1.

- Se midieron los niveles de IL-10, IFN-γ, IL-2, IL-4 y GM-CSF producidos por células T activadas con mAb específico para CD3 de ratón y se coestimularon con mB7-H1Ig o con mAb anti-CD28. La Fig. 15a muestra que mB7-H1Ig, similar al mAb específico para CD28 de ratón, coestimula la producción de altos niveles de IL-10 en los cultivos el
- 25 día 3. La IL-10 no era detectable al día 3 cuando las células T se trataron con Ig de control y con mAb específico para CD3 de ratón, o mAb específico para CD3 de ratón en solitario. La mB7-H1 y el mAb específico para CD28 de ratón mejoraron la producción de IFN-γ y GM-CSF. En contraste con el mAb específico para CD28 de ratón, que indujo altos niveles de IL-2 e IL-4, la mB7-H1Ig indujo niveles nulos o insignificantes de IL-2 e IL-4 en todos los puntos temporales (Fig. 15a). Así, mB7-H1 y hB7-H1 coestimulan la producción de un espectro similar de citocinas.
- 30 Dado que la IL-2 no era detectable en sobrenadantes de cultivo de los cultivos coestimulados de mB7-H1Ig, parecía posible que la ligadura de mB7-H1 inhibiera la secreción de IL-2. Para probar esta posibilidad, se ensayó el efecto de mB7-H1 sobre la secreción de IL-2 por células T se activó mediante mAb específico para CD3 de ratón y se coestimuló con mAb específico para CD28 de ratón. La Fig. 15b muestra que la inclusión de mB7-H1Ig inmovilizada (a concentraciones de hasta 10 µg/ml) en el cultivo dio como resultado una pequeña disminución en la producción
- 35 de IL-2 durante el período de cultivo de 18-48 h que era estadísticamente insignificante; en varios experimentos repetidos nunca se observó ninguna disminución estadísticamente significativa. De forma similar, la mB7-H1Ig no inhibió la producción de IL-2 en los cultivos en los que las células T fueron activadas por mAb específico para CD3 de ratón en solitario (Fig. 15b). Los resultados indican, así, que la ligadura de mB7-H1 no inhibe la producción de IL-2.

- 40 Ejemplo 10. Expresión de mB7-H1 en células tumorales P815 transfectadas y velocidad de crecimiento disminuida de las células P815 transfectadas en ratones.

- Se transfectaron de forma estable células de mastocitoma P815 de ratón (DBA/2) con el plásmido de expresión (mB7-H1.pcADN3) que contenía la secuencia codificante para mB7-H1 usando FUGENE® (Roche, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron en medio completo que
- 45 contenía G418 (1 mg/ml, Life Technologies) y se clonaron posteriormente mediante dilución limitante. Las células P815 que expresan mB7-H1 se identificaron mediante FFC usando la preparación de anticuerpo policlonal anti-mB7-H1 descrita anteriormente. Se seleccionó un clon representativo (mB7-H1⁺ P815) para estudios adicionales. Los clones P815 transfectados con el vector pcADN (mock.P815) o MB7-1 (mB7-1⁺ P815) se generaron de forma similar [Chen et al., (1994) *J. Exp. Med.* 179, 523-532]. Utilizando un anticuerpo policlonal de rata conjugado con PE específico para mB7-H1 ("anti-mB7H/PE"), la expresión de mB7-H1 se detectó mediante FFC en las células mB7H-
- 50 H1⁺ P815 (Fig. 18b) pero no en células P815 transfectadas simuladamente ("mock.P815") (Fig. 16b) o células P815 transfectadas con un constructo que codifica B7-1 murino ("mB7-1⁺ P815") (Fig. 17b). Por otra parte, las células mB7-1⁺ P815 se tiñeron con un mAb conjugado con FITC específico para B7-1 murino ("anti-mB7-1-FITC") (Fig. 17a). Además, la inclusión del péptido mB7-H1 usado para fabricar el anticuerpo anti-mB7-H1 policlonal en la
- 55 mezcla de reacción de tinción bloqueó completamente la unión del anticuerpo anti-mB7-H1 policlonal a las células mB7-H1⁺ P815.

Se inyectaron subcutáneamente (s.c.) grupos (5 ratones por grupo) de ratones DBA/2 con 2x10⁵ células mock.P815 o mB7-H1⁺ P815. La velocidad de crecimiento de las células mock.P815 era significativamente mayor en 4 de los 5 ratones inyectados (Fig. 19a) que en los 5 ratones inyectados con mB7-H1⁺ P815 (Fig. 19b). Estos hallazgos indican

que las células mB7-H1⁺ P815 eran significativamente más inmunogénicas que las células mock.P815 y, por tanto, esa expresión de la expresión de mB7-H1 por las células P815 potencia su capacidad para provocar inmunidad protectora.

Ejemplo 11. La coestimulación mB7-H1 no logra potenciar las respuestas CTL alogénicas y singénicas

Para examinar el efecto de mB7-H1 sobre la generación de CTL alogénicos *in vitro*, se co-cultivaron células T purificadas con lana de nailon de ratones B6 (H-2^b) con mock.P815 irradiado (H-2^d), mB7-1⁺ P815 o mB7-H1⁺ P815 durante 5 días y la actividad CTL de las células cosechadas de los cultivos se ensayó frente a células diana P815 de tipo salvaje en ensayos estándar de liberación de ⁵¹Cr en las relaciones indicadas de células efectoras frente a diana ("relación E/T"). Como se representa en la Fig. 20a, células mB7-H1⁺ P815 y las células mock.P815 eran estimuladores mediocres de la actividad de CTL. Por el contrario, las células mB7-1⁺ P815 provocaron una fuerte actividad de CTL específica para P815. Los CTL inducidos por mB7-1 eran específicos del aloantígeno ya que no lisan las células diana tumorales EL4 del haplotipo H-2 (H-2^b) de respuesta (B6). Así, la expresión de mB7-H1 no facilita la generación de CTL alogénicos.

Se ensayó la capacidad de las células mB7-H1⁺ P815 para estimular CTL específicos de tumor P815 *in vivo*. Se inyectaron s.c. ratones DBA/2 con células mock.P815, mB7-1⁺ P815, o mB7-H1⁺ P815. Los nódulos linfáticos que drenan el tumor se extrajeron 7 días más tarde y las células T aisladas de ellos se cultivaron con células P815 de tipo salvaje durante 5 días. Las células cosechadas de los cultivos se ensayaron en cuanto a la actividad de CTL frente a células diana P815 de tipo salvaje en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr en las relaciones E/T indicadas (Fig. 20b). Las células efectoras de ratones inyectados con mB7-H1⁺ P815 mostraron una actividad de CTL ligeramente aumentada frente a células P815 en comparación con las células efectoras de los ratones inyectados con mock.P815; esta diferencia en la actividad de CTL era, sin embargo, estadísticamente insignificante. En contraste, las células mB7-1⁺ P815 provocaron una fuerte actividad de CTL. La actividad de CTL era específica de tumor P815 ya que las células diana del tumor L1210 singénico no eran lisadas. Así, la expresión de mB7-H1 en células P815 no potencia la inducción de la actividad de CTL frente a antígenos tumorales P815.

Ejemplo 12. La coestimulación de B7-H1 amplifica respuestas de células T auxiliares específicas de antígeno, respuestas humorales dependientes de células T y expresión de CD40L en células T.

Para investigar el efecto de la coestimulación de mB7-H1 sobre la función de células T auxiliares, se inmunizaron ratones B6 con KLH conjugado con TNP el día 0 y se inyectaron con mB7-H1Ig el día 1 y el día 4. Se midieron las respuestas proliferativas *in vitro* de las células T obtenidas tanto de los nódulos linfáticos como de los bazo de los ratones inmunizados a diversas concentraciones de KLH. Como se muestra en la Fig. 21, las células T tanto de los bazo como de los nódulos linfáticos de ratones inmunizados con TNP-KLH proliferaron en respuesta a KLH de una manera que dependía de la dosis. La administración de mB7-H1Ig a ratones inmunizados con TNP-KLH amplificó las respuestas proliferativas *in vitro* posteriores de células T hasta 2-3 veces. Estos resultados indican que la coestimulación de mB7-H1 potencia las respuestas de las células T auxiliares *in vivo*.

El efecto de la coestimulación de mB7-H1 sobre la generación de anticuerpos específicos de antígeno para TNP se investigó en un sistema bien reconocido como medidor de respuestas de anticuerpos dependientes de células T auxiliares [Marrack y Kappler (1975) *J. Immunol.* 114, 1116-1155; Romano et al., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 72, 4555-4558]. Así, el nivel de anticuerpos específicos para TNP en los sueros de ratones inmunizados con TNP-KLH se midió después del tratamiento con Ig de control, mB7-1Ig o mB7-H1Ig. En experimentos preliminares, se observó un aumento significativo en el nivel total de IgG anti-TNP en sueros de ratones inmunizados con TNP-KLH y tratados con mB7-H1Ig en comparación con sueros de ratones inmunizados con TNP-KLH y tratados con mIg de control. Se midieron cada uno de los niveles relativos de anticuerpos anti-TNP IgM y subclases individuales de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) provocados por la inmunización con TNP-KLH y las diversas coestimulaciones. Como se muestra en la Fig. 22, la cantidad de anticuerpo IgG2a específico de TNP se incrementó significativamente en los sueros de ratones inmunizados con TNP-KLH y se trataron con mB7-H1Ig. El efecto fue diferente del provocado por mB7-1Ig en los que los niveles de anticuerpos específicos para TNP de otras subclases de IgG (IgG1 e IgG2b) también aumentaron significativamente (Fig. 22). Así, la coestimulación mB7-H1 potencia la proliferación de células auxiliares T y las respuestas de anticuerpos dependientes de auxiliares T, particularmente las respuestas de IgG2a.

La interacción de CD40-ligando CD40 (CD40L) en las interacciones de célula auxiliares T-células B es crítica para la generación de respuestas de anticuerpos y para la conmutación de clases de Ig [Calderhead et al., (2000) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245, 73-99]. Se investigó el efecto de la coestimulación con mB7-H1Ig en el nivel de CD40L en células T. Las células T CD4⁺ purificadas de ratones B6 se estimularon con una concentración subóptima de mAb específico para CD3 de ratón en presencia de mB7-H1Ig o mAb específico para CD28 de ratón. La expresión de CD40L en células T se detectó con un mAb específico para CD40L de ratón por FFC. La coestimulación de mB7-H1Ig reguló rápidamente al alza el CD40L (25,3 % después de 4 h de incubación) en comparación con la coestimulación con IgG de control (6,6 %) o anticuerpo específico para CD28 de ratón (10,5 %) (Fig. 23a). El nivel de CD40L fue también mayor después de 24 h en células T coestimuladas con mB7-H1Ig que en células T coestimuladas con Ig de control o mB7-1Ig (Fig. 23a). Se obtuvieron resultados similares usando una dosis óptima de mAb específico para CD3 de ratón para activación (Fig. 23b). Así, el desencadenamiento del contador-receptor

B7-H1 sobre las células T reguló al alza rápidamente la expresión de CD40L.

La invención está limitada únicamente por las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado, en donde el polipéptido consiste en el resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 de aminoácidos expuesto en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.
2. El polipéptido de la reivindicación 1 para su uso como medicamento.
- 5 3. El polipéptido para el uso de la reivindicación 2, en donde el medicamento es un medicamento para ser administrado a un mamífero, en particular a un mamífero del que se sospecha que tiene una enfermedad de inmunodeficiencia, un estado inflamatorio o una enfermedad autoinmune.
4. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico es para uso como un medicamento.
- 10 5. Una célula recombinante que es una progenie de una célula obtenida de un mamífero y que ha sido transfectada o transformada *ex vivo* con un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1, de manera que la célula expresa el polipéptido, para su uso como medicamento, en donde la célula obtenida del mamífero no es una célula embrionaria humana y en donde la transfección o transformación con el ácido nucleico no es un proceso para modificar la identidad genética de la línea germinal de un ser humano.
- 15 6. Una célula recombinante que es una progenie de una célula obtenida de un mamífero y que ha sido transfectada o transformada *ex vivo* con un ADN que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en donde el ácido nucleico se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3,
en donde la célula expresa el polipéptido codificado por el ácido nucleico, y
- 20 en donde la célula recombinante es para uso como un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de inmunodeficiencia, un estado inflamatorio o una enfermedad autoinmune de dicho mamífero, en donde la célula obtenida del mamífero no es una célula embrionaria humana y en donde la transfección o transformación con el ácido nucleico no es un proceso para modificar la identidad genética de la línea germinal de un ser humano.
- 25 7. La célula recombinante para el uso de la reivindicación 5 o 6, en donde la célula es una célula presentadora de antígeno (APC) y la célula expresa el polipéptido en su superficie.
8. La célula recombinante para el uso de la reivindicación 7, en donde la APC es una APC pulsada con un antígeno o un péptido antígeno.
9. Un polipéptido aislado codificado por un ADN que comprende:
un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en donde el ácido nucleico se hibrida en condiciones
30 rigurosas con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3,
en donde el polipéptido aislado es para uso como un medicamento para la administración a un mamífero que se sospecha que tiene un estado inflamatorio.
- 35 10. Un procedimiento *in vitro* de poner en contacto una célula T, comprendiendo el procedimiento cultivar la célula T *in vitro* con el polipéptido de la reivindicación 1.
11. Un procedimiento para identificar un compuesto que inhibe una respuesta inmune, comprendiendo el procedimiento:
(a) proporcionar un compuesto de ensayo;
(b) cultivar, juntos, el compuesto, un polipéptido aislado, una célula T y una molécula que suministra
40 una señal de activación a una célula T; y
(c) determinar si el compuesto de ensayo inhibe la respuesta de la célula T a la molécula, como una indicación de que el compuesto de ensayo inhibe una respuesta inmune,
en donde el polipéptido aislado está codificado por un ADN que comprende:
un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en donde el ácido nucleico se hibrida en condiciones
45 rigurosas con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en donde la molécula es un anticuerpo que se une a un receptor de células T o un polipéptido CD3 o en donde la molécula es un aloantígeno o un péptido antígeno unido a una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC), en particular una APC que es transfectada o transformada con un ácido nucleico que codifica el polipéptido y
50

el polipéptido es expresado en la superficie de la APC.

13. Un procedimiento de identificación de un compuesto que potencia una respuesta inmune, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar un compuesto de ensayo;

5 (b) cultivar, juntos, el compuesto, un polipéptido aislado, una célula T y una molécula que suministra una señal de activación a una célula T; y

(c) determinar si el compuesto de ensayo potencia la respuesta de la célula T a la molécula, como una indicación de que el compuesto de ensayo potencia una respuesta inmune,

en donde el polipéptido aislado está codificado por un ADN que comprende:

10 un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en donde el ácido nucleico se hibrida bajo condiciones rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en donde la molécula es un anticuerpo que se une a un receptor de células T o a un polipéptido CD3 o en donde la molécula es un aloantígeno o un péptido antígeno unido a una molécula de MHC en la superficie de una APC, en particular una APC que es transfectada o transformada con un ácido nucleico que codifica el polipéptido, y el polipéptido es expresado en la superficie de la APC.

