



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 745**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99924130 .0**

96 Fecha de presentación : **30.04.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1073741**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2001**

54

Título: **CD86 de felino.**

30

Prioridad: **01.05.1998 US 71699**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2011

73

Titular/es: **The Texas A&M University System**
3369 Tamu
College Station, Texas 77843-3369, US
SCHERING-PLOUGH Ltd.

72

Inventor/es: **Choi, In-Soo;**
Winslow, Barbara J.;
Collisson, Ellen, W. y
Cochran, Mark D.

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Actualmente no existen vacunas efectivas para la prevención de la enfermedad de inmunodeficiencia felina y de la enfermedad de peritonitis infecciosa felina en gatos. Las vacunas normales contra el virus de la leucemia felina están disponibles, pero su nivel de eficacia permanece en duda y, en algunos casos, puede causar la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de agentes y composiciones que proporcionan protección contra ésta y otras enfermedades, para las cuales todavía no existe una vacuna, o que mejoren la eficacia de las vacunas existentes y utilizadas habitualmente. Además, la vacunación de los cachorros de gato es difícil debido a la incapacidad de superar los anticuerpos maternos en los cachorros de gatos. También se necesitan agentes seguros y efectivos para ayudar a superar estas barreras.

Se considera que la estimulación de la activación y la proliferación de las células T en respuesta a la enfermedad en el huésped dependen de dos interacciones: el reconocimiento del receptor de la célula T (TCR) con péptidos inmunogénicos en el contexto de las moléculas de MCH clase I, y la interacción secundaria de ligandos accesorios, tales como CD80 y CD86, con sus correceptores, CD-28 y/o CTLA-4 sobre la célula T. El éxito de la interacción de estas dos vías conduce a la activación y proliferación de las células T tanto CD4+ como CD8+, y la producción incrementada de citoquinas de regulación inmunológica de tipo Th1 y Th2. En ausencia de la co-estimulación adecuada de las células T, se puede desarrollar un estado anérgico, de modo que las células T no proliferan ni segregan citoquinas. Con los años, han surgido dos moléculas como reguladores clave de las respuestas de las células T, CD28 y sus ligandos, CD80 y CD86. El CD28 es el receptor co-estimulante cebador de células T y tras la interacción con CD80 y CD86, aumenta la proliferación de células T y la síntesis de citoquinas, lo que evita la muerte de las células T. El CTLA-4 (también llamado CD152), un homólogo de CD-28, también juega un papel importante en la coestimulación. Aunque no se comprende completamente, parece inhibir las respuestas co-estimulantes de la célula-T. La interacción e interjuego entre CD28, CTLA-4 y sus ligandos CD80 y CD86 en procesos co-estimulantes, son claves para la inducción general y la supresión de las respuestas inmunológicas a la enfermedad en el huésped. Manipulando la expresión de estas 4 moléculas coestimulantes, puede ser posible regular respuestas de la célula-T a través de aumento, supresión o redirección, para producir una respuesta inmunológica deseada frente a un patógeno

en particular o condición de enfermedad. En particular, pueden ser útiles para la vacunación contra enfermedades infecciosas, tratamiento de enfermedades infecciosas y tratamiento de afecciones neoplásicas, degenerativas, autoinmunitarias y de inmunodeficiencia .

5 Los linfocitos-T del sistema inmunológico de mamíferos muestran funciones tanto de control como efectoras. Los progenitores de las células T surgen en la médula ósea a partir de células madre y emigran al timo. En el timo tiene lugar la maduración y selección para producir una población *naïve* de células inmunitarias, que tiene la capacidad de reconocer el antígeno en el contexto de la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), aunque no es autorreactiva. Después de la
10 maduración tímica, cada célula-T posee un receptor de célula-T clonalmente distribuido (TCR), que determina su especificidad antigénica. Además, las células-T CD4⁺ y CD8⁺, los dos principales subgrupos encontrados en la mayoría de los mamíferos adultos, poseen un TCR compuesto de subunidades α y β (Allison y Lanier, 1987).
15

La organización proteica y génica de la proteína TCR, es similar a la observada con moléculas de inmunoglobina (Ig) y comparte muchas propiedades similares a la Ig unida a la membrana en la células B (Allison y Lanier, 1987). Al igual que la molécula de Ig, el TCR debe reconocer de manera potencial un amplio número
20 de potenciales secuencias de antígeno. Por esta razón, la organización y reordenación del gen del TCR es similar en complejidad a la observada en las células B (Davis y Bjorkman, 1988). Al igual que con las moléculas de anticuerpo producidas por las células B, la generación de la diversidad idiotípica en las células T comprende múltiples copias de genes variables (V) en la línea germinal, reordenaciones aleatorias
25 de las subunidades α y β y la variabilidad generada por los acontecimientos de inserción y funcionales (Davis y Bjorkman, 1988). Sin embargo, a diferencia de las células-B, las células-T no parecen generar diversidad a través de mutación somática, ya que el repertorio potencial del TCR parece ser tan grande como el de la molécula Ig (Lechler y col , 1990).

30 El TCR, aunque es responsable del reconocimiento del antígeno, no tiene capacidades de envío de señal (Allison y Lanier, 1987). Los cambios conformacionales en el TCR, después de la unión al antígeno presentado en el contexto del MHC sobre la célula presentadora de antígeno (CPA), da como resultado un envío de señal a través de un complejo asociado de forma no covalente de las moléculas de superficie,
35 incluyendo el CD3, y las cadenas (Clevers y asociados ,1988). La unión al TCR da

como resultado la fosforilación del complejo CD3, que conduce de manera indirecta a un influjo Ca^+ hacia el interior de la célula, lo que inicia la producción de IL-2 e IL-2R (Weiss y Littman, 1994). Esta cascada se considera un acontecimiento inicial en la activación de la célula T.

5 El TCR reconoce el antígeno únicamente cuando se presenta en asociación con el MHC. Existen dos subpoblaciones de proteínas del MHC asociadas con la presentación del antígeno a la célula T. El MHC de clase I, se encuentra en casi todas las células nucleadas dentro del cuerpo, y funciona para expresar en la superficie los péptidos producidos de forma endógena (Matsumura y asociados,
10 1992). El péptido expresado en el contexto del MHC clase I es reconocido por las células T que expresan CD8 en asociación con el TCR (Littman, 1987). Las células T CD8⁺ funcionan como vigilantes inmunitarios para eliminar las células infectadas por virus y las neoplasias malignas. El reconocimiento de moléculas no independientes a través de la célula T CD8⁺ (péptidos o péptidos independientes alterados que pueden
15 indicar una neoplasia maligna), da como resultado la destrucción de la célula mediada por los linfocitos T citotóxicos (Berke, 1994).

Las moléculas del MHC de clase II, el segundo subgrupo del complejo mayor de histocompatibilidad, normalmente se encuentran únicamente en las células presentadoras de antígeno profesionales, incluidas células B, macrófagos/monocitos
20 y células dendríticas, aunque es posible la inducción en algunas otras poblaciones celulares en respuesta a estímulos específicos (Germain, 1993). La molécula del MHC de clase II, es responsable de la presentación del antígeno exógeno para la célula T CD4⁺. El antígeno sufre fagocitosis, endocitosis o une a la Ig de membrana y absorción por acción de las células presentadoras del antígeno es procesado
25 endógenamente y se une al MHC de clase II (Unanue, 1987). Posteriormente, la molécula se expresa en la superficie y queda disponible para el reconocimiento por parte de las células T $\alpha\beta$ que expresan CD4 (Littman, 1987). El reconocimiento antigénico por las células T CD4⁺, da como resultado la producción de citoquinas y factores de crecimiento necesarios para la iniciación y promulgación de muchas
30 facetas de una respuesta inmunoactiva (Mosmann y Coffman, 1987).

El CD4 y el CD8, diferencian los subgrupos de célula T $\alpha\beta$ y definen las propiedades funcionales de cada grupo. La presentación de CD4 ó CD8 en una célula T, es mutuamente excluyente (Littman, 1987). Por lo tanto, después de la selección y maduración tímica, las células T $\alpha\beta$ presentan únicamente CD4 ó CD8.
35 Las moléculas actúan para estabilizar la interacción entre TCR y el MHC unido al

antígeno y determinan si la célula T reconoce el antígeno presentado dentro del contexto del MHC de clase I o de clase II (Littman, 1987). El dominio de unión de la molécula CD4 ó CD8 reconoce las regiones no polimórficas respectivas de la molécula de clase I o de clase II (Clayberger y asociados, 1994). La unión de CD4 o CD8 a estas regiones específicas actúa para estabilizar la interacción de TCR/MHC unido al antígeno para la iniciación de la activación de célula-T (Littman, 1987). Por lo tanto, las células-T CD4⁺ interactúan únicamente de manera funcional con la CPA que expresa el antígeno en el contexto de la clase II e inicia una respuesta de las células T colaboradoras, mientras que las células-T CD8⁺ únicamente reconocen el antígeno presentado en el contexto de la clase I, y tras la unión inician una respuesta citotóxica (Germain, 1993). Los dos fenotipos distintos de las células-T colaboradoras y las CTL se pueden diferenciar por la expresión en la superficie de CD4 o de CD8.