15. Un anticuerpo que se une a un polipéptido que consiste en el resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

20 16. Molécula B7-H1 para uso en el tratamiento de un estado inflamatorio, artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS) o diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), en donde las moléculas B7-H1 son

polipéptidos codificados por un ADN que incluye un ácido nucleico que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular una célula T y (ii) hibrida en condiciones rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

25 polipéptidos que comprenden aminoácidos que tienen la secuencia del resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 aminoácidos expuesto en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

30 polipéptidos que comprenden aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o cualquiera de estos aminoácidos, pero que difieren únicamente en una o más sustituciones conservadoras o

fragmentos funcionales de cualquiera de estos polipéptidos, en donde un fragmento funcional de un polipéptido es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido de longitud completa y tiene la capacidad de coestimular una célula T o

35 proteínas de fusión que contienen un primer dominio y al menos un dominio adicional, en donde el primer dominio es cualquiera de los polipéptidos o fragmentos funcionales o

cualquiera de los polipéptidos y fragmentos funcionales modificados por la adición, en los extremos amino-y/o carboxilo-terminales, de un agente bloqueante para facilitar la supervivencia del polipéptido correspondiente *in vivo* o

40 cualquiera de los polipéptidos y fragmentos funcionales acoplados de forma covalente o no covalente a proteínas portadoras farmacéuticamente aceptables.

17. Las moléculas B7-H1 para el uso de la reivindicación 16, en donde el estado inflamatorio es un estado inflamatorio inducido por un agente infeccioso.

45 18. Procedimiento de coestimular una célula T que comprende poner en contacto una combinación que comprende un polipéptido B7-H1 y (a) un anticuerpo que se une a un receptor de células T (TCR) o (b) un polipéptido del complejo CD3 que está físicamente asociado con el TCR con una célula T CD4+ o una célula T CD8+ *in vitro*, o poner en contacto una combinación que comprende un polipéptido B7-H1 y un aloantígeno MHC con una célula T CD8+ *in vitro* en donde el polipéptido B7-H1 es

50 un polipéptido codificado por un ADN que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular una célula T y (ii) se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia del resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 aminoácidos expuesto en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o cualquiera de estos aminoácidos, pero que difieren únicamente en una o más sustituciones conservadoras o

un fragmento funcional de cualquiera de estos polipéptidos, en donde un fragmento funcional de un polipéptido es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido de longitud completa y tiene la capacidad de coestimular una célula T o

una proteína de fusión que contiene un primer dominio y al menos un dominio adicional, en donde el primer dominio es cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional o

cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional modificado por la adición, en los extremos amino- y/o carboxilo-terminales, de un agente bloqueante para facilitar la supervivencia del polipéptido correspondiente *in vivo* o

cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional acoplados de forma covalente o no covalente a una proteína portadora farmacéuticamente aceptable.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en donde dicho anticuerpo se une a un polipéptido del complejo CD3 que está físicamente asociado con el TCR.

20. Procedimiento de coestimular una célula T que comprende poner en contacto una combinación que comprende un polipéptido B7-H1 y (a) un aloantígeno de MHC o (b) un anticuerpo que se une a un receptor de células T (TCR) o (c) un polipéptido del complejo CD3 que está físicamente asociado con el TCR con la célula T *in vitro*, en donde el polipéptido B7-H1 está unido al suelo de un recipiente de cultivo especialmente un pocillo de una placa de plástico de microtitulación y en donde el polipéptido B7-H1 es

un polipéptido codificado por un ADN que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular una célula T y (ii) se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia del resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 aminoácidos expuesto en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o cualquiera de estos aminoácidos, pero que difieren únicamente en una o más sustituciones conservadoras o

un fragmento funcional de cualquiera de estos polipéptidos, en donde un fragmento funcional de un polipéptido es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido de longitud completa y tiene la capacidad de coestimular una célula T o

una proteína de fusión que contiene un primer dominio y al menos un dominio adicional, en donde el primer dominio es cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional o

cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional modificado por la adición, en los extremos amino- y/o carboxilo-terminales, de un agente bloqueante para facilitar la supervivencia del polipéptido correspondiente *in vivo* o

cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional acoplados de forma covalente o no covalente a una proteína portadora farmacéuticamente aceptable.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en donde dicho anticuerpo se une a un polipéptido del complejo CD3 que está físicamente asociado con el TCR.

22. Uso de una solución o un soporte sólido que comprende un polipéptido B7-H1 o fragmento polipeptídico y una molécula que suministra una señal de activación a una célula T en un tratamiento *ex vivo* de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), en donde el polipéptido B7-H1 es

un polipéptido codificado por un ADN que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular una célula T y (ii) se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia del resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 aminoácidos expuesto en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o

un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o cualquiera de estos aminoácidos, pero que difieren únicamente en una o más sustituciones conservadoras o

5 un fragmento funcional de cualquiera de estos polipéptidos, en donde un fragmento funcional de un polipéptido es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido de longitud completa y tiene la capacidad de coestimular una célula T o

una proteína de fusión que contiene un primer dominio y al menos un dominio adicional, en donde el primer dominio es cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional o

10 cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional modificado por la adición, en los extremos amino- y/o carboxilo-terminales, de un agente bloqueante para facilitar la supervivencia del polipéptido correspondiente *in vivo* o

cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional acoplados de forma covalente o no covalente a una proteína portadora farmacéuticamente aceptable.

23. El uso según la reivindicación 22, en donde la señal de activación se suministra a la célula T a través del receptor de células T específico de antígeno (TCR).

15 24. El uso según la reivindicación 22 o 23, en donde la molécula es un anticuerpo que se une al TCR o a un polipéptido del complejo CD3 que está físicamente asociado con el TCR sobre la superficie de las células T, un aloantígeno o un péptido de antígeno unido a una molécula de MHC.

25. Una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de B7-H1 humano fusionado con la porción Fc de IgG2a de ratón (hB7-H1Ig), en donde B7-H1 es

20 un polipéptido codificado por un ADN que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia que (i) codifica un polipéptido con la capacidad de coestimular una célula T y (ii) se hibrida en condiciones rigurosas al complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 o

25 un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia del resto de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, en el resto de 290 aminoácidos expuesto en la SEQ ID NO: 1 o

un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, o que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 pero que difieren solamente en una o más sustituciones conservadoras o

30 un fragmento funcional de cualquiera de estos polipéptidos, en donde un fragmento funcional de un polipéptido es un fragmento del polipéptido que es más corto que el polipéptido de longitud completa y tiene la capacidad de coestimular una célula T o

una proteína de fusión que contiene un primer dominio y al menos un dominio adicional, en donde el primer dominio es cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional o

35 cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional modificado por la adición, en los extremos amino- y/o carboxilo-terminales, de un agente bloqueante para facilitar la supervivencia del polipéptido correspondiente *in vivo* o

cualquiera de los polipéptidos o el fragmento funcional acoplados de forma covalente o no covalente a una proteína portadora farmacéuticamente aceptable.

40 26. Un procedimiento para inhibir un efecto coestimulador de B7-H1 humano en células T, en donde dichas células T se ponen en contacto con anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 *in vitro*, en donde dicho efecto coestimulador de B7-H1 en las células T comprende la mejora de una respuesta efectora, una respuesta auxiliar o una respuesta supresora de dichas células T.

CCCACGCGTCCGCAGCTTCCCCGAGGCTCCGCACCAGCCGCGCTTCTGTCCGCC
 TGCAGGGCATTCCAGAAAGATGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACCT
 ACTGGCATTGCTGAACGCATTTACTGTACGGTTCCCAAGGACCTATATGTG
 GTAGAGTATGGTAGCAATATGACAATTGAATGCAAATTTCCAGTAGAAAAAC
 AATTAGACCTGGCTGCACTAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACAT
 TATTCAATTTGTGCATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTAC
 AGACAGAGGGCCCCGGCTGTTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCAC
 TTCAGATCACAGATGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGAT
 CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCA
 TACAACAAAATCAACCAAGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAAC
 ATGAACTGACATGTCAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGAC
 AAGCAGTGACCATCAAGTCCTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTCCAAG
 AGAGAGGAGAAGCTTTTCAATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACA
 ACTAATGAGATTTTCTACTGCACTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACCA
 TACAGCTGAATTGGTCATCCCAGAACTACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAA
 AGGACTCACTTGGTAATTCTGGGAGCCATCTTATTATGCCTTGGTGTAGCACT
 GACATTCATCTTCCGTTTAAGAAAAGGGAGAATGATGGATGTGAAAAAATGT
 GGCATCCAAGATACAAACTCAAAGAAGCAAAGTGATACACATTTGGAGGAG
 ACGTAATCCAGCATTGGAACCTTCTGATCTTCAAGCAGGGATTCTCAACCTGTG
 GTTTAGGGGTTTCATCGGGGCTGAGCGTGACAAGAGGAAGGAATGGACCCGTG
 GGATGCAGGCAATGTGGGACTTAAAAGGCCCAAGCACTGAAAATGGAACCT
 GGCGAAAGCAGAGGAGGAGAATGAAGAAAGATGGAGTCAAACAGGGAGCC
 TGGAGGGAGACCTTGATACTTTCAAATGCCTGAGGGGCTCATCGACGCCTGT
 GACAGGGAGAAAGGATACTTCTGAACAAGGAGCCTCCAAGCAAATCATCCAT
 TGCTCATCCTAGGAAGACGGGTTGAGAATCCCTAATTTGAGGGTCAGTTCCTG
 CAGAAGTGCCCTTTGCCTCCACTCAATGCCTCAATTTCTTTTCTGCATGACTG
 AGAGTCTCAGTGTTGGAACGGGACAGTATTTATGTATGAGTTTTTCCTATTTA
 TTTTGAGTCTGTGAGGTCTTCTTGTGTCATGTGAGTGTGGTTGTGAATGATTTCTT
 TTGAAGATATATTGTAGTAGATGTTACAATTTTGTGCGCCAACTAACTTGCT
 GCTTAATGATTTGCTCACATCTAGTAAAACATGGAGTATTTGTAAGGTGCTTG
 GTCTCCTCTATAACTACAAGTATACATTGGAAGCATAAAGATCAAACCGTTG
 GTTGCATAGGATGTCACCTTTATTTAACCCTTAATACTCTGGTTGACCTAAT
 CTTATTCTCAGACCTCAAGTGTCTGTGCAGTATCTGTTCCATTTAAATATCAG
 CTTTACAATTATGTGGTAGCCTACACACATAATCTCATTTTCATCGCTGTAACC
 ACCCTGTTGTGATAACCCTATTATTTTACCCATCGTACAGCTGAGGAAGCAA
 ACAGATTAAGTAACTTGCCCAAACCAGTAAATAGCAGACCTCAGACTGCCAC
 CCACTGTCCTTTTATAATAACAATTTACAGCTATATTTTACTTTAAGCAATTCTT
 TTATTCAAAAACCATTTATTAAGTGCCCTTGCAATATCAATCGCTGTGCCAGG
 CATTGAATCTACAGATGTGAGCAAGACAAAGTACCTGTCCTCAAGGAGCTCA
 TAGTATAATGAGGAGATTAACAAGAAAATGTATTATTACAATTTAGTCCAGT
 GTCATAGCATAAGGATGATGCGAGGGGAAAACCCGAGCAGTGTTGCCAAGA
 GGAGGAAATAGGCCAATGTGGTCTGGGACGGTTGGATATACTTAAACATCTT
 AATAATCAGAGTAATTTTCATTTACAAAGAGAGGTCGGTACTTAAATAACC
 CTGAAAAATAACACTGGAATTCCTTTTCTAGCATTATAATTTATTCCTGATTG

FIG. 1A

CTTTGCCATATAATCTAATGCTTGTTTATATAGTGTCTGGTATTGTTTAAACAGT
 TCTGTCTTTTCTATTTAAATGCCACTAAATTTTAAATTCATACCTTTCCATGAT
 TCAAAATTCAAAAGATCCCATGGGAGATGGTTGGAAAATCTCCACTTCATCC
 TCCAAGCCATTCAAGTTTCCTTTCCAGAAGCAACTGCTACTGCCTTTTCATTCA
 TATGTTCTTCTAAAGATAGTCTACATTTGGAAATGTATGTTAAAAGCACGTAT
 TTTTAAAATTTTTTTCCTAAATAGTAACACATTGTATGTCTGCTGTGTACTTTG
 CTATTTTTATTTATTTTAGTGTTCCTTATATAGCAGATGGAATGAATTTGAAGT
 TCCCAGGGCTGAGGATCCATGCCTTCTTTGTTTCTAAGTTATCTTTCCCATAGC
 TTTTCATTATCTTTTCATATGATCCAGTATATGTTAAATATGTCCTACATATACA
 TTTAGACAACCACCATTTGTAAAGTATTTGCTCTAGGACAGAGTTTGGATTTG
 TTTATGTTTGCTCAAAAGGAGACCCATGGGCTCTCCAGGGTGCAGTGAAGTCA
 ATCTAGTCCTAAAAAGCAATCTTATTATTAAGTCTGTATGACAGAATCATGTC
 TGGAACCTTTGTTTTCTGCTTTCTGTCAAGTATAAACTTCACTTTGATGCTGTA
 CTTGCAAAATCACATTTTCTTTCTGGAAATTCCGGCAGTGTACCTTGACTGCT
 AGCTACCCTGTGCCAGAAAAGCCTCATTCGTTGTGCTTGAACCCTTGAATGCC
 ACCAGCTGTCTACTACACAGCCCTCCTAAGAGGCTTCCTGGAGGTTTCGA
 GATTCAGATGCCCTGGGAGATCCCAGAGTTTCCTTTCCCTCTTGGCCATATTC
 TGGTGTCAATGACAAGGAGTACCTTGGCTTTGCCACATGTCAAGGCTGAAGA
 AACAGTGTCTCCAACAGAGCTCCTTGTGTTATCTGTTTGTACATGTGCATTTG
 TACAGTAATTGGTGTGACAGTGTCTTTGTGTGAATTACAGGCAAGAATTGTG
 GCTGAGCAAGGCACATAGTCTACTCAGTCTATTCCTAAGTCCTAACTCCTCCT
 TGTGGTGTGATTGTAAGGCACTTTATCCCTTTTGTCTCATGTTTCATCGTA
 AATGGCATAGGCAGAGATGATACCTAATTCTGCATTTGATTGTCACCTTTTGT
 ACCTGCATTAATTTAATAAAAATATTCTTATTTATTTGTTACTTGGTAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 1B

Péptido señal

1 MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDL
*

Similar a Ig V

51 AALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKQSLGNAALQ

101 ITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSE

Similar a Ig C

151 HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT^{*}TTTNSKREEKLFNVTSTLRIN^{*}

201 TTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELV^{*}IPELPLAHP^{*}PNERTHLVLGAILLCTM

251 LGVALTFIFRLRKGRMDVKKCGIQD^{*}TN^{*}SKKQSDTHLEET

FIG. 2A

*

hB7-H1 50 VEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
 B7-1 43 KEVATLSCGHNVSV-VEELAQTRIYWQK
 B7-2 30 AYFNETADLPCQFANSQNSLSSELVVFWD

80 EDKNIITQFVHGEED-LKVQHSYRQARLL
 68 EKKMVLTMMSGDMN----IWPEYKNRTIFD
 60 QENLVLNEVYLGKEKFDSSHKYMGRTSFD

*

89 KDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY
 95 IT----NNLSIVILALRPSDEGTIECVVLK
 90 S-----DSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHH

119 GGADYKR----ITVKVNAPYNKINQRIILMV
 121 YEKDAFKREHLAEVTLVKADEFPTPSISDF
 115 KKPTGMIIRIHQMNSELSVLANFSQPEIVPI

*

145 DPTVSEHEL--TC-QAEGYPKA-EVIWTSS
 151 EIPTSNIRR-IIICSTSGGFPEP-HLSWLEN
 145 SNIITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLR

171 DHQ---VLSGKTTTINSKEEEKLFNVSTL
 179 GE----ELNAINTTVSQDPETELYAVSSKL
 175 TKNSTIEYDGI MQK-SQDNVTELYDVSISL

*

198 RIN---TTNEIFYCTFRRLDPEENHTAEL
 205 DEN---MTTNHSEFMCLIKYGHLLRVN--QTF
 204 SVSFPDVTSNMTIFCILETDKTRLLS-SPE

226 VIPELPLAHPPNERT
 230 NWNTTKQEHFPDNLL
 233 STELEDPOPPPDHIP

FIG. 2B

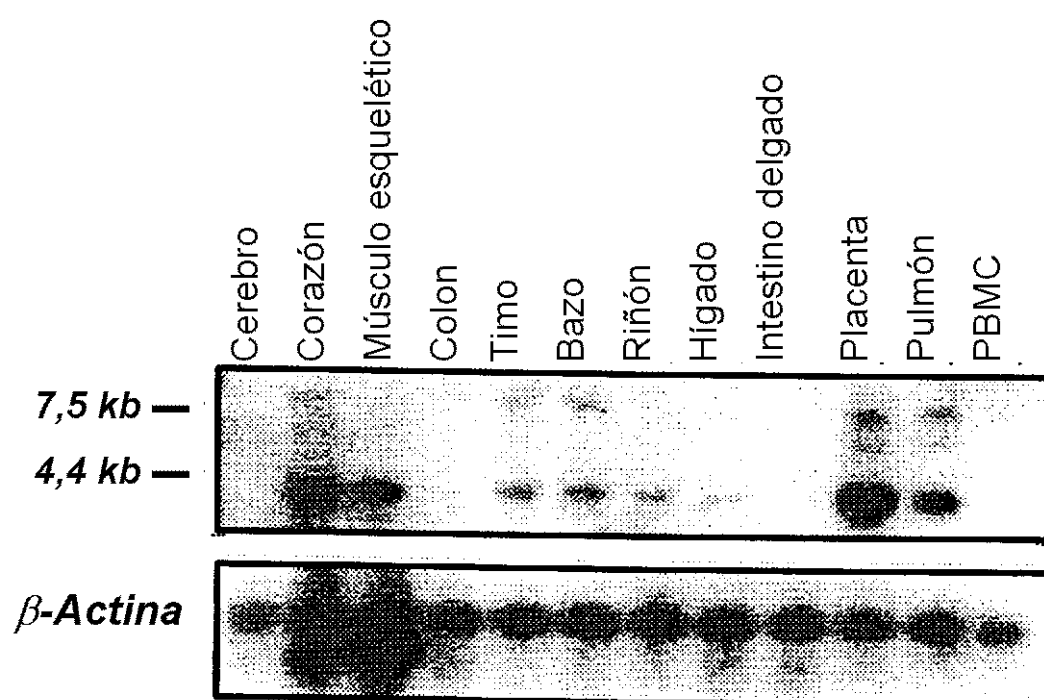


FIG. 3

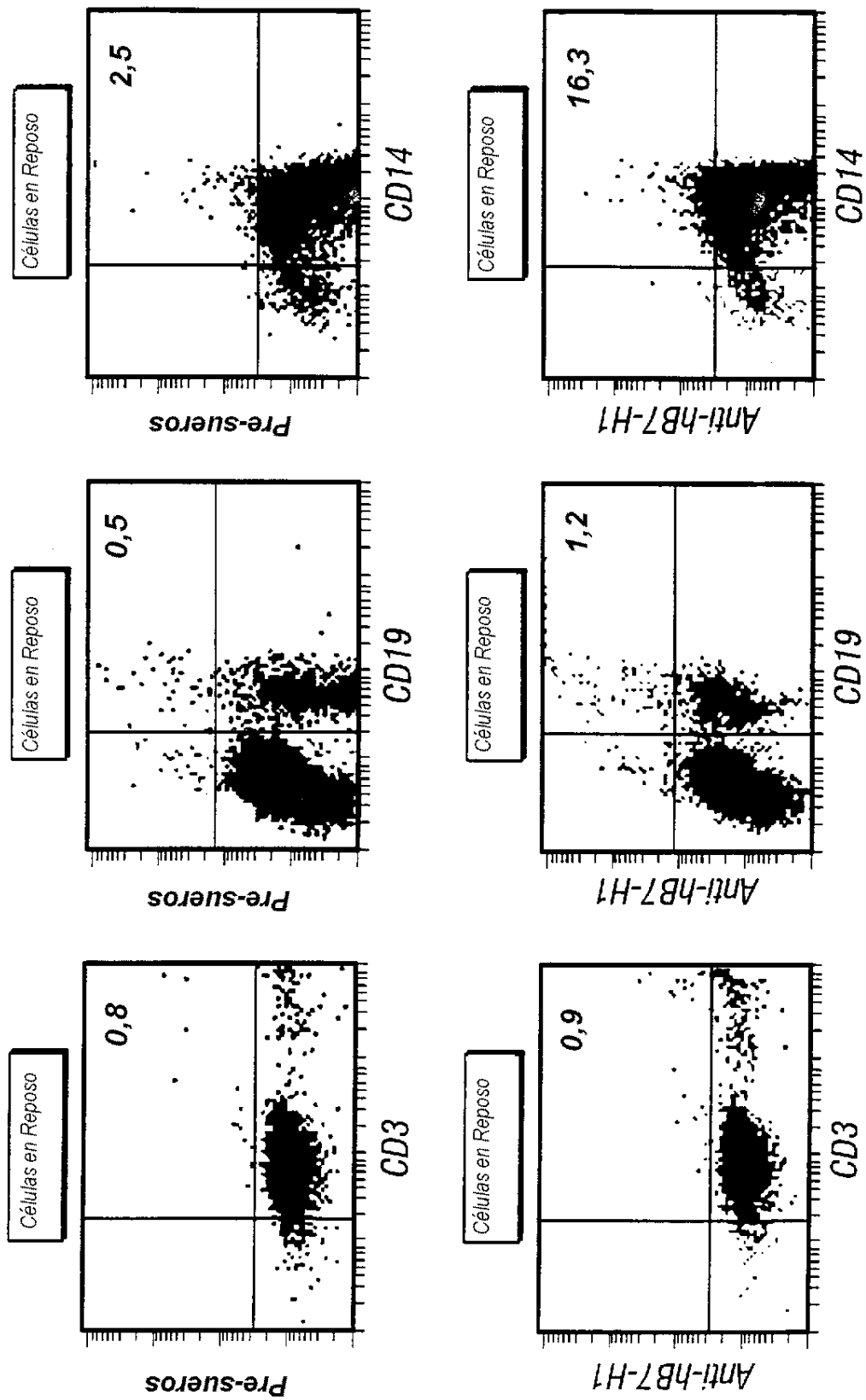


FIG. 4A

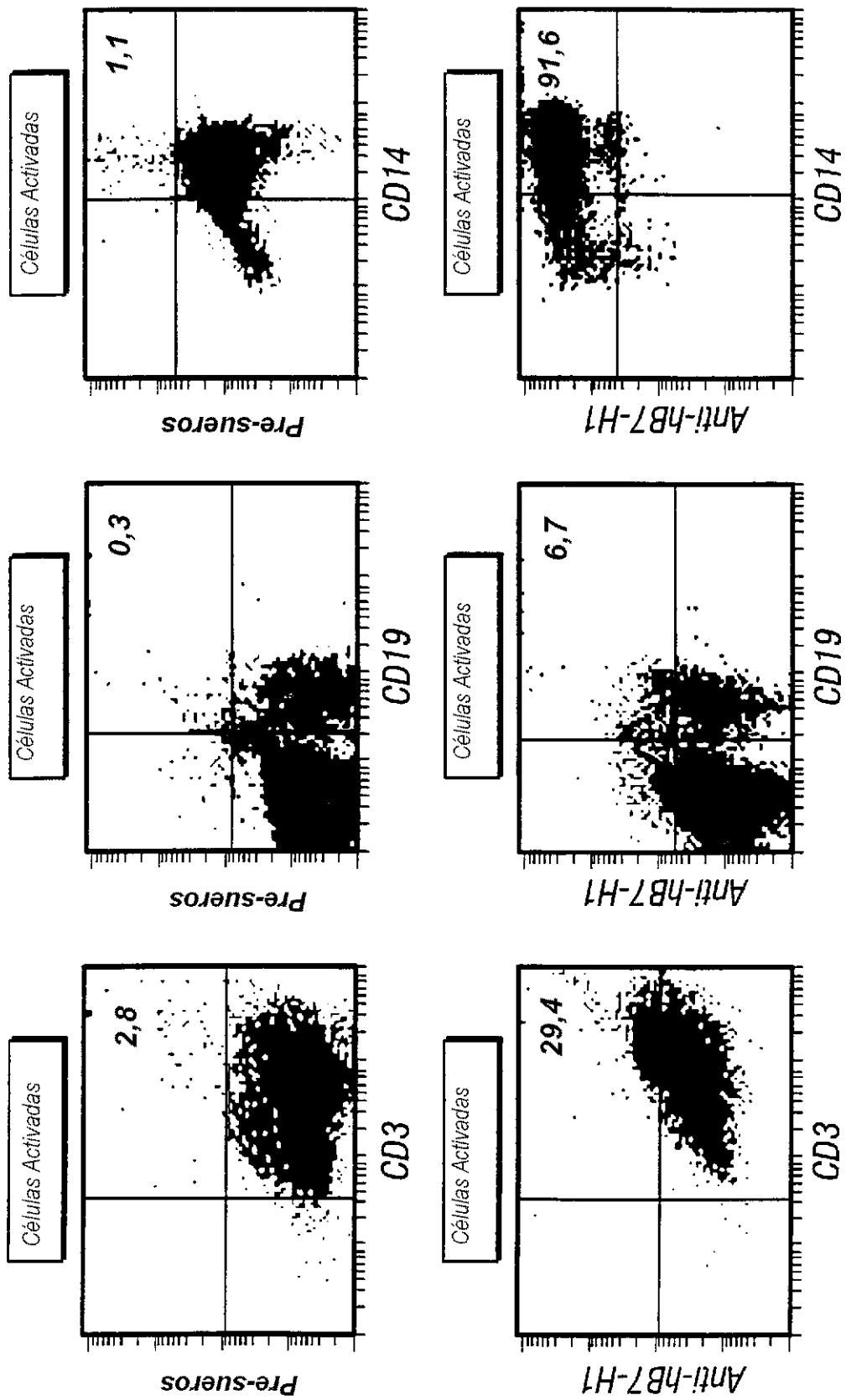
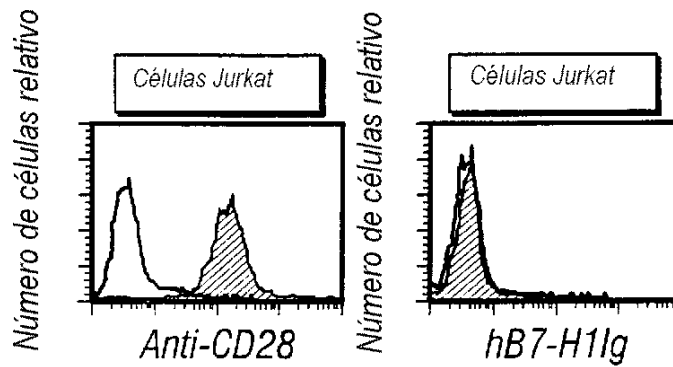
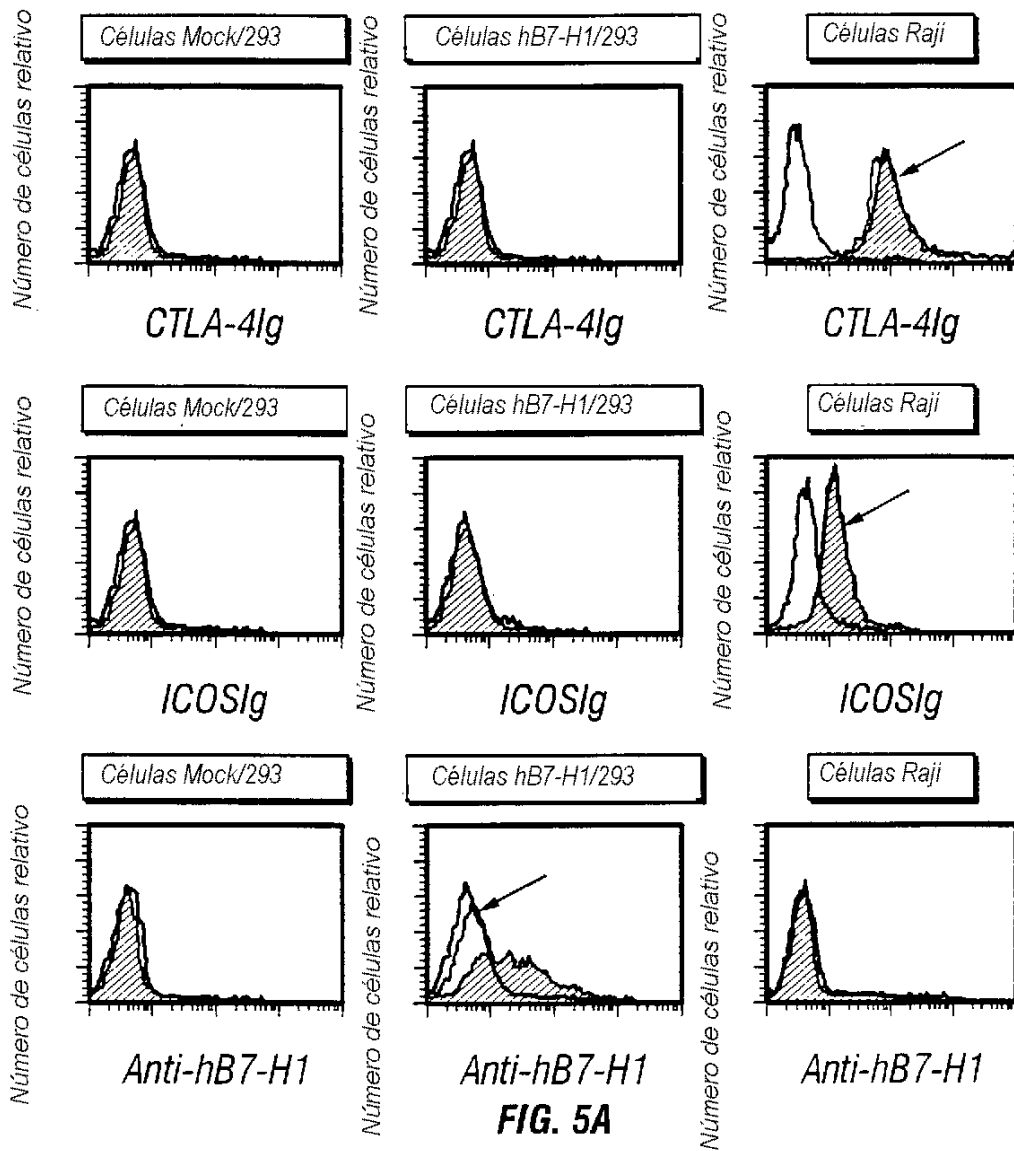