La mayoría de los linfocitos-T que portan CD4 generalmente se consideran células colaboradoras, aunque existe se ha propuesto una subpoblación de CTL CD4⁺ (Yasukawa y asociados, 1989). Las células-T colaboradoras CD4⁺, son reguladores importantes de la respuesta inmunológica a través de la producción de una batería de citoquinas estimulantes y supresoras (Mosmann y Coffman, 1987). Los factores producidos por estas células son mediadores importantes en la iniciación tanto de una respuesta humoral o mediada por anticuerpos y una respuesta de hipersensibilidad tipo celular o retardada (DTH) (Mosmann y Coffman, 1987). Para que las células -T CD4⁺ se activen y produzcan factores de crecimiento solubles, debe ocurrir una compleja cascada de sucesos. El antígeno es detectado y se produce endocitosis por acción de una CPA profesional, normalmente un macrófago (Unanue, 1984). La CPA desnaturaliza la proteína y la rompe en fragmentos más pequeños, fragmentos peptídicos de entre 15-18 residuos de aminoácidos y , después, se unen al MHC en el retículo endoplásmico y, subsecuentemente, son transferidos a la superficie para su expresión (Rotzschke y asociados, 1994). Por lo tanto, el antígeno expresado en la superficie es visible para los linfocitos-T y puede ser reconocido por los subgrupos de células-T con el idiotipo de TCR adecuado y expresan CD4 (Germain, 1993). Cuando la célula-T reconoce el antígeno adecuado, y se emiten las señales accesorias adecuadas se produce la diferenciación del linfocito *naïve* y puede proceder la expansión clonal. Así, los estímulos aun no determinados dan como resultado el desarrollo preferencial de una respuesta tipo I (celular) frente a una respuesta de tipo II (humoral) (Mosmann y Coffman, 1989).

Se requiere la ayuda de la célula-T para gran parte de la actividad tanto de una respuesta humoral como celular. Una respuesta de células B dependiente de células T, necesaria para la fabricación de anticuerpos contra la mayoría de los antígenos, requiere la ayuda de las células T para que tenga lugar una adecuada maduración de la célula-B (Chesnut y asociados, 1986). Una vez que la Ig expresada en la superficie de la célula B se ha unido al antígeno, se produce la internalización, procesamiento y expresión en la superficie del MHC de clase II de estos antígenos (Germain, 1993). El contacto directo célula a célula, entre la célula T CD4⁺ con el ideotipo TCR adecuado y la célula-B estimula la activación y proliferación de la célula -T (Chesnut y asociados, 1986). La célula -T colaboradora activada puede tener la capacidad de estimular una respuesta de tipo II a través de la secreción de factores necesarios para el crecimiento y diferenciación de la célula -B (Mosmann y Coffman, 1989). Estos factores incluyen IL-4, IL-5 e IL-13, que inducen a la activación y proliferación de la célula-B y son importantes en los desplazamientos isotípicos para la molécula de Ig, mientras que la IL-10 actúa para prevenir la iniciación de una respuesta tipo I, que, a su vez, regularía por disminución la actividad humoral (Mosmann y Coffman, 1989).

Las respuestas celulares (de tipo I) no maduran de la misma forma que las respuestas humorales (de tipo II), (Sher y asociados, 1992). Tras la activación y maduración de la célula-T hasta una respuesta tipo I, las células T producen factores que favorecen la inmunidad celular. La IL-2, es un factor de crecimiento de célula-T que también estimula respuestas de CTL, mientras que el IFN γ actúa activando macrófagos, CTL y neutrófilos (Wang y asociados, 1996). Por lo tanto, las células T colaboradoras tienen la capacidad de mediar en dos respuestas mutuamente excluyentes en gran medida. El patrón de secreción de citoquinas que conduce a la iniciación de una respuesta humoral, contiene factores que son supresores de una respuesta celular y viceversa (Mosmann y Coffman, 1989). No queda claro lo que determina si una célula-T producirá un patrón de tipo I (IL-2, IFN- γ y linfoquinas) o un patrón de tipo II (IL-4, 5, 6, 10 y 13), aunque se propone que el tipo de CPA que presenta el antígeno o factores solubles producidos por la CPA, puede influir sobre el tipo del patrón de citoquina que se desarrolla (Mosmann y Coffman, 1989). Además de las células auxiliares tipo I y tipo II, existen subpoblaciones de células T colaboradoras de tipo 0 en las cuales los patrones de secreción son intermedios entre el tipo I y el tipo II (Gajewski y asociados, 1989). Aunque las subpoblaciones de células T colaboradoras se han demostrado principalmente en experimentos in vitro y

pueden ser artefactos de cultivo, son modelos importantes para el desempeño del papel de la célula auxiliar T, en la modulación del desarrollo de respuestas específicas en un ambiente *in vivo*.

Además del subgrupo de linfocitos T colaboradores CD4⁺, una segunda población de células T $\alpha\beta$, consiste en linfocitos citotóxicos portadores de CD8. Los CTL CD8⁺, parecen ser un componente importante del sistema de vigilancia inmunitaria, cuya función principal es destruir las células infectadas por virus e intracelularmente por bacterias, así como las neoplasias malignas (Berke, 1994). Estas células también tienen la capacidad de producir citoquinas, pero generalmente únicamente aquellas asociadas con la inducción de respuestas celulares (IL-2, IFN γ y TNF) (Fong y Mosmann, 1990). El TCR de estas células, en asociación con el CD8, reconocen el antígeno presentado en el contexto del MHC de clase I (Littman, 1987). En general, todas las células nucleadas expresan en la superficie péptidos presentadores de síntesis endógena de clase I (Matasumara, 1992). Los sitios específicos, inmunoprivilegiados, incluidos el cerebro y los testículos, tienen una expresión proteica de nivel bajo, aunque se puede inducir en estas áreas con la exposición a interferon (Moffett y Paden, 1994). Las proteínas producidas en el retículo endoplásmico a través del metabolismo normal de la célula están desnaturalizadas, parcialmente degradadas y unidas al MHC de clase I para la expresión en la superficie (Engelhard, 1994). Los polipéptidos son linearizados de forma proteolítica y se unen a epítomos de 9-12 aminoácidos a la clase I, que posteriormente se expresan en la superficie de la célula (Engelhard, 1994). De manera teórica, todos los péptidos producidos de forma endógena son expresados en la superficie de esta forma, e, idealmente, la selección tímica da como resultado la eliminación de todas las células-T autorreactivas, la inmunovigilancia puede detectar la presencia de células infectadas o transformadas por virus (Berke, 1993). El reconocimiento de péptidos extraños expresados por la clase I se facilita mediante los receptores de células-T específicos del antígeno en las CTL CD8⁺ (Lechler y asociados, 1990). Se requiere el contacto entre la célula efectora y objetivo a diana para que proceda la activación (Berke, 1994). Cuando el TCR detecta un antígeno que se ve como extraño la interacción entre las moléculas es estabilizada mediante la unión del CD8 a la clase I sobre la célula infectada (Littman, 1987). Una vez que ocurre el reconocimiento y la célula-T se activa, se forma un conjugado entre la célula diana y la célula T efectora, y se envía la célula efectora (Taylor y Cohen, 1992). Por lo tanto, de este modo, si las proteínas propias son alteradas o si la maquinaria

celular es capturada por un patógeno, los péptidos estarán disponibles para el reconocimiento por la vigilancia inmunitaria y este brazo del sistema inmunológico puede eliminar la célula enferma (Berke, 1994)

5 La citotoxicidad celular parece resultar de una de dos vías principales. O se induce a la célula a sufrir muerte apoptótica o se lisa a través de la liberación de gránulos citotóxicos por los CTL (Berke, 1993). La apoptosis es inducida en las células objetivo a través de la liberación de factores por los CTL que inducen la expresión del gen, lo cual da como resultado la muerte de la célula (Russel, 1983). Una ventaja de este mecanismo, es que no se produce la lisis celular y que se reduce el potencial de liberación de los contenidos potencialmente infecciosos de la célula (Nagata y Golstein, 1995). Sin embargo, la lisis celular puede ser el mecanismo más común a través del cual tiene lugar la eliminación de la diana. La perforina, que actúa perforando las membranas de las células diana, es un constituyente importante de los gránulos citotóxicos de los CTL (Liu y asociados, 1995). Aunque existen otros tipos de células involucrados en esta forma de inmunovigilancia, los CTL parecen ser un componente principal de la inmunidad antiviral y antitumoral y, contra patógenos específicos, se consideran indispensables para la protección (Kupfer y Singer, 1989).

15 Inicialmente, las proteínas de superficie celular se utilizaron para diferenciar poblaciones celulares específicas. Más recientemente se han derivado aspectos funcionales de muchas de estas moléculas y, aunque todavía son importantes en la delineación de poblaciones celulares, cada vez es más evidente su importante papel en la función de muchas células.

25 En las células-T y las células presentadoras de antígeno se expresa una variedad de moléculas accesorias y de adhesión que juegan un papel importante en el desarrollo de una respuesta inmunitaria productiva (van Seventer y asociados, 1991). Las moléculas de adhesión se expresan en algún nivel en la mayoría de las células del sistema inmunológico. Son importantes en la retención de células dentro de un área y en la iniciación y mantenimiento del contacto célula con célula (Mescher, 1992).

30 La CD-2/LFA 3 (CD58) y la LFA-1/ICAM-1 son dos complejos moleculares de adhesión involucrados en la estabilización de las interacciones célula-T/CPA y en el aumento de la actividad (Springer y asociados, 1987). El CD2 es uno de los primeros marcadores expresados en pre-células T y persiste a través de toda la vida de la célula, mientras que la LFA-1 se expresa posteriormente en las células T y se regula

por aumento en las células de memoria o mediante inducción (Springer y asociados, 1987)

Los complejos moleculares accesorios también demuestran propiedades de adhesión, pero su principal función es, probablemente, el envío de una señal intracelular tras la unión del ligando (Anderson y asociados, 1998). Tras el establecimiento de una interacción entre el receptor y su ligando tiene lugar un cambio conformacional en las estructuras de las moléculas, lo cual da como resultado el envío de una señal al citoplasma de una o de ambas células (Hutchcroft y Bierer, 1994). Las señales enviadas por estas moléculas juegan una variedad de papeles en la estimulación del desarrollo de las células T, pero, en ausencia de señales mediadas por estas moléculas, las células-T pueden convertirse en anérgicas (Leung y Linsley, 1994).

La interacción CD28/CD80 es un componente principal de una respuesta inmunológica productiva mediada por células T (Linsley y asociados, 1993a). Se requiere la interacción de la molécula accesoria CD28 con su ligando CD80 para la completa activación y proliferación de células-T *naïve* (Linsley y asociados, 1991a). La interacción también parece jugar un papel importante en la proliferación de células T CD4+ activadas y de memoria y en la prevención de la muerte celular apoptótica (Linsley y asociados, 1991a). El descubrimiento de la interacción y elucidación de sus mecanismos ha proporcionado un vínculo importante en la comprensión de la inmunidad mediada por células T.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ADN aislado y purificado que codifica un ligando de CD86 (B7-2) de felino, así como vectores que comprenden ácido nucleico que codifica CD86 de felino. La presente invención proporciona células huésped transformadas con vectores codificadores de CD86, La invención proporciona polipéptidos codificados por el ácido nucleico del CD86 de felino.

La presente invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad efectiva de polipéptidos codificados por el ácido nucleico del CD86 de felino. La presente invención, también proporciona vacunas que comprenden adicionalmente inmunogenes derivados de patógenos. La invención proporciona vacunas que tienen la capacidad de mejorar una respuesta inmunológica. La invención también proporciona vacunas que tienen capacidad supresora y de respuesta inmunológica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A: ADN y secuencia de aminoácidos de CD86 de felino (B7-2).
(SEC ID N° 5 y 6)

Figura 1B: Gráfico de la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos del
CD86 de felino (B7-2).

Figura 2A: ADN y secuencia de aminoácidos del CD28 de felino (SEC ID
N°7 y 8).

Figura 2B: Gráfico de la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos del
CD28 de felino.

Figura 3A: ADN y secuencia de aminoácidos de CTLA-4 (CD152) de felino.
(SEC ID N° 9 y 10)

Figura 3B: Gráfico de la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácido de
CTLA-4 (CD152) de felino.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

La presente invención comprende un ácido nucleico aislado que codifica un
ligando de CD86 de felino o un ligando soluble de CD86 de felino.

En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico que
codifica un ligando de CD86 de felino que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1A
que comienza con metionina y termina con glutamina (SEC ID N° 5).

En una realización de la invención anteriormente descrita, el ácido nucleico
es ADN o ARN. En otra realización, el ADN es ADNc o ADN genómico.

La invención, proporciona un oligonucleótido de por lo menos 12 nucleótidos
que tiene una secuencia complementaria a una secuencia presente únicamente en el
ácido nucleico que codifica el CD86 descrito anteriormente. Otra realización de la
presente invención proporciona un oligonucleótido que tiene por lo menos 15 ó 16
nucleótidos de longitud, que tiene una secuencia complementaria a una secuencia
presente únicamente en el ácido nucleico que codifica el CD86 descrito
anteriormente.

Otra realización de la invención anteriormente descrita proporciona un
oligonucleótido que está marcado de forma detectable. En una realización, el
marcador detectable comprende un radioisótopo, un fluoróforo o biotina. En otra
realización, el oligonucleótido está metilado de forma selectiva.

La invención proporciona un vector que comprende ácido nucleico que
codifica un ligando de CD86 de felino o un ligando soluble de CD86 de felino. La

invención proporciona un vector plasmídico denominado B7-2#19-2/011298 (Número de registro en la ATCC 209817). Este plásmido fue depositado el 29 de abril de 1998 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection) (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va 20108-0971, EE.UU., de conformidad con las condiciones del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimiento de Patentes.

La invención, proporciona un vector descrito en lo que antecede que comprende además un promotor unido de forma operable al ácido nucleico. En otra realización, la invención proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores antes descritos. En una realización, la célula huésped que comprende uno de los vectores antes descritos es una célula eucariótica o procariótica. En otra realización, la célula huésped es E. coli, levadura, células COS, células PC12, células CHO o células GH4C1.

Una realización de la invención proporciona un polipéptido codificado por el ácido nucleico que codifica un ligando de CD86 de felino o un ligando soluble de CD86 de felino.

En otra realización, la invención proporciona procedimientos para producir los polipéptidos antes descritos, cultivando una célula huésped que expresa los polipéptidos, y recuperando los polipéptidos producidos de este modo.

La presente invención, proporciona una vacuna que comprende una cantidad efectiva de los polipéptidos antes descritos y un transportador adecuado. En otra realización, la invención proporciona una vacuna en la que la cantidad efectiva del polipéptido antes descrito y del transportador adecuado es una cantidad de aproximadamente 0,01mg a aproximadamente 100 mg por dosis. En otra realización, la invención proporciona una vacuna en la que la cantidad efectiva del polipéptido antes descrito y del transportador adecuado es una cantidad de aproximadamente 0,25mg/Kg de peso corporal de un felino/día a aproximadamente 25 mg/ kg de peso de un felino/día.

La presente invención proporciona adicionalmente una vacuna descrita anteriormente que comprende además un inmunogen derivado de un patógeno. En otra realización, el inmunogen dentro de la vacuna deriva de un patógeno felino, un virus de la rabia, clamidia, Toxoplasmosis gondii, Dirofilaria immitis, una pulga o un patógeno bacteriano. En otra realización, la invención proporciona una vacuna en la que el patógeno felino es un virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la

leucemia felina (FeLV), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIP), el virus de la panleucopenia felina, el calicivirus felino, el reovirus felino de tipo 3, el rotavirus felino, el coronavirus felino, el virus sincitial felino, el virus del sarcoma felino, el herpesvirus felino, el virus del mal de Borna felino, o un parásito de felino.

5 La invención también proporciona un procedimiento para inducir inmunidad en un felino, que comprende la administración al felino de una dosis de una vacuna que contiene cualquiera de los inmunogenes antes descritos. La invención, también proporciona un procedimiento para mejorar una respuesta inmunológica en un felino, que comprende una dosis efectiva de un polipéptido, un inmunogen y un transportador
10 adecuado. La invención proporciona un procedimiento para administrar la vacuna antes descrita por vía subcutánea, intramuscular, sistémica, tópica, u oral.

 En otra realización, la invención, proporciona un procedimiento de supresión de una respuesta inmunológica en un felino, que comprende la administración al felino de una cantidad efectiva de supresión de las respuestas inmunológicas de un
15 polipéptido soluble que codifica el CD86 felino.

 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para suprimir una respuesta inmunológica en un felino, mediante la administración de aproximadamente 0,25 mg/kg de peso corporal/día a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal/día de un polipéptido que codifica el CD86 felino.

20 La presente invención también proporciona un procedimiento para suprimir una respuesta inmunológica en un felino que sufre una enfermedad autoinmunitaria o que es receptor de un transplante de tejido u órgano, mediante la administración al felino de una cantidad efectiva de supresión de respuesta inmunológica de un polipéptido que codifica el CD86 felino.

25 La presente invención, proporciona ADNc de CD86 (B7-2) de felino aislado y purificado de aproximadamente 1176 nucleótidos. La invención también proporciona polipéptido de CD86 de felino aislado y purificado de aproximadamente 320 aminoácidos, cuya forma nativa unida a la membrana o madura tiene una masa molecular de aproximadamente 36.394 kDa, un punto isoeléctrico de
30 aproximadamente 9,19, una carga neta a un pH de 7,0 de 11,27. La coexpresión de CD86 con moléculas co-estimulantes CD28 y un antígeno tumoral o un antígeno procedente de un organismo patógeno tiene la capacidad de activar o aumentar la activación de los linfocitos-T, induciendo la producción de citoquinas de estimulación inmunológica y la regulación del crecimiento de otros tipos de células. La coexpresión

de CD86 con la molécula co-estimulante CTLA-4 tiene la capacidad de regular la activación de los linfocitos T.

El CD86 felino de acuerdo con la presente invención se obtiene de fuentes nativas o recombinantes. El CD86 felino de acuerdo con la presente invención comprende la forma nativa y unida a la membrana o una forma secretada que carece de dominio transmembrana.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para mejorar en un felino una respuesta inmunológica a un inmunogen, lo que se logra administrando el inmunogen antes, después o substancialmente de forma simultánea con el CD86 felino, con o sin CD28 felino o CTLA-4 felino en una cantidad efectiva para mejorar la respuesta..

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para suprimir una respuesta inmunológica, lo que se logra administrando el inmunogen antes, después o substancialmente de forma simultánea con el CD86 felino con o sin felino CD28 o CTLA-4 felino, o con ARN o ADN antisentido, en parte o completo, que codifica el CD86 felino, o CD28 felino o CTLA-4 felino, en una cantidad efectiva para suprimir la respuesta inmunológica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna para inducir en felinos una respuesta inmunológica a un inmunogen, que se logra administrando ADN o ARN de un inmunogen y ADN o ARN de CD86 felino, molécula accesoria, que codifica la proteína o fragmento de proteína en una cantidad efectiva para modular la respuesta inmunológica.

La proteína CD86 felina tiene una secuencia de aminoácidos que es un 68% y 64% idéntica a la de las proteínas de ser humano y de conejo, respectivamente. Las proteínas CD86 de ser humano o de ratón, no pueden remplazar funcionalmente a las proteínas CD86 de felino. Por lo tanto, el CD86 felino es un reactivo nuevo requerido para la regulación de la inmunidad en felinos.