FIG. 4B



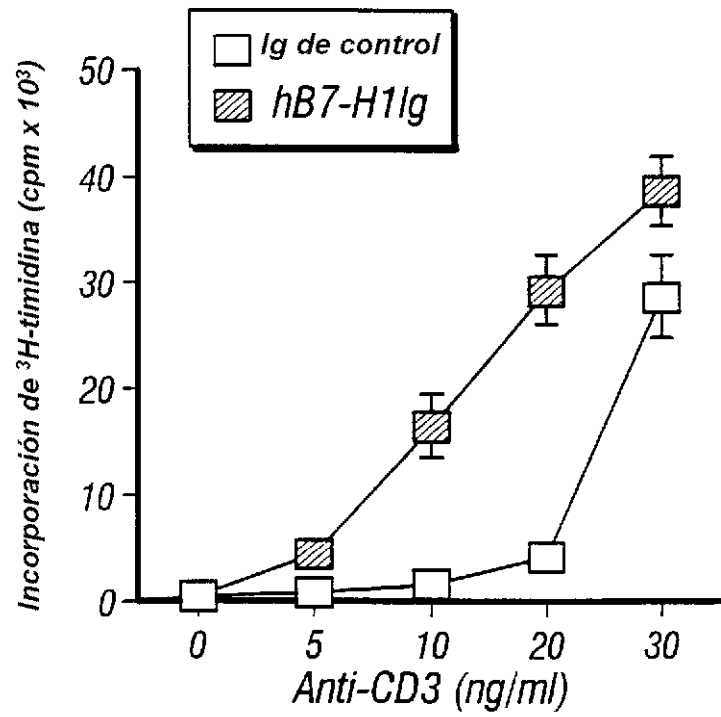


FIG. 6A

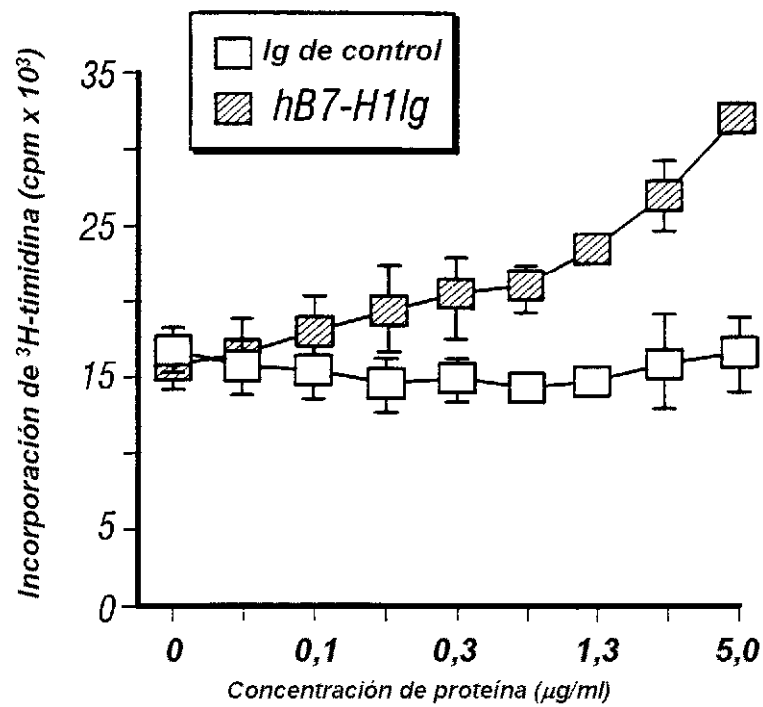
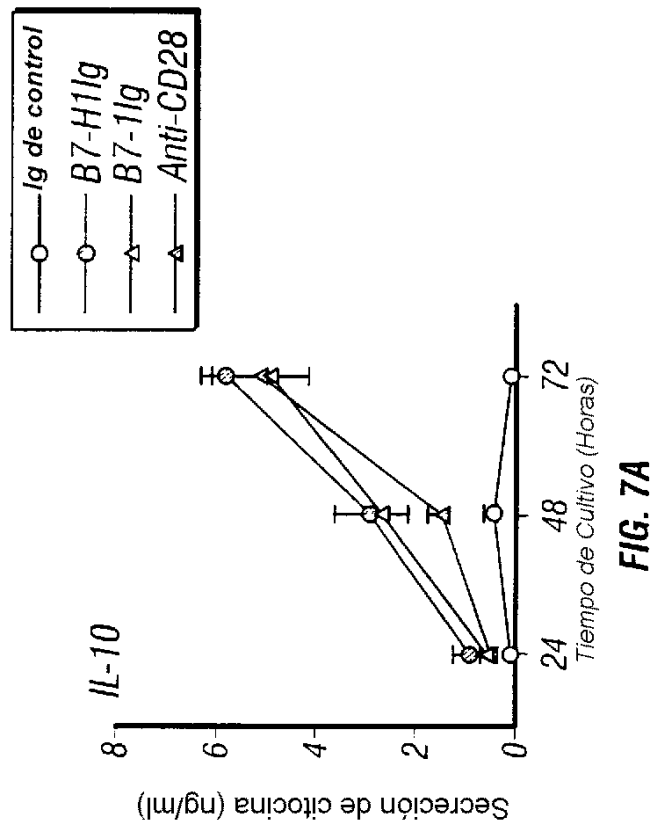
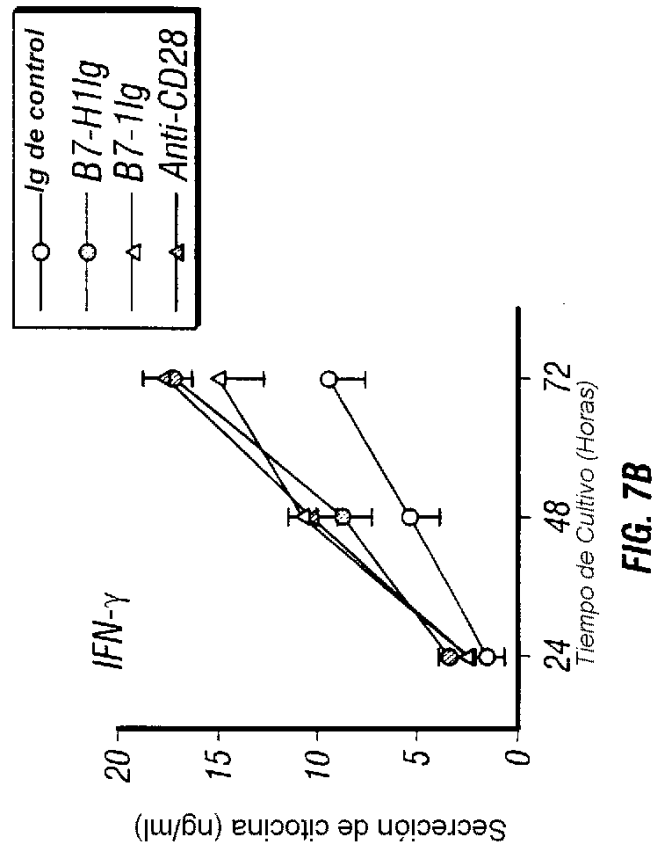
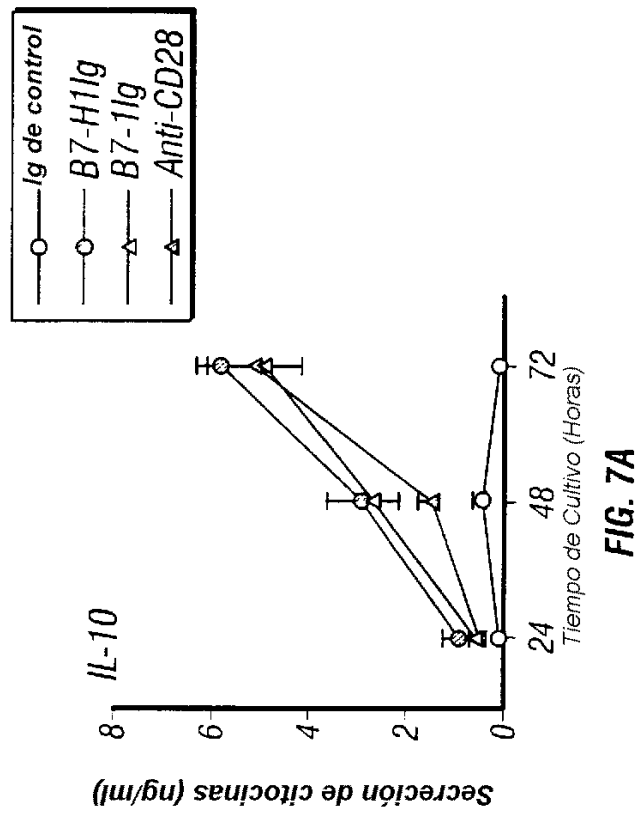
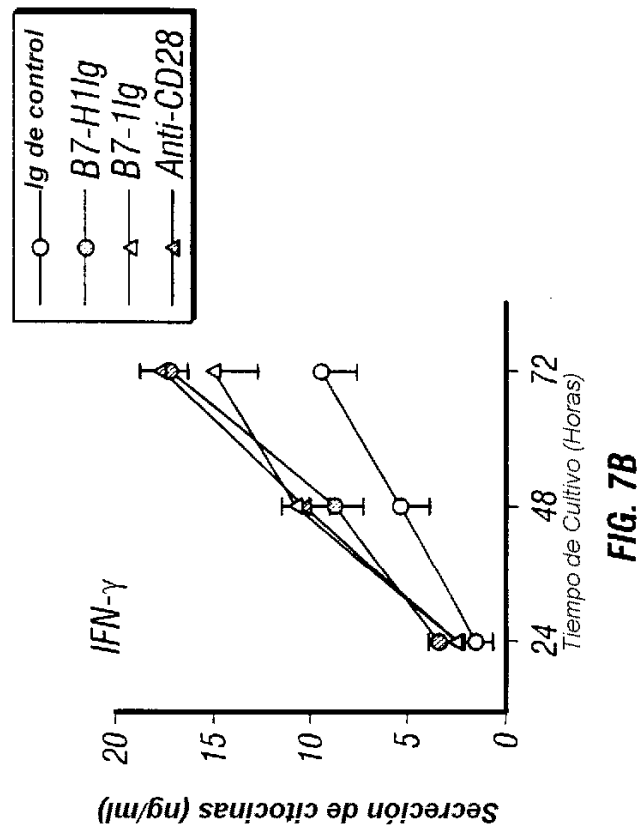