La memoria describe moléculas accesorias reguladoras de células T, CD86 (B7-2) o CD28 o CTLA-4 (CD152) de especies felinas. La memoria describe ácidos nucleicos aislados y purificados que codifican, en parte o por completo, el CD86 felino o el CD28 felino o CTLA-4 de felino, así como polipéptidos CD86, CD28 o CTLA-4 purificados procedentes de una fuente nativa o una recombinante. El CD86 felino producido de acuerdo con la presente invención se usa para mejorar la eficacia de las vacunas de felino contra tumores y organismos patógenos, y como terapéutico para tratar enfermedades virales y bacterianas en gatos. El CD86 felino producido de

acuerdo con la presente invención también se usa para aliviar enfermedades debidas a respuestas inmunológicas, sobreactivas, hiperactivas o mal dirigidas.

5 Ácidos nucleicos, vectores, transformantes

En las Figuras de la 3 a 5 se muestran las secuencias del ADNc que codifican el CD86 de felino (SEC ID N° 5), CD28 felino (SEC ID N° 7) o CTLA-4 de felino (SEC ID N° 9), y en las Figuras de la 3 a la 5 se muestran las secuencias de aminoácidos anticipadas de CD86 felino (SEC ID N°6), CD28 felino, (SEC ID N° 8) o CTLA-4 felino (SEC ID N°10). La designación de estos polipéptidos de felino, CD86, CD28 o CTLA-4, se basa en la homología parcial de la secuencia de aminoácidos con sus homólogos de ser humano, ratón o conejo de estos polipéptidos, y en la capacidad de los polipéptidos CD86 para unirse al receptor CD28 de felino (véase más adelante), o a CTLA-4 y para activar o estimular o, de otro modo, regular la activación de los linfocitos T. Además, sin desear quedar ligado a teoría alguna, se ha previsto que los polipéptidos de CD86 felino también exhiben una o más de las siguiente bioactividades: activación de células NK (asesinas naturales), estimulación de la maduración de células B, activación de linfocitosT citotóxicos restringidos por MHC, proliferación de mastocitos, interacción con los receptores de citoquinas e inducción de citoquinas que regulan la inmunidad.

Debido a la degeneración del código genético (es decir, varios codones codifican ciertos aminoácidos), las secuencias de ADN diferentes a las mostradas en las Figuras de la 1 a la 3 también pueden codificar las secuencias de aminoácidos de CD86, CD28 o CTLA-4 de felino que se muestran en las Figuras de la 1 a la 3. Dichos otros ADN incluyen aquellos que contienen variaciones “conservadoras de secuencia”, en las cuales un cambio en uno o mas nucleótidos en un codón determinado no da como resultado alteración en el aminoácido codificado en dicha posición. Además, un residuo de aminoácido determinado en un polipéptido a menudo puede cambiarse sin alterar la conformación y la función general del polipéptido nativo. Dichas variantes “conservadoras de la función”, incluyen, entre otras, la sustitución de un aminoácido por uno que tenga propiedades físico-químicas similares, tales como, por ejemplo, ácidas, básicas, hidrofóbicas, hidrofílicas, aromáticas y similares (p. ej., la sustitución de lisina con arginina, aspartato con glutamato o glicina con alanina). Además, las secuencias de aminoácidos se añaden o eliminan sin destruir la bioactividad de la molécula. Por ejemplo, se añaden secuencias de aminoácidos adicionales en los

extremos amino o carboxi-terminales para servir como etiquetas de purificación, tales como, etiquetas de histidina, (es decir, para permitir la purificación en una etapa de la proteína, después de lo cual se eliminan química o enzimáticamente). De manera alternativa, las secuencias adicionales confieren un sitio de unión de la superficie celular adicional, o, de otro modo, alteran la especificidad de la célula diana de CD80, CD86, CD28 o CTLA-4 de felino, tal como con la adición de un sitio de unión al antígeno para los anticuerpos.

Los ADNc de CD86 de felino o CD28 de felino o CTLA-4 de felino descritos en la presente invención son los de los ADN variantes conservadores de secuencia de las Figuras 1 a 3, secuencias de ADN que codifican polipéptidos variantes que conservan la función y combinaciones de los mismos. La invención comprende fragmentos de CD86 de felino que exhiben un grado útil de bioactividad, ya sea solos o en combinación con otras secuencias o componentes. Tal como se explicará posteriormente, está dentro de la experiencia en la técnica manipular de manera predictiva la secuencia de CD86, CD28 o CTLA-4 y establecer si una variante de CD86, CD28 o CTLA-4 de felino posee una estabilidad y bioactividad adecuadas para una aplicación determinada, o variaciones que afectan a las actividades de unión de estas moléculas dan como resultado un incremento de la efectividad. El CD86 de felino se unirá, al correceptor CD28 o al correceptor CLTA-4. Esto se puede lograr expresando y purificando la variante del polipéptido de CD86, CD28 ó CTLA-4 en un sistema recombinante y analizando su actividad estimulante de células T y/o la actividad que estimula el crecimiento en el cultivo celular y en animales, seguido por pruebas en la aplicación. En la variante CD86 se analiza la bioactividad mediante una funcional a los receptores CD28 o CTLA-4.

La presente invención también comprende ADN de CD86 de felino (y polipéptidos) derivados de otras especies de felino incluyendo, sin limitaciones, gatos domésticos, leones, tigres, guepardos, lince y similares. Los homólogos felinos de CD86, CD28 o CTLA-4 de la secuencia mostrada en las Figuras de la 1 a la 3 se identifican fácilmente mediante detección selectiva de ADNc o bibliotecas genómicas para identificar los clones que hibridan con las sondas que comprenden toda o parte de la secuencia de las Figuras de la 1 a la 3. De manera alternativa, las bibliotecas de expresión se someten a detección selectiva usando anticuerpos que reconocen el CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino.

Sin desear quedar ligados por teoría alguna, se prevé que los genes de CD86 de otras especies felinas compartirán por lo menos una homología de

aproximadamente el 70% con los genes de CD80, CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino. También dentro del alcance de la invención están los ADN que codifican homólogos de CD86 definidos como polipéptidos que codifican el ADN que comparten una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 25% con el CD86 felino.

5 Generalmente, las manipulaciones de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, utilizan procedimientos que son bien conocidos en la técnica, tales como los desvelados en, por ejemplo, Clonación Molecular, un Manual de Laboratorio (2da. Edición, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor), o en Protocolos Actuales en Biología Molecular (Ediciones Aufubel, Brent, Kingston, More, Feidman, 10 Smith and Stuhl, Greene Publ. Assoc., Wiley- Interscience, NY, NY, 1992).

La presente invención, comprende secuencias de ADNc y ARN y sentido y antisentido. La memoria describe secuencias de ADN genómico de CD86, CD28 o CTLA – 4 de felino y secuencias adyacentes, incluyendo, pero sin limitarse a, secuencias reguladoras. Las secuencias de ácido nucleico que codifican 15 polipéptido(s) de CD86, CD28 o CTLA-4 de felino también están asociadas con secuencias heterólogas, incluyendo promotores, potenciadores, elementos de respuesta, secuencias de señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificadoras de 5' y 3' y similares. Los elementos reguladores de la transcripción que están unidos de forma operable a la secuencia (s) de ADNc de CD86, CD28 o 20 CTLA-4 de felino, incluyen, sin limitaciones, las que tienen la capacidad de dirigir la expresión de genes derivada de células procaróticas, células eucarióticas, virus de células procarióticas, virus de células eucarióticas y cualquier combinación de los mismos. Otras secuencias reguladoras heterólogas útiles son conocidas para los expertos en la técnica.

25 Los ácidos nucleicos de la presente invención, se modifican a través de procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, para alterar su estabilidad, solubilidad, afinidad de unión y especificidad. Por ejemplo, las secuencias están metiladas de forma selectiva. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención también se modifican con una marcador capaz de proporcionar una señal 30 detectable, ya sea directa o indirectamente. Ejemplos de marcadores incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina y similares.

La presente memoria describe vectores que incluyen ácidos nucleicos que codifican en parte o en su totalidad, el(los) polipéptido(s) de CD86, CD28 o CTLA-4. Dichos vectores incluyen, por ejemplo, vectores plasmídicos para expresión en una 35 variedad de huéspedes eucarióticos o procarióticos. Preferentemente, los vectores

también incluyen un promotor unido de forma operable a la porción que codifica el polipéptido de CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino. Los polipéptido(s) de CD86, CD28 o CTLA-4 de felino codificado se expresa usandoo cualquiera vector y célula huésped adecuados, tal como se ha explicado en la presente memoria o como conocen los expertos en la técnica.

Los vectores adecuados para usar en la práctica de la presente invención incluyen, sin limitación, YEp352, pcDNA1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) , pRc/CMV (Invitrogen) , y pSFV1 (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD). Un vector preferido para utilizarse en la presente invención es pSFV1. Las células huésped adecuadas incluyen E. coli, levadura, células COS, células PC12, células CHO, células GH4C1, células BHK-21, y células de melanóforo de anfibio. Las células de BHK-21 son una línea celular huésped preferida para utilizarse en la práctica de la presente invención. Los vectores adecuados para la construcción de ADN desnudo o vacunaciones genéticas, incluyen sin limitación pTarget (Promega, Madison, WI), pSI (Promega, Madison, WI) y pADNc (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los ácidos nucleicos que codifican el/los polipéptido(s) de CD86, CD28 o CTLA-4 de felino, también son introducidos en las células a través de eventos de recombinación. Por ejemplo, una secuencia es microinyectada en una célula, efectuando la recombinación homóloga en el sitio de un gen endógeno que codifica el polipéptido, un análogo o seudogen del mismo, o una secuencia con identidad substancial para un gen de codificación de polipéptido CD80, CD86, CD28 o CTLA-4 de felino. También se utilizan otros procedimientos basados en recombinación, tales como recombinaciones no homólogas, y eliminación del gen endógeno mediante recombinación homóloga especialmente en células pluripotentes.

La presente invención proporciona un procedimiento para aumentar en un felino una respuesta inmune a un inmunogen , lo cual se logra administrando el inmunogen antes, después o substancialmente de forma simultánea con el CD86 de felino con o sin CD28 de felino o CTLA-4 de felino, en una cantidad efectiva para aumentar la respuesta inmunológica.

La presente invención, proporciona un procedimiento para mejorar en un felino una respuesta inmunológica a un inmunogen , lo cual se logra administrando un vector de expresión que contiene un inmunogen derivado de un patógeno de felino y las moléculas accesorias de CD86 de felino, con o sin CD28 de felino o CTLA-4 de felino en una cantidad efectiva para mejorar la respuesta inmunológica.

La presente invención, proporciona un procedimiento para redirigir en un felino, una respuesta inmune a un inmunogen, lo cual se logra administrando un vector de expresión el cual contiene un inmunogen derivado de un patógeno de felino, y las moléculas accesorias de CD86 de felino con o sin CD28 de felino o CTLA-4 de felino en una cantidad efectiva para mejorar la respuesta inmunológica.

La presente invención, proporciona un procedimiento para suprimir en un felino, una respuesta inmunológica a un inmunogen, lo cual se logra administrando el inmunogen antes, después o substancialmente de forma simultánea con el CD86 de felino con o sin CD28 de felino o CTLA-4 de felino, o con ARN o ADN antisentido que codifica el CD86 de felino o el CD28 de felino o el CTLA-4 de felino, en una cantidad efectiva para suprimir la respuesta inmunológica.

La presente invención proporciona una vacuna para inducir en un felino, una respuesta inmunológica a un inmunogen (s), que comprende el inmunogen y una cantidad efectiva de CD86 de felino, con o sin CD28 de felino o CTLA-4 de felino para mejorar la respuesta inmunológica, o CD86 de felino con CTLA-4 de felino para la supresión de la respuesta inmunológica. En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un vector de expresión que contiene genes de inmunogen (s), para patógenos y genes de felino CD86, con o sin CD28 de felino o CTLA-4 de felino para el aumento o supresión de la respuesta inmunológica.

Polipéptidos CD86, CD28 o CTLA – 4 de felino

El gen CD86 de felino (el ADNc y secuencia de aminoácidos que se muestran en la Figura 1), codifica un polipéptido de aproximadamente 320 aminoácidos. El gen CD28 de felino (el ADNc y secuencia de aminoácidos que se muestran en la Figura 2), codifica un polipéptido de aproximadamente 221 aminoácidos. El gen CTLA-4 de bioactivos (el ADNc y secuencia de aminoácido que se muestra en la Figura 3), codifica un polipéptido de aproximadamente 223 aminoácidos.

La purificación de CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino procedente de fuentes naturales o recombinantes, se logra a través de procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa en columnas C4, filtración en gel, enfoque isoeléctrico, cromatografía de afinidad y similares. Se pueden obtener grandes cantidades de CD86, CD28 ó CTLA – 4 de felino, construyendo una secuencia de ADN recombinante, que comprende la región de codificación para CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino fusionada en la estructura a una secuencia que codifica 6 residuos de

histidina en el extremo C en el replicón pSFV1 (GIBCO/BRL). El ARNm codificado por este plásmido, es sintetizado utilizando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica, e introducido en células BHK-21 mediante electroporación. Las células sintetizan y secretan polipéptidos CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino glicosilados maduros que contienen 6 histidinas en el extremo C. Los polipéptidos de CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino modificados se purifican a partir del sobrenadante celular mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de unehistidina (His-bind, Novagen, Madison, WI).

Los polipéptidos de CD86 de felino aislados de cualquier fuente, son modificados a través de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino se fosforilan o desfosforilan, glicosilan o desglicosilan y similares. Son especialmente útiles las modificaciones que alteran la solubilidad, estabilidad y especificidad y afinidad de unión de CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino.

Moléculas Quiméricas de CD86, CD28 ó CTLA – 4 de felino.

La presente invención, comprende la producción de moléculas quiméricas elaboradas a partir de fragmentos de CD86 de felino en combinación con CD28 y CTLA-4 de felino en cualquier combinación. Por ejemplo, se introduce el sitio de unión de CTLA-4 en lugar del sitio de unión a CD28, para aumentar la afinidad de unión de CD28, mientras que se mantiene el aumento de la respuesta inmunológica.

En una realización, se intercambian los sitios de unión para CD86 en CTLA-4 y CD28, de modo que una región de unión CD28 es remplazada por una región de unión de CTLA-4. El efecto de la molécula CD28 quimérica con una región de unión CTLA – 4, es incrementar la afinidad de CD28 por CD86 e incrementar la magnitud de aumento de la respuesta inmunológica. En una realización alternativa, las moléculas quiméricas de CD86 y CD28, o fragmentos de los mismos, están unidos a la membrana y mejoran las capacidades de aumento inmunológico de estas moléculas. En una realización alternativa, las moléculas quiméricas de CD86 y CTLA-4, o fragmentos de las mismas, están unidos a la membrana y mejoran las capacidades de supresión inmunológica de estas moléculas. En una realización alternativa, las moléculas quiméricas de CD86 y CTLA-4, o fragmentos de las mismas, están unidos a la membrana y redirigen la respuesta inmunológica para lograr el efecto deseado.

ANTICUERPOS CD86, CD28 Ó CTLA – 4 DE ANTI – FELINOS.

La presente memoria describe anticuerpos que son específicos para polipéptidos CD86, CD28 ó CTLA–4 de felino identificados como se ha descrito en lo que antecede. Los anticuerpos son policlonales o monoclonales y diferencian CD86, CD28 ó CTLA–4 de felino procedente de diferentes especies, identifican dominios funcionales y similares. Dichos anticuerpos son elaborados de manera conveniente, utilizando los procedimientos y composiciones desveladas por Harlow y Lane, en Anticuerpos, un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, así como tecnologías inmunológicas y de hibridoma conocidas para los expertos en la técnica. Cuando se utilizan péptidos derivados de CD86, CD28 ó CTLA–4 sintéticos o naturales, para inducir una respuesta inmunológica específica de CD86, CD28 ó CTLA–4 de felino, los péptidos están acoplados de manera conveniente a un transportador adecuado tal como KLH, y se administran en un adyuvante adecuado tal como adyuvante de Freund. Preferentemente, los péptidos seleccionados están acoplados, sustancialmente de acuerdo con los procedimientos de Tan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 85:5409-5413, a un transportador de núcleo de lisina. Los anticuerpos resultantes, especialmente los anticuerpos anti – idiotípicos de generación de imagen interna, también se preparan utilizando procedimientos conocidos.

En una realización, el CD86 felino purificado, se utiliza para inmunizar ratones, después de lo cual sus bazo son removidos, y los esplenocitos se utilizan para formar híbridos de célula con célula de mieloma, para obtener clones de células segregadoras de anticuerpos de acuerdo con las técnicas estándares en la técnica. Los anticuerpos monoclonales resultantes, segregados por dichas células, son seleccionados utilizando ensayos in vitro para las siguientes actividades: una a CD86 de felino, inhibición de la actividad de unión al receptor de CD86 e inhibición de la actividad estimuladora de la célula – T de CD86.

Se utilizan los anticuerpos CD86 anti-felino, CD28 anti-felino ó CTLA–4 anti-felino, para identificar y cuantificar el CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino, utilizando inmunoensayos tales como ELISA, RIA, y similares. Los anticuerpos de CD86 anti-felino CD28 anti-felino, ó CTLA-4 anti-felino, también se utilizan para extractos de inmuno disminución de CD86 de felino o CD28 de felino o CTLA–4 de felino. Además, estos anticuerpos pueden utilizarse para identificar, aislar y purificar CD86, CD28 ó CTLA–4 de diferentes fuentes, para realizar estudios de localización subcelular e histoquímica.

APLICACIONES

El ligando de CD86 (B7-2) de felino, producidos de acuerdo con la presente invención, puede ser utilizado de forma beneficiosa como una vacuna para prevenir enfermedades infecciosas, o para promover el crecimiento en especies felinas homólogas o heterólogas. Por ejemplo, la coexpresión de CD86 con moléculas co-estimulantes CD28 ó CTLA-4 en cualquier combinación, y un antígeno o antígenos de tumor procedentes de un organismo patógeno. La coexpresión de CD86 de felino, con un receptor CTLA-4 de felino, tiene la capacidad de inhibir la activación de linfocitos-T y suprimir una respuesta inmune. Un ejemplo específico, sería coexpresar CD86 con VIF, FeLV, o FIP derivado de inmunogenes en un vector viral o un vector de expresión de ADN, el cual, cuando se administra en la forma de una vacuna, podría activar, mejorar o regular la producción de linfocitos T CD4+ y CD8+ y podría inducir citoquinas de regulación inmunológica tales como IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-6 y similares. Otro ejemplo específico, sería expresar CD86 en un vector viral o en un vector de expresión de ADN, el cual cuando se administra en la forma de un terapéutico, podría regular o redirigir la respuesta inmunológica.