FIG. 6B





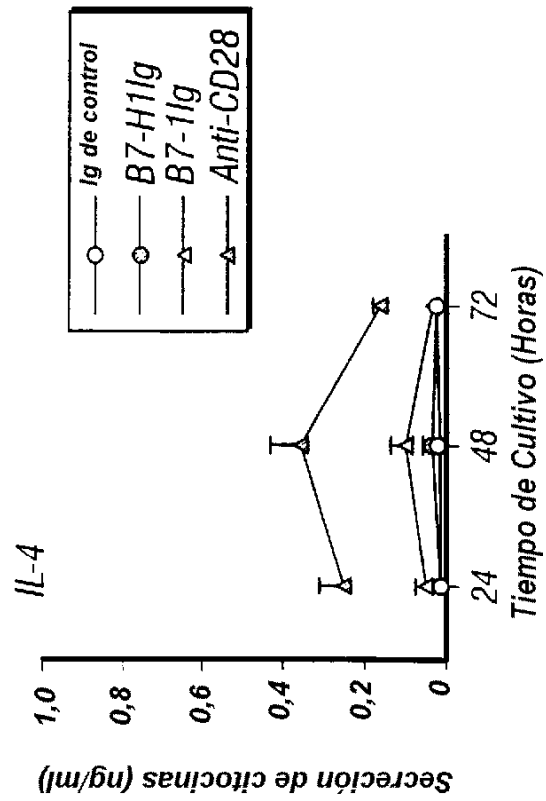


FIG. 7D

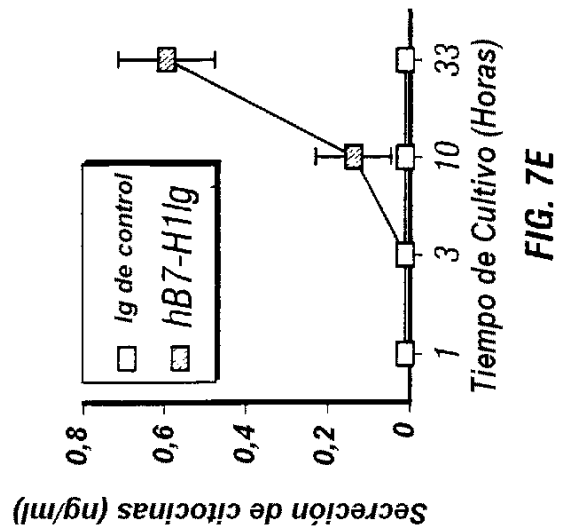


FIG. 7E

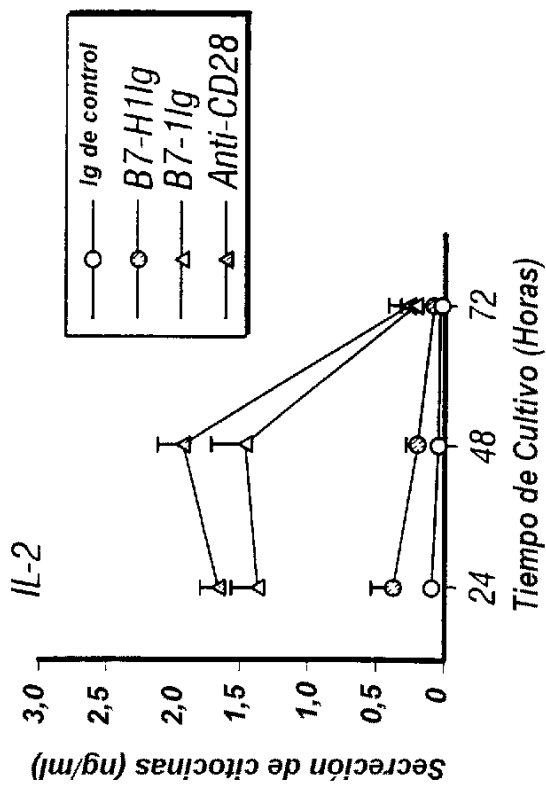


FIG. 7C

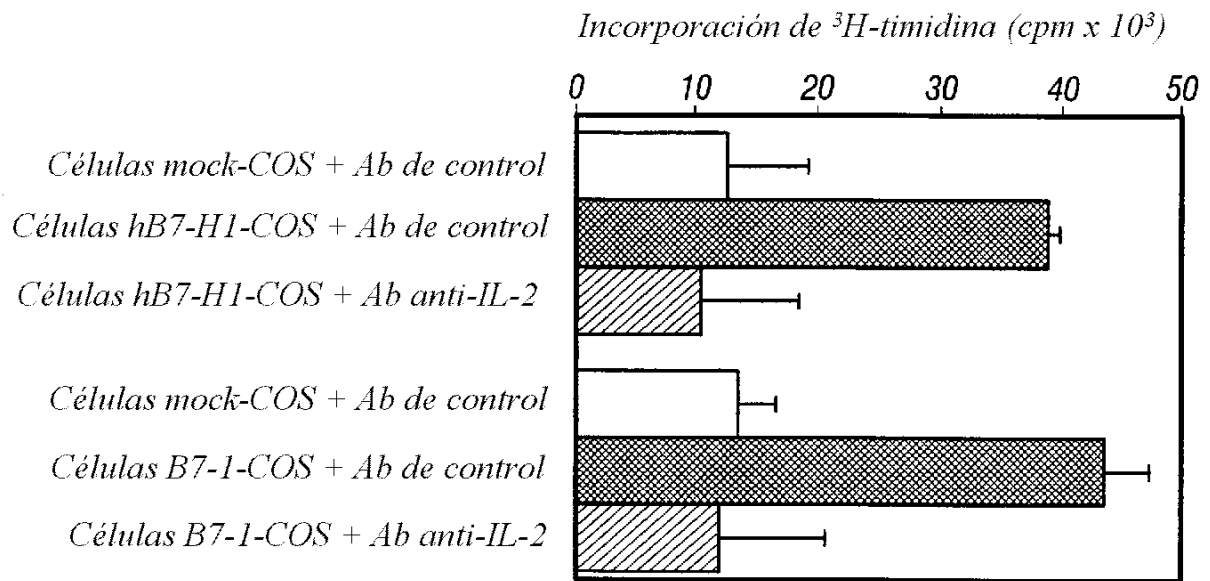


FIG. 8A

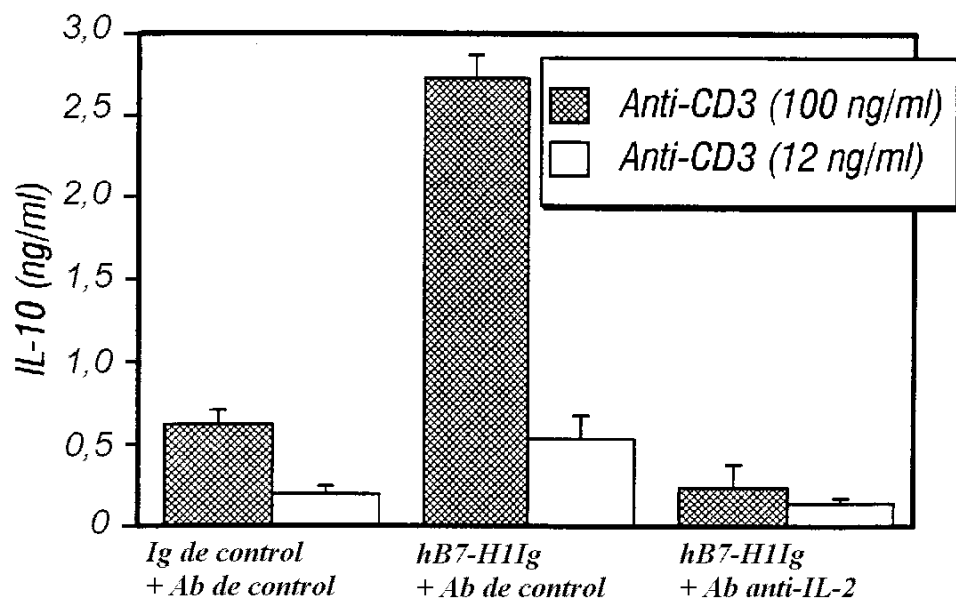


FIG. 8B

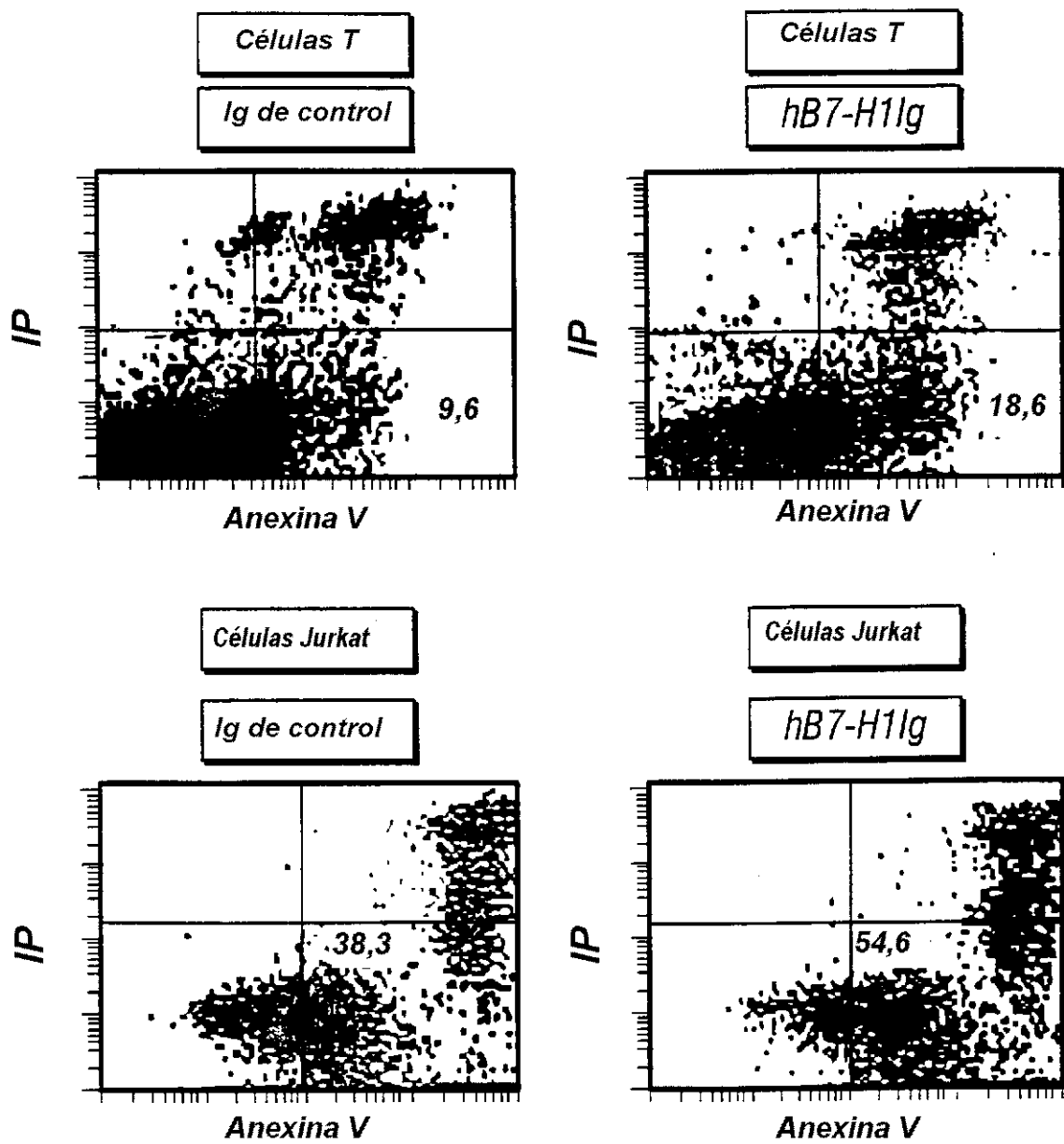


FIG. 9A

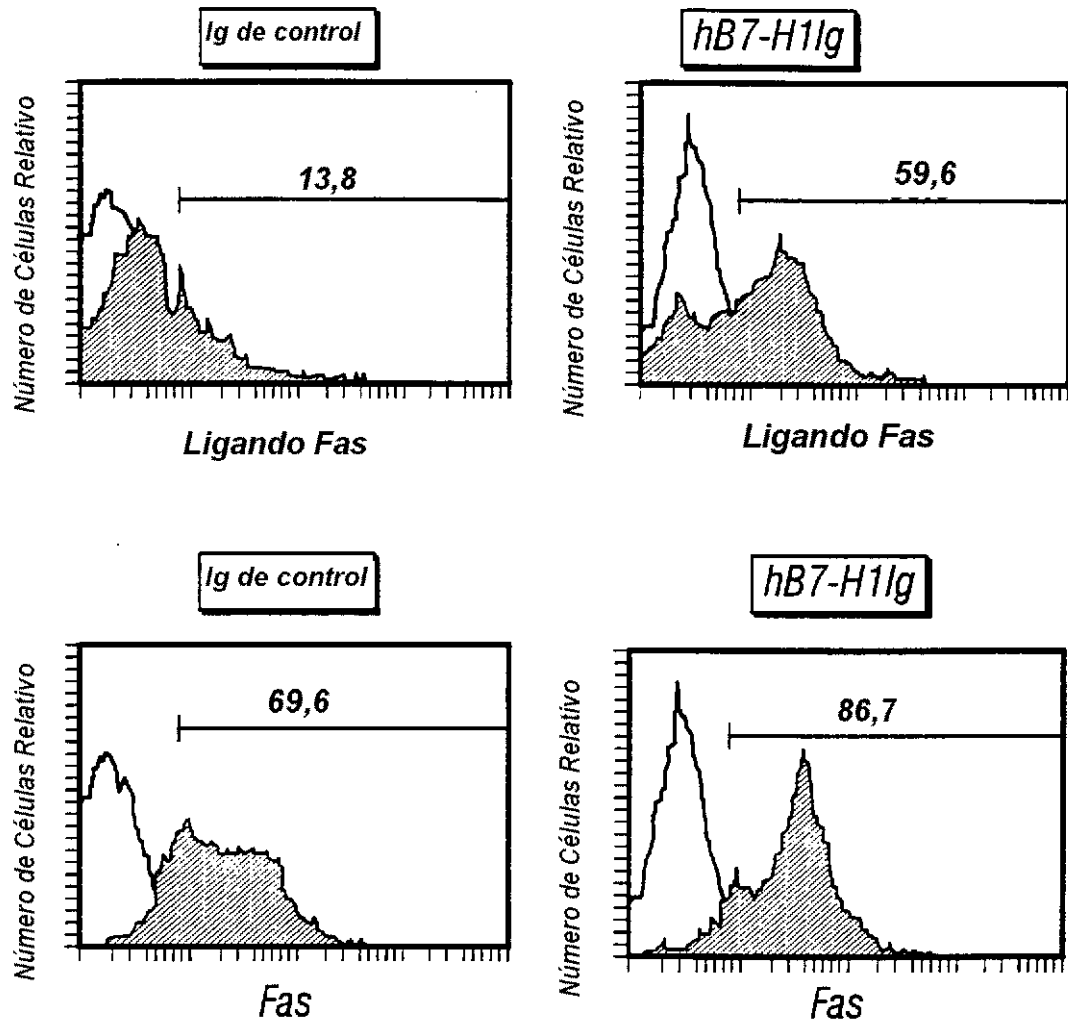


FIG. 9B

ATGAGGATATTTGCTGGCATTATATTCACAGCCTGCTGTCACTTGCTACGGGC
 GTTTACTATCACGGCTCCAAAGGACTTGTACGTGGTGGAGTATGGCAGCAAC
 GTCACGATGGAGTGCAGATTCCCTGTAGAACGGGAGCTGGACCTGCTTGCGT
 TAGTGGTGTACTGGGAAAAGGAAGATGAGCAAGTGATTTCAGTTTGTGGCAGG
 AGAGGAGGACCTTAAGCCTCAGCACAGCAACTTCAGGGGGAGAGCCTCGCT
 GCCAAAGGACCAGCTTTTGAAGGGAAATGCTGCCCTTCAGATCACAGACGTC
 AAGCTGCAGGACGCAGGCGTTTACTGCTGCATAATCAGCTACGGTGGTGCGG
 ACTACAAGCGAATCACGCTGAAAGTCAATGCCCCATACCGCAAAATCAACCA
 GAGAATTTCCGTGGATCCAGCCACTTCTGAGCATGAACTAATATGTCAGGCC
 GAGGGTTATCCAGAAGCTGAGGTAATCTGGACAAACAGTGACCACCAACCCG
 TGAGTGGGAAGAGAAGTGTCACTTCCCGGACAGAGGGGATGCTTCTCAA
 TGTGACCAGCAGTCTGAGGGTCAACGCCACAGCGAATGATGTTTTCTACTGT
 ACGTTTTGGAGATCACAGCCAGGGCAAAACCACACAGCGGAGCTGATCATCC
 CAGAACTGCCTGCAACACATCCTCCACAGAACAGGACTCACTGGGTGCTTCT
 GGGATCCATCCTGTTGTTCTCATTGTAGTGTCCACGGTCCTCCTCTTCTTGAG
 AAAACAAGTGAGAATGCTAGATGTGGAGAAATGTGGCGTTGAAGATAACAAG
 CTCAAAAAACCGAAATGATACACAATTCGAGGAGACGTAA

FIG. 10

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVV
 YWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAAALQITDVKLQDA
 GUYCCIIISYGGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVI
 WTNSDHQPVSQKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQN
 HTAELIIPELPATHPPQNRTHWVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGV
 EDTSSKNRNDTQFEET

FIG. 11

B7-H1 de ratón	péptido señal		
	1	MRIFA	35
B7-H1 humano	1	MRIFA	35
dominio similar a IgV			
B7-H1 de ratón	36	VTMECRFPVERELDL	70
B7-H1 humano	36	MTIECKFPVEKQLDL	70
dominio similar a IgC			
B7-H1 de ratón	71	EEDLKPPQHSNFRG	105
B7-H1 humano	71	EEDLKPPQHSNFRG	105
dominio similar a IgC			
B7-H1 de ratón	106	LQDAGVY	140
B7-H1 humano	106	LQDAGVY	140
dominio similar a IgC			
B7-H1 de ratón	141	IS-VDP	174
B7-H1 humano	141	IS-VDP	175
dominio similar a IgC			
B7-H1 de ratón	175	SGKRS	209
B7-H1 humano	176	SGKRS	210

FIG. 12A-1

B7-H1 de ratón	210	F W R S Q P G Q N H T A E L I P E L P A T H P P Q N R T H W V L L G	244
B7-H1 humano	211	F R L D P E E N H T A E L V I P E L P L A H P P N E R T H L V I L G	245
		— TM —	
B7-H1 de ratón	245	S I L L F L I V V S T V L L L E L R K Q V R M L D V E K C G V E D T S	279
B7-H1 humano	246	A I L L C L G V A L T F L R K G — R M D V K K C G I Q D T N S	279
		citoplasmático	
B7-H1 de ratón	280	K N R N D T Q F E E T	290
B7-H1 humano	280	K K Q S D T H L E E T	290

FIG. 12A-2

FIG. 12B-1

mB7-H1	116	IS.....YGGADYKRITLKVNA	VRKINORI	SVD	144
mB7-1	121	VOKKERTYEVKHLALVKLSIKAD	FSIPNI	TE	155
mB7-2	112	IQKKPPTGSIILQQTLTEL	SVIANFSEPE	IKLAQN	146
mB7h/B7RP-1	140	VFMTATELVKILEEVVRL	VAA	ESTP	174
		* L V A F S P I S			
mB7-H1	145	PATSE..HELI	COAE	GYPEAE..VI	175
mB7-1	156	PSADT..KRI	TCFASGGFP	KPR..FS	187
mB7-2	147	VTGNSGINL	TC	TSKQCHPKPK	181
mB7h/B7RP-1	175	SNPGQERTY	TCMSKNGY	PEPN..LY	207
		TC G P P W			
mB7-H1	176	GKRSVT..SR	TEGMLLNVTSS	LRVNA...	205
mB7-1	188	INTTIS...QDPESE	LYTIS	SQL	216
mB7-2	182	DNMQIS...QDN	VTLEFSIS	NSLS	213
mB7h/B7RP-1	208	D	TALQNNNTVYL	NKGLYDV	239
		* L S L T			
mB7-H1	206	FY	CTFWRSQPGQNHT...	A	236
mB7-1	217	IK	CLIKYGDAHVS.....	E	244
mB7-2	214	VV	CVLETESMKISSK...	PLN	240
mB7h/B7RP-1	240	V	LCVENVALHQNIT	SISQA	272
		C E FT E P P			

FIG. 12B-2

mB7-H1	237	R.	T HWV L I GS I L LE L I V STV L LE LRKQ V R	265
mB7-1	245	KN	T LV L FGAGFGA V I T V V I V V I I KCFCKHRSC F R	279
mB7-2	241	..	T YWKE I TA S V I VA L L I VM L L I I VCHKKPNQ P S R	273
mB7h/B7RP-1	273	..	T HNN E LKV I MP V LA V LA A AA F V SF I I Y R	300
			T V V R	
mB7-H1	266		MLDVEK C GV E DTSS K NR...ND T Q F E E T	290
mB7-1	280		R NE.A S R ETNN S I T FG P E E AA I AE Q I V F L	306
mB7-2	274	PSNTASKLER	DSNAD R ET I NI K ELE P Q I ASAK P NA E	308
mB7h/b7RP-1	301		R TR.PH R SY T GP K T V...Q L E I T D H A	322
			R R E K	