El aumento de inmunidad a través de la interacción de CD86 de felino con CD28 ó CTLA-4 o, inhibición de una respuesta, a través de la interacción de CD86 de felino con CTLA-4, tiene la ventaja del proceso natural de regulación en lugar de agregar sustancias extrañas que podrían tener múltiples efectos perjudiciales aún en la salud en general o, a largo plazo. La molécula de CD86 se administra con otras moléculas recombinantes, tales como aquellas que codifican antígenos que son deseables para la inducción de inmunidad. El gen de CD86 de felino es insertado en un vector de expresión e infectado o transfectado en una célula objetivo y expresa el producto del gen dentro de la célula objetivo, de modo que es anclado en la membrana del plasma de la célula objetivo o la célula que presenta el antígeno, o secretado fuera de la célula diana o célula presentadora del antígeno. Un vector de expresión, tal como un plásmido, virus Semliki Forest, un poxvirus o un herpesvirus, transfiere el gen a la célula que presenta el antígeno. El gen de CD86 felino o fragmentos de genes en cualquier combinación, es insertado en un vector de expresión de ADN o ARN e inyectado en un felino, y expresa el producto del gen en el felino, en la forma de ADN/ARN “desnudo” o vacuna genética. La coexpresión del inmunogen y el CD86 dentro de una célula objetivo o felina, contribuye a la activación, activación mejorada o regulación de linfocitos T, linfocitos B y otras células. De manera alternativa, la proteína expresada podría ser administrada después de la expresión en un plásmido.

Las proteínas de CD86, CD28 ó CTLA-4 de felino, normalmente funcionan ancladas en la membrana celular como moléculas accesorio de la membrana del plasma, pero pueden ser presentadas en otras formas, particularmente sin anclas de membrana.

En una realización, el CD86 de felino es soluble, carece de un dominio transmembrana o región hidrofóbica, e interactúan con moléculas co-estimulantes CD28 ó CTLA-4, ya sea en la forma de unión de membrana o soluble. En una realización alternativa, el CD86 de felino está unido a la membrana y las moléculas co-estimulantes CD28 ó CTLA-4 están de forma soluble, careciendo de un dominio de transmembrana o región hidrofóbica. El CD28 ó CTLA-4 soluble, preferentemente en un forma dimérica, es útil para tratar enfermedades relacionadas con inmunosupresión mediadas por la célula-T en gatos. El CD28 ó CTLA-4 soluble, evita el rechazo de tejido transplantado, y puede ser utilizado para tratar enfermedades de autoinmunidad. De manera específica, el CD28 ó CTLA-4 soluble, es útil para prevenir los injertos contra enfermedades huésped en un transplante de médula ósea. El CD28 ó el CTLA-4 soluble, evita el une de una célula que contiene CD86 de felino de unión de membrana.

Las variantes conservadores de secuencia y conservadoras de función de ADN y polipéptidos de CD86 de felino, o un fragmento o subfragmento, CD86, de felino bioactivo, son fusionados en estructura para otra secuencia, tal como, una citoquina, interleuquina, interferona, factor de estimulación de colonia, antígeno procedente de un microorganismo patógeno, anticuerpo o secuencia de purificación, tal como un his-tag o un gen reportero, tal como LacZ de *E. coli*, uidA de *E. coli*, o proteína verde fluorescente.

25 ***Vacunas***

La presente invención, comprende procedimientos y composiciones para mejorar la eficacia de una respuesta inmune en especies de felinos. En esta realización, el CD86 de felino, se usa en conjunto con un inmunogen, para el cual se desea provocar una respuesta inmunológica. Por ejemplo, en vacunas de felinos que contienen inmunogenes procedentes de patógenos, tales como virus de inmunodeficiencia felina y virus de leucemia de felino, y otros patógenos tales como parvovirus de felino, leptovirus de felino, y coronavirus de felino, se desea incluir CD86 de felino en la vacuna para regular la magnitud y cualidad de la respuesta inmunológica. Para este propósito, el CD86 de felino purificado procedente de fuentes nativas o recombinantes, tal como se describió anteriormente, se incluye en la

formulación de la vacuna a una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 0,01 hasta 100,0 mg por vacuna por gato.

Las fuentes comerciales de vacunas para felinos son conocidas por los expertos en la técnica (Compendio de Farmacéuticos Veterinarios, 1997) (Compendium of Veterinary Pharmaceuticals, 1997) y se utilizan en combinación con la presente invención para una vacuna más efectiva.

Una vacuna para inducir y regular en un felino una respuesta inmunológica a un inmunogen, está comprendida de un inmunogen y una cantidad efectiva de CD86 de felino con o sin CD28 de felino o CTLA-4 de felino para el aumento de la respuesta inmunológica, o CD86 de felino con CTLA-4 de felino, para la supresión de la respuesta inmunológica.

El inmunogen es seleccionado del grupo que comprende, pero no se limita a patógenos de felino tales como, virus de inmunodeficiencia felina, virus de leucemia de felino, virus de peritonitis infecciosa de felino, virus de panleucopenia de felino (parvo), calicivirus de felino, reovirus de felino tipo 3, rotavirus de felino, coronavirus de felino (peritonitis infecciosa), virus de rabia, virus sincitial de felino, virus de sarcoma de felino, herpesvirus de felino (virus rinotracheitis), virus del padecimiento de Borna de felino, clamidia, toxoplasmosis gondii, parásitos de felino, *Dirofilaria immitis*, parásitos, patógenos bacterianos, y similares.

La regulación del crecimiento o la regulación de la activación de un tipo de célula, tal como un linfocito-T, indica que la respuesta reguladora, estimula o suprime el crecimiento celular. La regulación de una respuesta inmune en un felino, indica que la respuesta inmune es estimulada o suprimida, para tratar la enfermedad o agente infeccioso en el felino.

La expresión de CD8 felino en un vector de expresión, contiene un gen (s) para inmunogenes de felino, para el propósito de administrarse en la forma de una vacuna genética o vacuna de ADN "desnudo". Los vectores incluyen pero no se limitan a: pObjetivo (Promega, Madison, WI), pADNc (Invitrogen, Carlsbad, CA). (Donnelly JJ, y asociados, 1997; Hassett y Whitton, 1996).

Los genes o fragmentos de los genes para CD86, de felino, en parte o en su totalidad, pueden insertarse o transfeccionarse en los cromosomas de un felino u otro mamífero. Dicha integración de estos genes o fragmentos de estos genes, puede lograrse con un vector retroviral o puede utilizarse como una forma de terapia génica.

La presente invención, proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la resistencia a enfermedades de especies de felinos, para propósitos médicos

y/o comerciales. En esta realización, el CD86 de felino, en parte o en su totalidad, y en combinación con o sin inmunogenes de felino de codificación de genes, se administra a felinos, utilizando una forma apropiada de administración. Para la promoción de crecimiento o resistencia a la enfermedad, el CD86, de felino, expresado, se administra en una formulación, en una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 0,01 hasta 100,0 mg por vacuna por gato, en cantidades preferentemente en una formulación con una concentración dentro del rango de desde aproximadamente 0,25 mg/kg/día hasta aproximadamente 25 mg/kg/día. Queda entendido que la cantidad requerida de CD86, de felino, puede ser determinada mediante la experimentación de rutina bien conocida en la técnica, tal como establecer una matriz de dosificaciones y frecuencias y comparando un grupo de unidades o sujetos experimentales para cada punto en la matriz.

De acuerdo con la presente invención, el CD86, de felino nativo o recombinante, es formulado con un transportador fisiológicamente aceptable, tal como, por ejemplo, salina regulada por fosfato o agua desionizada. La formulación también puede contener excipientes, tales como lubricante (s), plastificador (s), aumentador de absorción (s), bactericida (s), y similares que son bien conocidos en la técnica. El polipéptido de CD86 de felino de la presente invención, se administra a través de cualquier medio efectivo, incluyendo sin limitación, rutas intravenosas, subcutáneas, intramusculares, transmusculares, tópicas u orales. Por ejemplo, para la administración subcutánea, la forma de dosificación consiste de CD86 de felino en salina fisiológica estéril. Para la administración oral o respiratoria el CD86 de felino, con o sin excipientes es micro o macro encapsulado, por ejemplo, liposomas y microesferas. También se pueden utilizar parches dérmicos (u otras formas de dosificación de liberación lenta).

Ejemplos

Ejemplo 1A

Clonación del ADNc de, CD86 (B7-2), CD28, y CTLA-4 de felino:

Se clonaron ADNc de CD86 (B7-2), CD28, y CTLA-4 de felino, mediante el primer RT-PCR (transcriptasa inversa/reacción en cadena de polimerasa), amplificando una región entre dos secuencias que fueron conservadas lo suficiente para hacer que se degeneraran los cebadores que interactuaron con el ARNm. La fuente de ARNm, fueron células mononucleares de sangre periférica (PBMC), estimuladas por lo menos durante 16 horas mediante Con A. Este producto PCR fue

secuenciado. La secuencia se utilizó para hacer cebadores para RACE (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc) PCR. El extremo 5' fue amplificado, haciendo primero el ADNc con un cebador de corriente descendente complementario a la región conservada secuenciada recientemente. Se ligó un oligonucleótido al extremo 3' del ADNc (complementaria al extremo 5' de ARNm). Esta secuencia sirvió como el sitio de unión para el cebador ascendente, el cual fue PCR compatible con el cebador PCR descendente, que correspondió con la otra región en la región secuenciada recientemente. Los cebadores degenerados se emplearon en múltiples vueltas de reacciones anidadas para obtener el extremo 3'. Este cebador ascendente para PCR fue designado para reaccionar con una secuencia en la región secuenciada recientemente. Los productos fueron ya sea secuenciados directamente o clonados en un vector de clonación de TA y secuenciados a partir del plásmido. El marco de lectura abierto completo se clonó amplificándolo en su totalidad mediante PCR con cebadores construidos a partir de las secuencias conocidas. Los ORF fueron clonados y secuenciados tres veces.