FIG. 12B-3

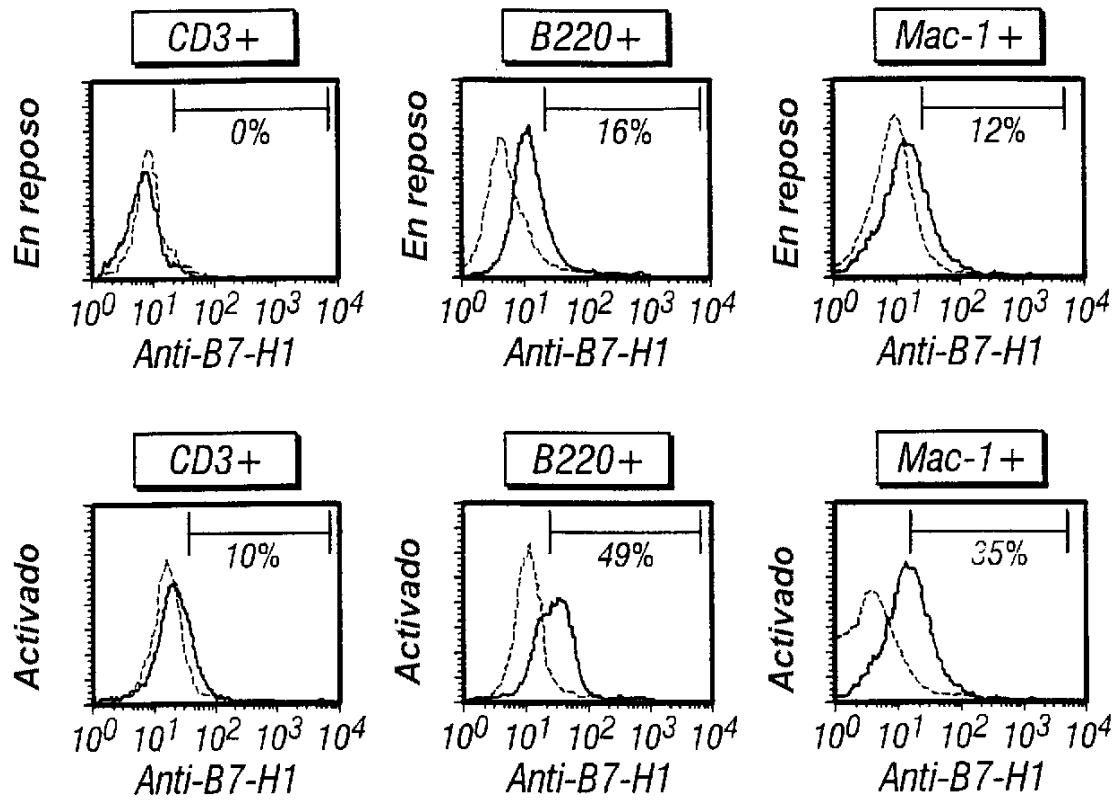


FIG. 13

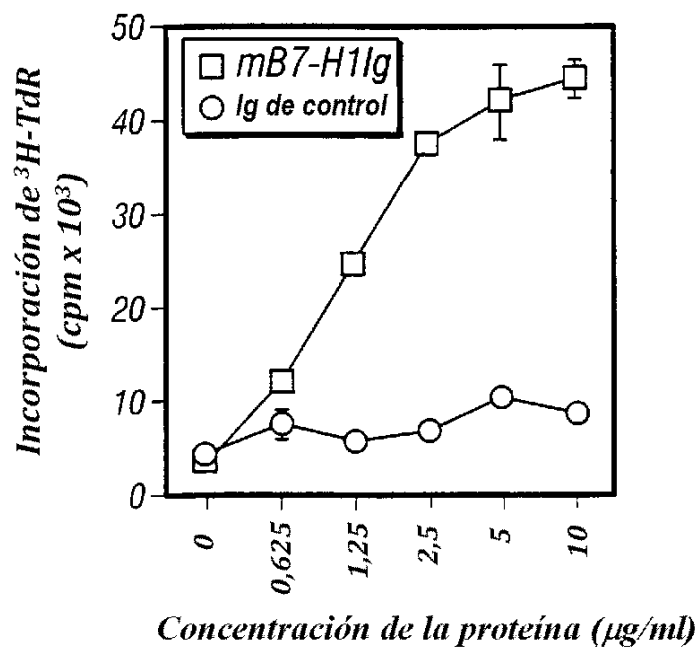


FIG. 14A

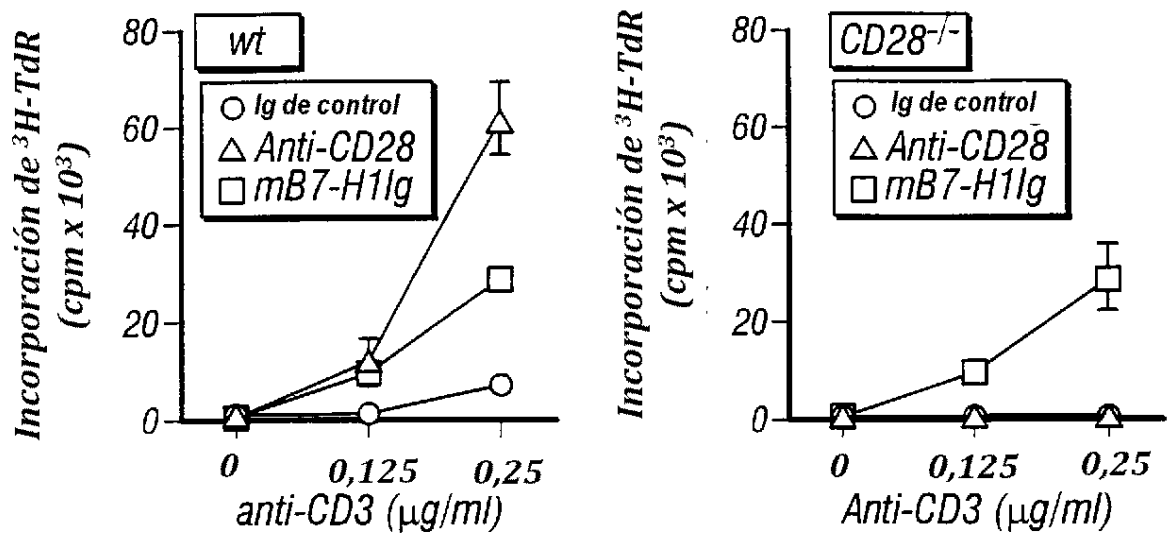


FIG. 14B

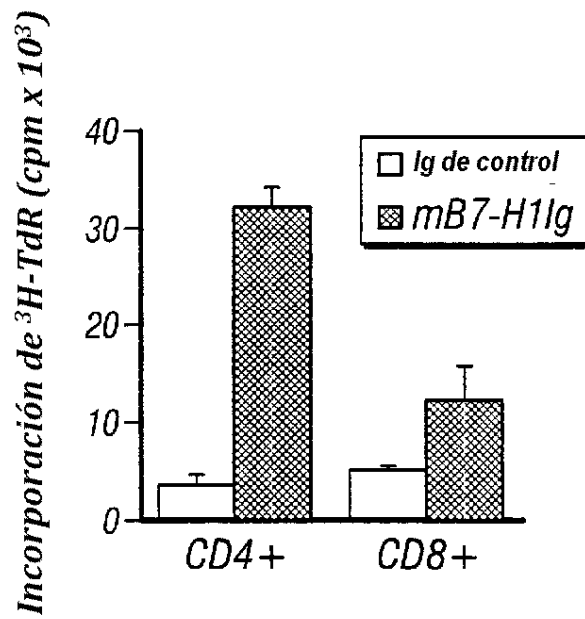


FIG. 14C

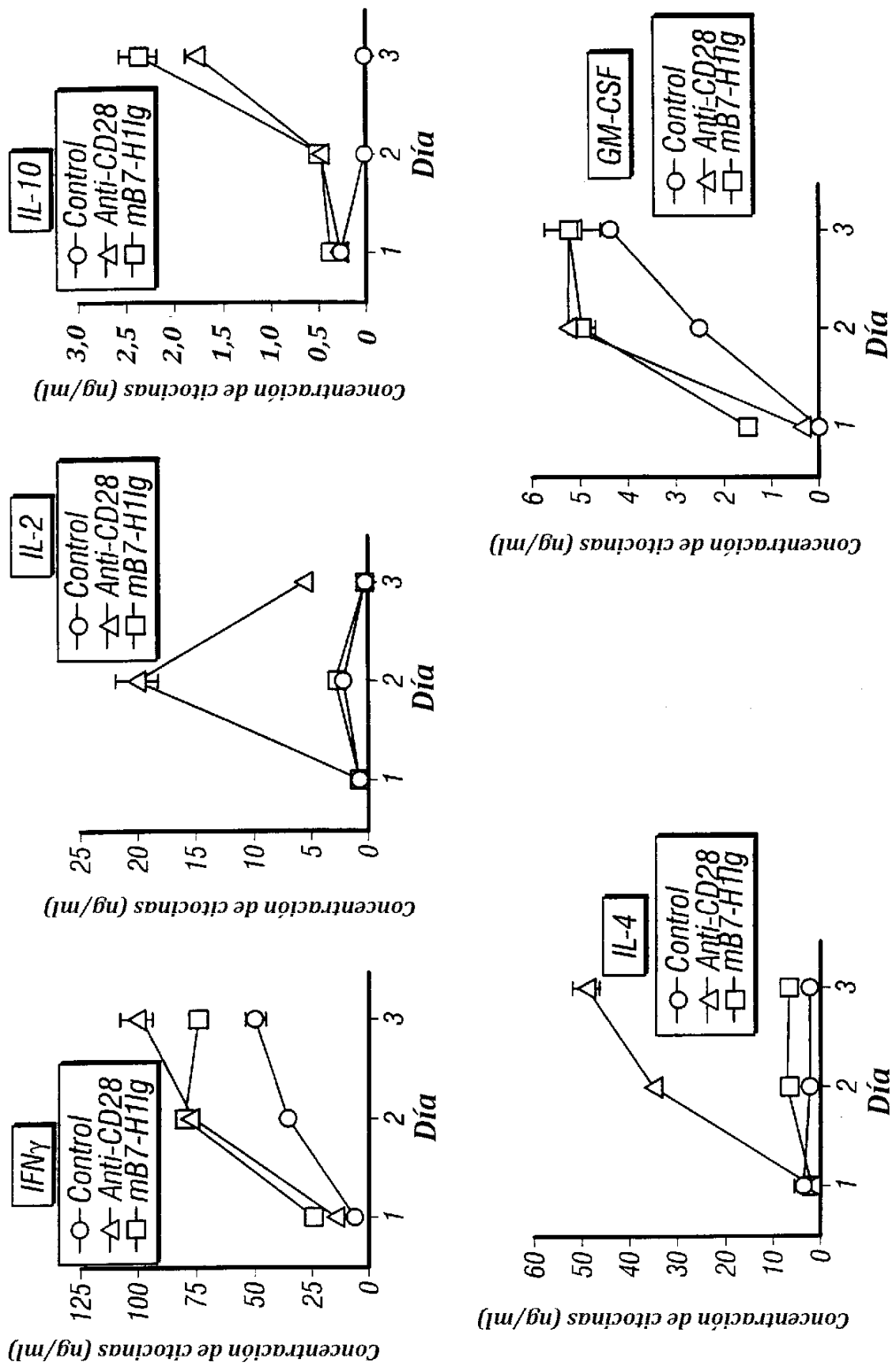


FIG. 15A

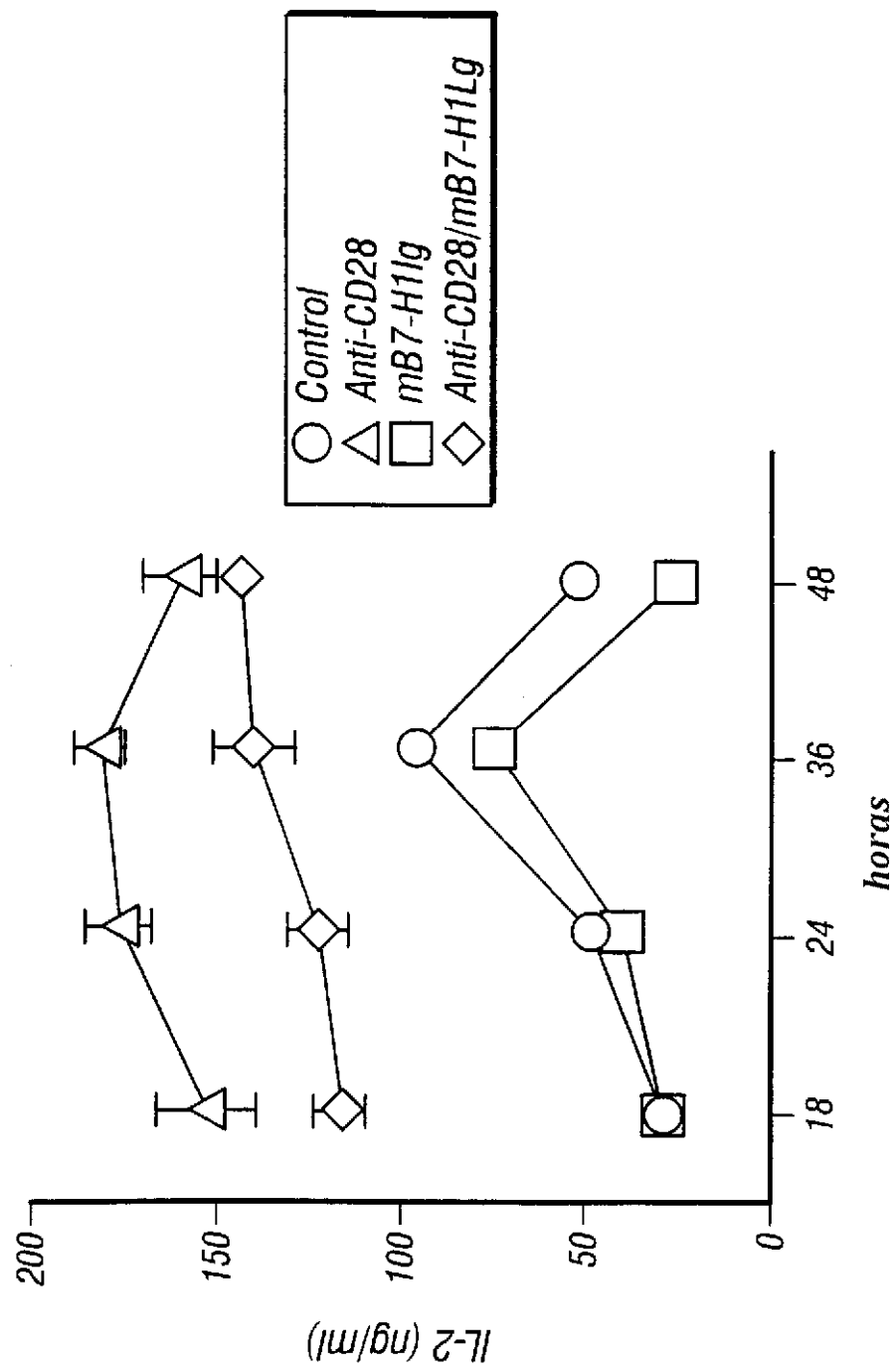


FIG. 15B

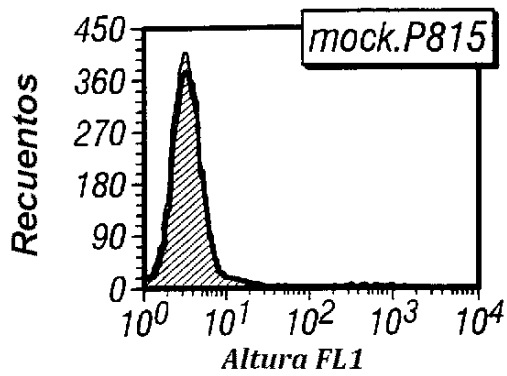


FIG. 16A

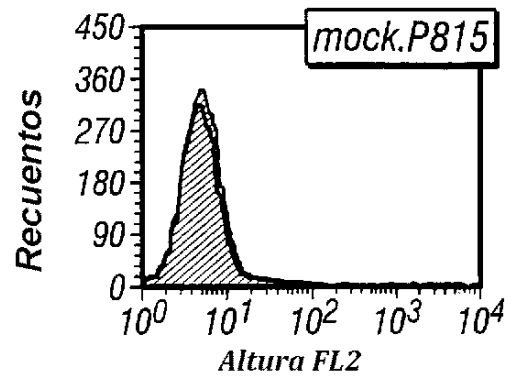


FIG. 16B

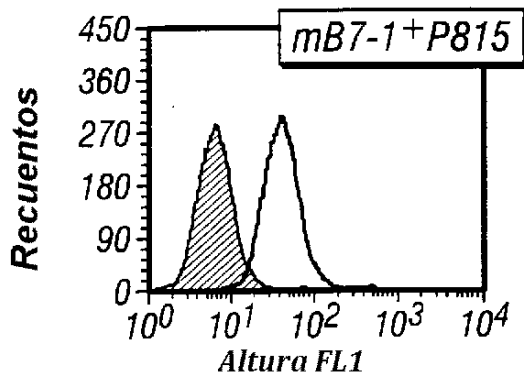


FIG. 17A

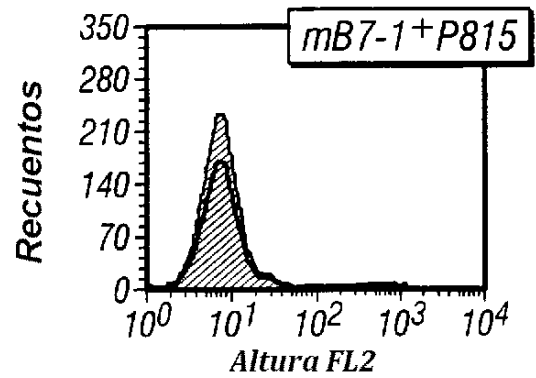


FIG. 17B

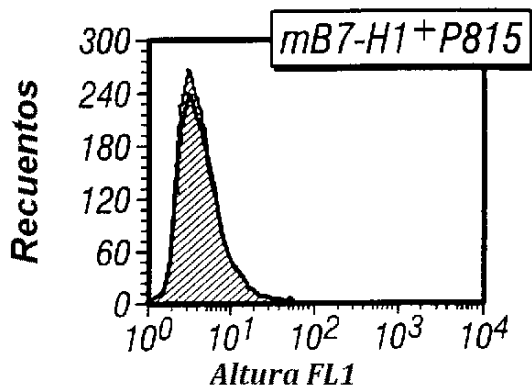