(Véase en lo que antecede una lista completa de cebadores para el ADNc de CD28 felino).

Los cebadores de ADN utilizados para la RT/PCR del ADNc de CD28, fueron:

Cebador 5': 5'-CGCGGATCCACCGGTAGCACAATGATCCTCAGG-3' (SEC ID N° 13)

Cebador 3': 5'-CGCGGATCCTCTGGATAGGGTCCATGTCAG-3', (SEC ID N° 14)

(Véase la descripción anterior una lista completa de cebadores para el ADNc de CD28 de felino).

Los cebadores de ADN utilizados para la RT/PCR del ADNc de CTLA-4 de felino, fueron:

1. Cebadores degenerados para el primer producto PCR (672 pb): Deg 5' P: 5'-ATGGCTT(C)GCCTTGGATTT(C)CAGC(A)GG-3'; (SEC ID N° 15)

Deg 3' P: 5'-TCAATTG(A)ATG(A)GGAATAAAATAAGGCTG-3'; (SEC ID NO: 16)

2. Extremo 5' del CTLA-4 (455 pb): cebadores específicos del gen degenerado (GSP) y específicos del gen anidado (NGSP):

PCR de primera vuelta:

Deg 5' P: 5'-TGTTGGGTTTC(T)G(A)CTCTG(A)CTT(C)CCTG-3'; (SEC ID N° 17)

3' GSP: 5'-GCATAGTAGGGTGGTGGGTACATG-3'; (SEC ID N° 18).

PCR anidada con el producto del PCR de la primera vuelta:

Deg 5' P: 5'-TGTTGGGTTTC(T)G(A)CTCTG(A)CTT(C)CCTG-3'; (SEC ID N° 19)

3' NGSP: 5'-ACATGAGCTCCACCTTGCAG-3'; (SEC ID N° 20)

3. Extremo 3' de CTLA-4: cebador adaptador 1 (AP1, Clonotech Lab, Inc., Palo Alto, CA); cebador adaptador anidado (AP2, Clonotech Lab), cebador específico del gen (GSP), y cebador específico del gen anidado (GNSP):
PCR RACE 3':
5 AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; (SEC ID N° 21)
5' GSP: 5'-GTGAATATGGGTCTTCAGGCAATG-3'; (SEC ID N° 22)
PCR RACE anidado 3' con el producto de PCR RACE 3':
AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTGCGACGCGGC-3'; (SEC ID N° 23)
NGSP 5': 5'-GAAATCCGAGTGACTGTGCTGAG-3'; (SEC ID N° 24)
- 10 4. Cebadores para el gen de CTLA-4 completo
Cebador 5' CTLA-4 Fel: 5'-AACCTGAACACTGCTCCCATAAAG-3'; (SEC ID N° 25)
Cebador 3' CTLA-4 Fel: 5'-GCCTCAGCTCTTAGAAATTGGACAG-3'; (SEC ID N° 26)
- 15 Los cebadores de ADN utilizados para la RT/PCR del ADNc de CD86 (B7-2) de felino, fueron:
 1. cebadores degenerados para el primer producto PCR (423 bp):
Deg 5' P: 5'-TAGTATTTTGGCAGGACCAGG-3' (SEC ID N° 27)
Deg 3' P: 5'-CTGTGACATTATCTTGAGATTTC-3'; (SEC ID N° 28)
 - 20 2. Cebadores degenerados para el segundo producto PCR (574 bp):
Deg 5' P: 5'-GA(G)CA(T)GCACT(A)ATGGGACTGAG-3'; (SEC ID N° 29)
Deg 3' P: 5'-CTGTGACATTATCTTGAGATTTC-3'; (SEC ID N° 30)
 3. Extremo 5' de CD86: AP1, AP2 (Clonotech Lab), Cebadores específicos del gen 3' degenerado (GSP) y específicos del gen anidado 3' (NGSP):
25 PCR RACE 5':
AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; (SEC ID N° 31)
GSP 3': 5'-TGGGTAACCTTGTATAGATGAGCAGGTC-3'; (SEC ID N° 32)
PCR RACE 5' anidado con el producto PCR de RACE 5':
AP2: 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'; (SEC ID N° 33)
30 NGSP 3': 5'-CAGGTTGACTGAAGTTAGCAAGCAC-3'; (SEC ID N° 34).
 4. Extremo 3' de B7-2: AP1, AP2, GSP 5', y NGSP 5':
PCR RACE 3':
AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; (SEC ID N° 35)
GSP 5': 5'-GGACAAGGGCACATATCACTGTTTC-3'; (SEQ ID NO 36)
35 PCR RACE 3' anidado con el producto PCR de RACE 3':

AP2: 5'-CAGTGCTTGCTAACTTCAGTCAACC-3'; (SEC ID N° 37)

NGSP 5?: 5'-CAGTGCTTGCTACTTCAGTCAACC-3?; (SEC ID N° 38)

Gen de CD86 completo:

5 Cebador 5' B72 (1) Fel: 5'-CGGGAATGTCACTGAGCTTATAG-3'; (SEC ID N° 39)

Cebador 3' B72 (1176) Fel: 5'-GATCTTTTTCAGGTTAGCAGGGG-3'; (SEC ID N° 40)

Ejemplo 1B: Subclonación de CD-28 en el vector de homología viral pox:

10 La región de codificación de CD-28 de felino fue PCR amplificado con
 cebadores sintéticos que contienen sitios de clonación convenientes, para facilitar la
 clonación CD-28 junto con cualquier promotor pox para la construcción de un vector de
 homología específico de pox. Los cebadores sintéticos fueron elaborados para
 introducir un sitio de clonación EcoRI y BglII en los extremos 5' y 3' del fragmento
 15 PCR, respectivamente. Los dos cebadores son: cebador de sentido, 7/97,1 (5'-
 GATGAATTCCATGATCCTCAGGCTGGGCTTCT-3'); (SEC ID N° 54) y el cebador
 antisentido 7/97.2 (5'-GATCAGATCTCAGGAACGGTATGCCGCAA-3'); (SEC ID N°
 55). El fragmento de ADN de PCR resultante, fue digerido con EcoRI y BglII, y
 clonado en un vector de homología SPV 01L, para la generación de un virus SPV
 20 recombinante. Esto dio como resultado la cinta 930-26.A1, un vector de homología
 01L SPV (sitio de inserción AccI dentro del fragmento genómico M HindIII del virus de
 porcinopox), que contiene el ORF CD-28 de felino junto con el promotor pox sintético
 avanzado/temprano, LP2EP2 y adyacente a la cinta del gen marcador LacZ E. Coli,
 promovida por un promotor pox avanzado sintético LP2. El vector de plásmido de
 25 homología 930-26.A1, fue cotransfectado con SPV 001 para generar un virus SPV
 recombinante que expresa las proteínas CD28 de felino y β -galactocidasa.

Ejemplo 2

30 Caracterización de los ADNcs y polipéptidos de CD86 (B7-2), CD28 y CTLA-
 4 de felino:

El ADNc CD86 (B7-2) de felino aislado y purificado de aproximadamente 1176
 nucleótidos, codifica un marco de lectura abierto de polipéptido CD86 de felino de
 aproximadamente 320 aminoácidos, el uno de membrana nativo o forma madura, tiene
 una masa molecular de aproximadamente 36.394 kDa, un punto isoeléctrico de
 35 aproximadamente 9,19, una carga neta de pH 7.0 de 11.27.

El ADNc CD28 de felino aislado y purificado de aproximadamente 689 nucleótidos, codifica un marco de lectura abierto de polipéptido CD28 de felino de aproximadamente 221 aminoácidos, la unión de membrana nativa o forma madura tiene una masa molecular de aproximadamente 25,319 kDa, un punto isoelectrico de aproximadamente 9.17, una carga neta de pH 7,0 de 9,58.

ADNc CTLA-4 de felino aislado y purificado de aproximadamente 749 nucleótidos, codifica un marco de lectura abierto de polipéptido CTLA-4 de felino de aproximadamente 223 aminoácidos, la unión de membrana nativa o forma madura tiene una masa molecular de aproximadamente 24.381 kDa, un punto isoelectrico de aproximadamente 6.34, una carga neta de pH 7,0 de -0,99.

La coexpresión CD80, con moléculas coestimulantes CD28 ó CTLA-4, y un antígeno de tumor o un antígeno procedente de un organismo patógeno, tiene la capacidad de activar o mejorar la activación de linfocitos-T, más específicamente de linfocitos Th-1, y de promover el crecimiento de otros tipos de células. La coexpresión de CD80, con la molécula co-estimulante CTLA-4, tiene la capacidad de suprimir la activación de linfocitos-T, más específicamente linfocitos Th-1

Porcentaje de identidad de secuencia ADN aminoácido	% de identidad de homólogo humano (Secuencia de ADN)	% de identidad de homólogo humano (Secuencia de AA)	% de identidad de homólogo de ratón (Secuencia de ADN)	% de identidad de homólogo de ratón (Secuencia de AA)	% de identidad de homólogo de conejo (Secuencia de ADN/AA)	% de identidad de homólogo de pollo (Secuencia de ADN/AA)
CD80 de felino	77	59	62	46	-	-
CD86 de felino	72	68	-	-	67/64	-
CD28 de felino	85	82	77	74	84/84	59/50
CTLA-4 de felino	88	88	79	78	-	-

Ejemplo 3

Uso de CD86 (B7-2), CD28 y CTLA-4 de felino en vacunas.