FIG. 18A

anti-mB7-1-FITC →

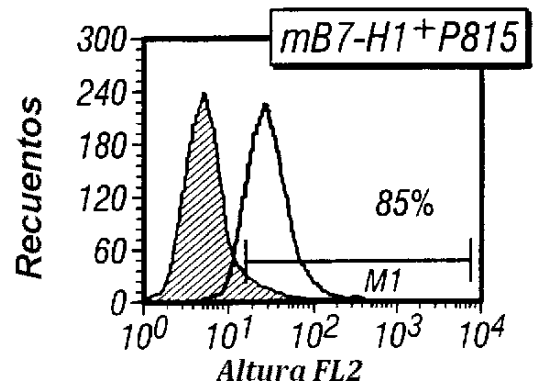


FIG. 18B

anti-mB7H/PE →

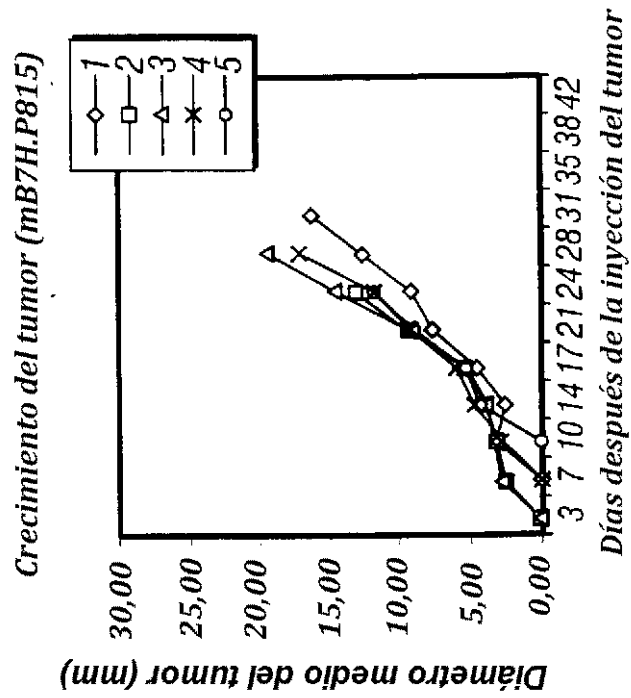


FIG. 19B

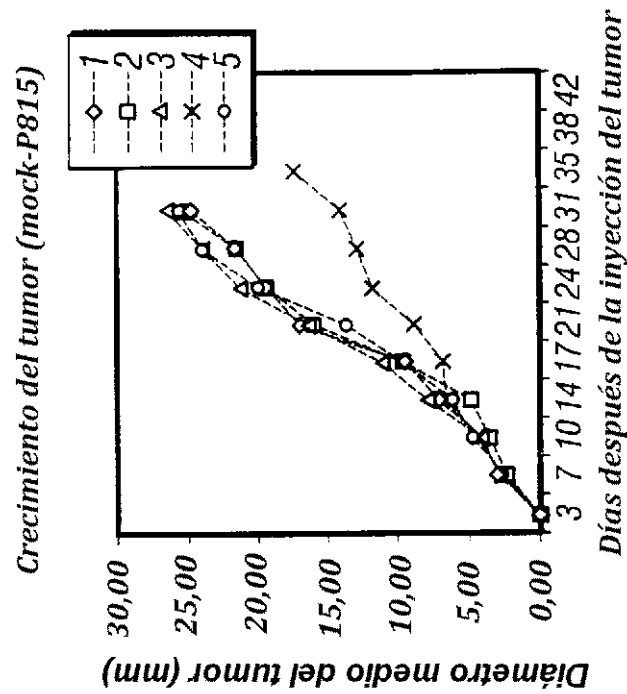


FIG. 19A

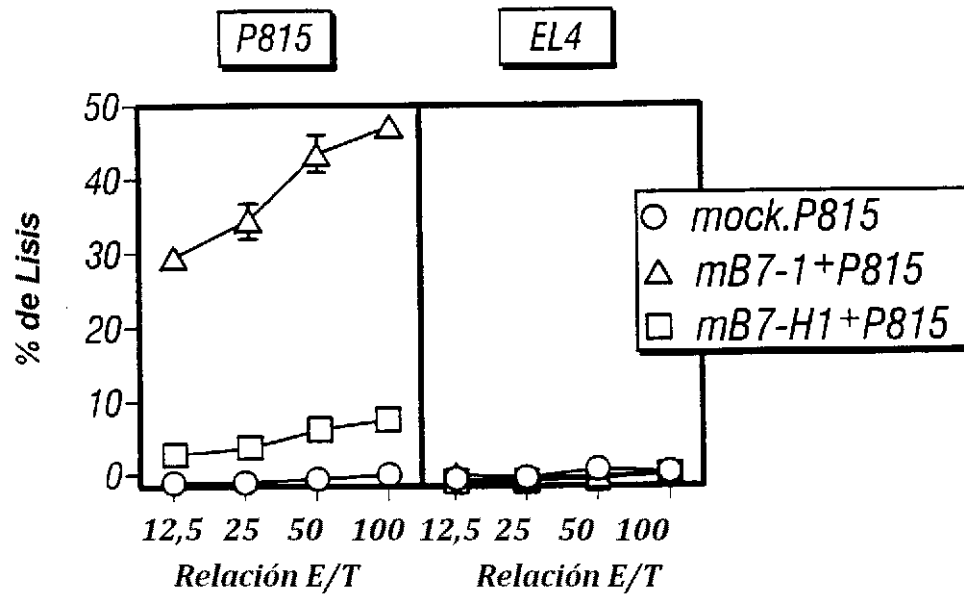


FIG. 20A

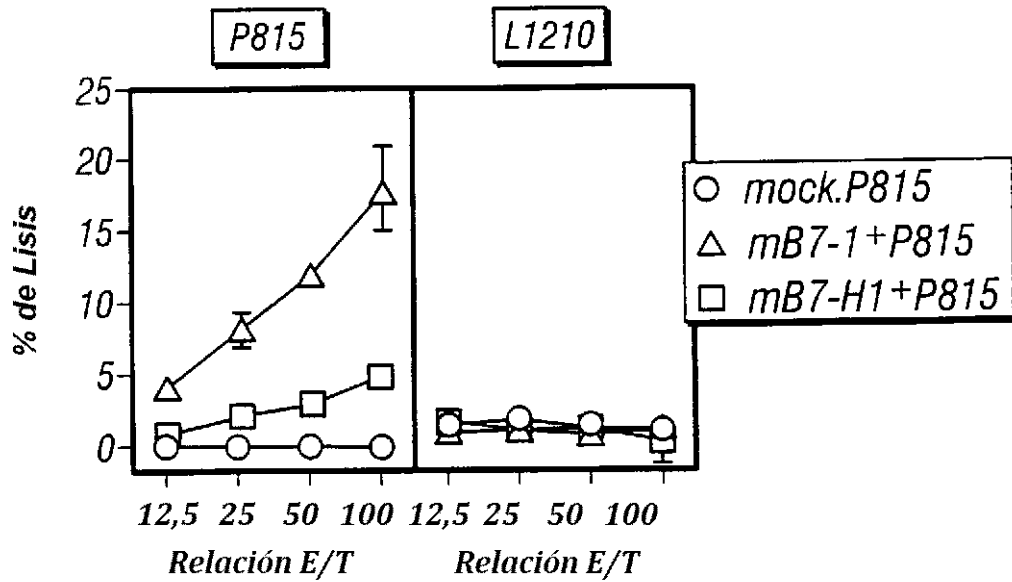


FIG. 20B

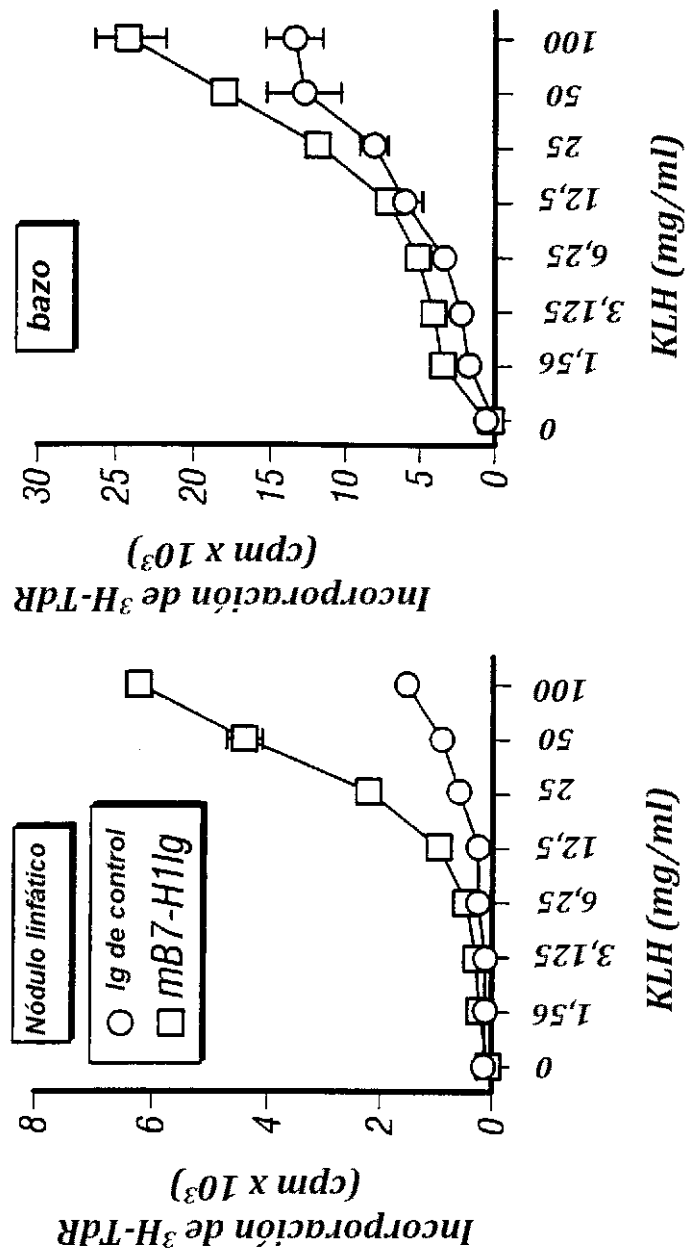


FIG. 21

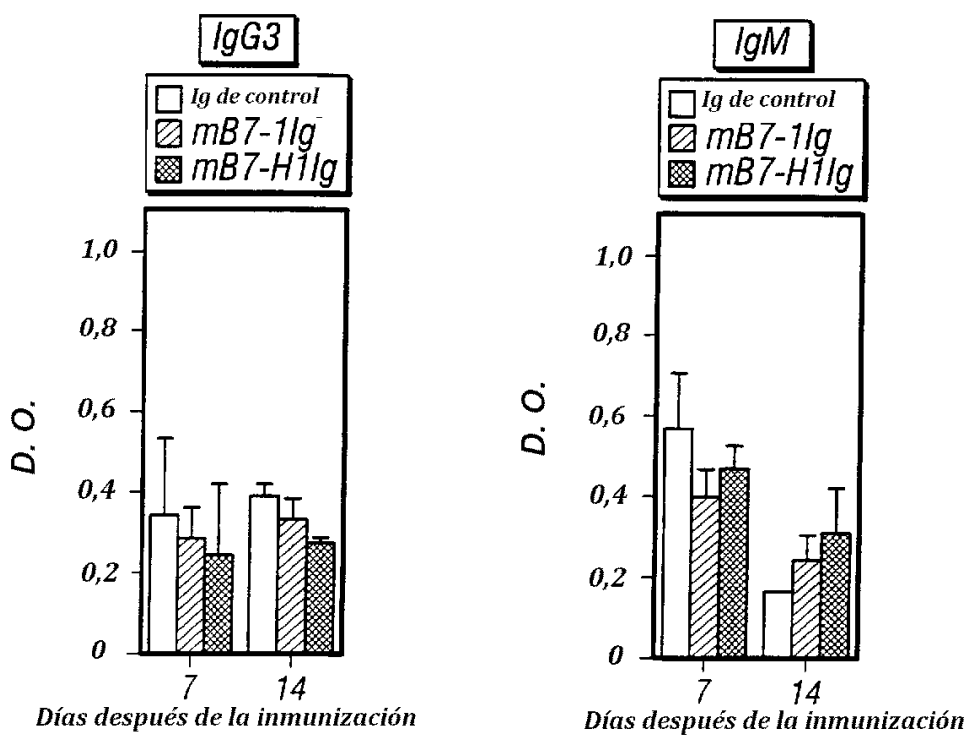
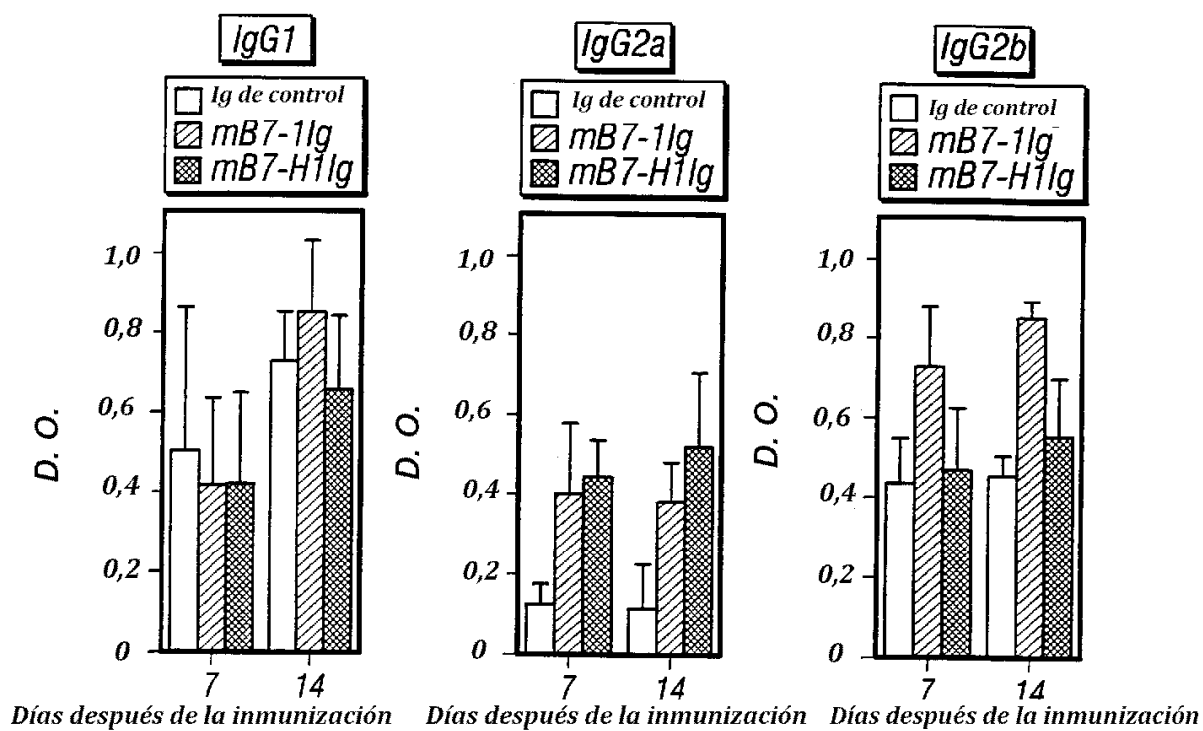


FIG. 22

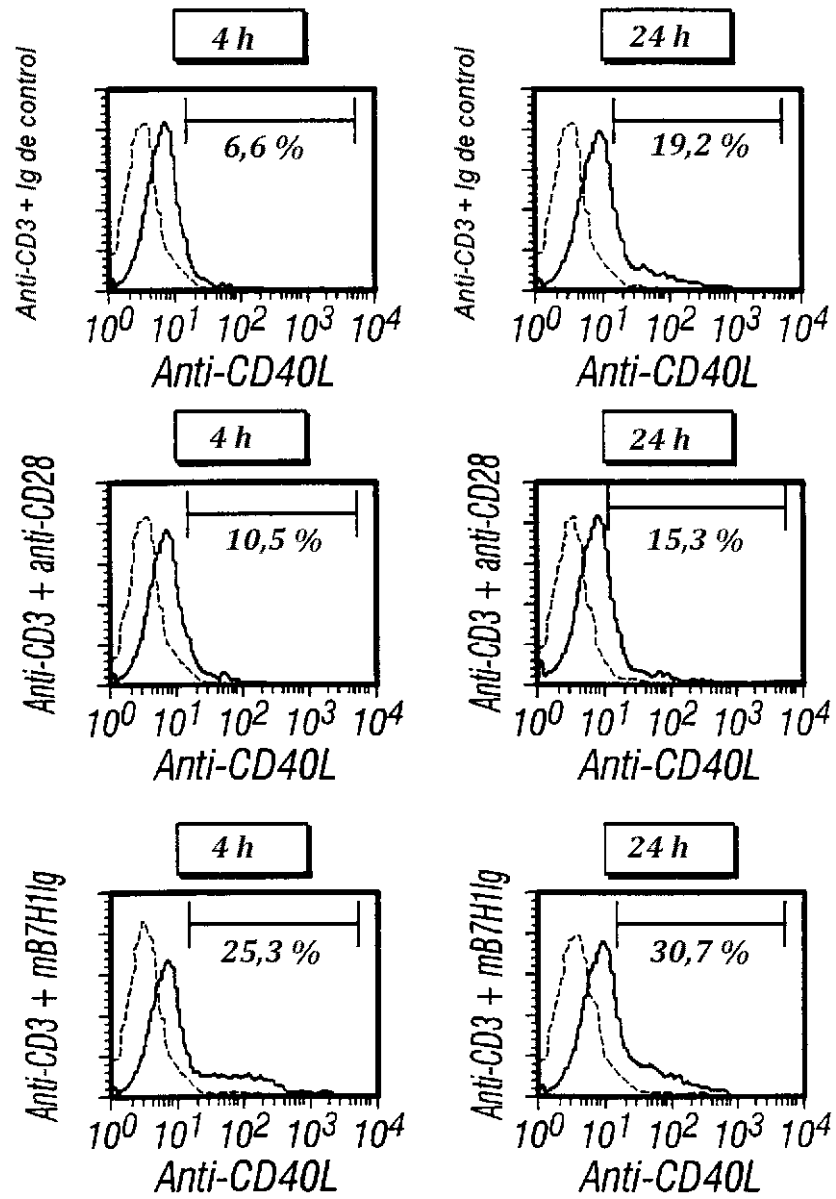


FIG. 23A

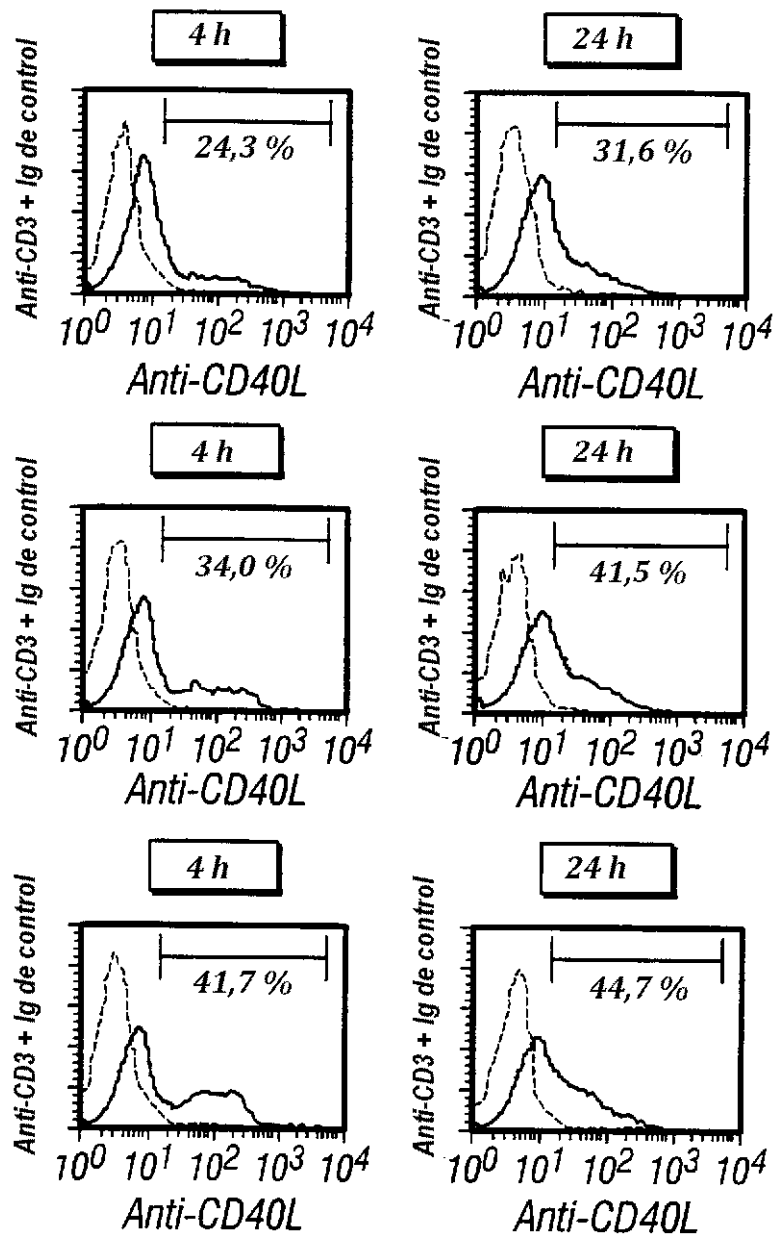


FIG. 23B