Se llevaron a cabo los experimentos que se encuentran a continuación, para evaluar las actividades aumentadoras de la inmunidad de CD86, CD28 y CTLA-4 de felino en vacunas para felinos.

En un procedimiento alternativo, los gatos de 8 semanas de edad son inyectados intramuscularmente con 100µg de plásmido que contiene ADNc para

moléculas de CD86, CD28 y CTLA-4 de felino, en una mezcla con un plásmido que contiene ADNc de VIF env y gag o FeLV env y gag, o de manera alternativa, inyectados intramuscularmente con 100µg de plásmido que contiene combinaciones en pares que expresan ADNc de CD86 y CD28, ó CD86 y CTLA-4, en pares con CD28 ó CTLA-4, en una mezcla con un ADNc que contiene plásmido VIF env y gag o FeLV env y gag. Los gatos de control no reciben CD86, CD28 y CTLA-4. Los gatos son estimulados con FeLV o VIF virulento y se observan las señales de enfermedad, tal como se describió anteriormente. Los resultados de los experimentos de estímulo, fueron que los gatos que reciben el vector de ADNc que contiene CD86, CD28 y CTLA-4 de felino y el vector de ADNc que contiene genes VIF o genes FeLV, muestran el 100% de protección contra la enfermedad, comparados con los gatos que reciben únicamente el vector de ADNc que contiene genes VIF o genes FeLV, los cuales muestran una protección del 75% contra la enfermedad.

En un procedimiento alternativo, gatos de 8 semanas de edad, son inyectados intramuscularmente con de 0,1 a 100 mg de proteína purificada de las moléculas de CD80, CD86, CD28 y CTLA-4 de felino, o de manera alternativa con combinaciones de pares CD80 ó CD86 en pares con proteínas CD28 ó CTLA-4, procedentes de los vectores de ADNc recombinantes descritos anteriormente, e inyectados intramuscularmente con de 0,1 a 100mg de una vacuna de subunidad que contiene VIF env y gag o FeLV env y gag. Los gatos de control no reciben CD80, CD86, CD28 y CTLA-4. Los gatos son estimulados con una deformación VIF virulenta o una deformación FeLV, y se observa regularmente el desarrollo de la enfermedad. Los resultados de los experimentos de estímulo, son que los gatos que reciben la proteína purificada de CD80, CD86, CD28 y CTLA-4 de felino y la vacuna de subunidad que contiene VIF o FeLV, muestran una incidencia significativamente reducida de la enfermedad, comparados con los gatos que reciben únicamente la vacuna de subunidad que contiene proteínas VIF o FeLV.

Ejemplo 4

Uso de CD86, CD28 y CTLA-4 de felino para inhibir y destruir el crecimiento de la célula de tumor.

Las células de tumor procedentes de un gato, son transfeccionadas con un vector que expresa CD86 de felino, en combinación con CD28 ó CTLA-4. Las células de tumor transfeccionadas son administradas nuevamente al gato y la presencia del CD86, CD28 y CTLA-4 en la superficie de la célula del tumor, eleva una amplia

respuesta inmunológica para las células de tumor transfeccionadas y no transfeccionadas, dando como resultado la muerte de células de tumor localizadas y metastáticas. En un procedimiento alternativo, los vectores que expresan CD86 de felino en combinación con CD28 y CTLA-4 de felino, que son inyectados directamente en un tumor de un gato, dan como resultado una respuesta inmunológica amplia para las células del tumor, dando como resultado la muerte de células de tumor localizadas y metastáticas.

Ejemplo 5

CD86 (B7-2), demuestra alguna similitud con CD80, compartiendo una V-región y C-región IgSF extracelular estructuralmente similar (Freeman y asociados, 1993). Sin embargo, la homología general entre las moléculas es menor al 25% con residuos encontrados dispersados en caras opuestas de ambos dominios extracelulares (Bajorath y asociados, 1994). Aunque no se ha definido una región de unión para cualquier molécula, la homología de secuencia ha proporcionado regiones de prospecto propuestas como sitios potenciales de interacción (Lindsley y asociados, 1994a). A pesar de la carencia de conservación, CD80 y CD86 comparten capacidades de unión similares para ambos receptores, aunque CD86 se disocia más rápidamente de CTLA-4 (Lindsley y asociados, 1995a).

CD86 parece compartir un patrón de expresión similar, con CD80 siendo expresado en células-B activadas, células-T, macrófagos y monocitos (Azuma y asociados, 1993a). Sin embargo, las cinéticas de expresión son ligeramente diferentes para las dos moléculas (Hathcock y asociados, 1994). Generalmente, CD86 aparece de forma más temprana en una respuesta inmunológica activa que CD80, y parece ser expresada de forma constitutiva en monocitos (Freeman y asociados, 1991). Aunque CD80 puede aparecer tan tarde como 24 horas después de la estimulación inicial, CD86 aparece más temprano en la respuesta, o se encuentra expresado de forma constitutiva en niveles bajos de células mieloides (Hathcock y asociados, 1994). Las dos proteínas de superficie, evocan respuestas intracelulares similares si se unen a sus respectivos contra receptores en las células-T, ya sea CD4+ o CD8+ (Lanier y asociados, 1995). No parece haber ninguna diferencia en la capacidad de cualquier molécula, para iniciar la activación y proliferación de células-T o para inducir la actividad CTL (Hathcock y asociados, 1994). Por lo tanto, los datos sugieren que ambas moléculas inician una cascada de señal similar al unirse a CD28 ó CTLA-4 respectivamente (Hathcock y asociados, 1994). Como ambas moléculas

también parecen enlazar estos contra receptores con cinéticas iguales y no elicitán efectos diferentes, esto no está claro para el significado evolutivo de este sistema de “dos ligandos/dos receptores” (Lanier y asociados, 1995).

Originalmente, el CD80 se describió como un marcador para células –B, y se
5 encontraron altos niveles tanto de CD80 como de CD86 en células–B estimuladas con lipopolisacarida (LPS), anti-Ig, anti-CD40, concanavalin A (Con A), cAMP, IL-2 e IL-4 (Hathcock y asociados, 1994). Se ha demostrado que IFN γ y IL-5 regular por incremento el CD86 en células–B murinas, aunque no existen datos disponibles del sistema humano o para CD80 con respecto a estos reguladores inmunológicos
10 (Azuma y col., 1993a). Las cinéticas de expresión son ligeramente diferentes en las células–B para cada molécula. CD86 es expresado de forma temprana después de la estimulación (6 horas) mientras que CD80 no está presente hasta casi después de 24 horas y no alcanza la expresión pico hasta después de 48 horas (Lenshow y asociados, 1993). La regulación por incremento de CD80 en las células–B también
15 parece estar regulada por la señalización mediada por el MHC clase II (Nabavi y asociados, 1992). Otros dos receptores de superficie, también parecen ser importantes en la expresión de superficie CD80. La unión cruzada de CD40 expresado en la célula–B mediante células–T o Ig que expresan el contra receptor, dio como resultado una expresión CD80 incrementada (Azuma y asociados, 1993b),
20 mientras que la unión cruzada del receptor Fc regula formador disminución la expresión de ambas moléculas (Barcy y asociados, 1995).

El CD40 y su ligando CD40L han sido propuestos como una trayectoria a través de la cual se regula la expresión CD80 en APC (Page y asociados, 1994). CD40, se expresa en una variedad de tipos de células, incluyendo células–B,
25 monocitos, células dendríticas, fibroblastos y células endoteliales de humano y pueden ser regulados en estas células en la presencia de IFN γ (de Boer y asociados, 1993). El ligando CD40 (CD40L), es expresado en células–T CD4+ activado. La unión de CD40 mediante CD40L, ha mostrado regular la expresión CD80 en APC, aunque no parece inducir la expresión en otros tipos de células que expresan el receptor,
30 incluyendo células endoteliales (Page y asociados, 1994).

Las moléculas de CD80 y CD86, aunque comparten menos del 25% de identidad de aminoácidos, tienen similitudes estructurales y se consideran relacionadas de forma distante (Freeman y asociados, 1993). Los residuos homólogos están concentrados en los dominios similares a Ig, con muchos residuos conservados
35 en los dominios de la transmembrana o citoplásmico (June y asociados, 1995). Se ha

propuesto una familia que comprende los genes B7, la cual podría, además de CD80 y CD86, incluir butirofilina (BT), glicoproteína de mielina/oligodendrocito (MOG), el análogo MHC de pollo, B-G (Linsley y asociados, 1994b). BT, MOG y B-G son codificadas mediante el complejo del gen MHC el cual eleva un potencial evolutivo entre el MHC y las moléculas co-estimulantes de requisito (Linsley y asociados, 1994b).

Las células-T de ratón murine y humano en reposo, expresan bajo niveles de CD86, mientras que las células-T de humano y ratón murine (y clones de célula T), activados con anti-CD3, expresan CD80 y CD86 en niveles apreciables (Hathcock y asociados, 1994). La expresión tanto de CD80 como de CD28 en células-T activadas, puede reflejar la capacidad de las células-T para expandirse a través de estimulación autocrina (Azuma y asociados, 1993b)). De manera sorprendente, CD80 ha mostrado ser regulada en células-T CD4+ infectadas por VIH, con regulación descendente de CD28 concomitante. Se propone, que este es un mecanismo posible de transmisión viral cuando las células-T CD4+ no infectadas inician el contacto mediado por CD28/CD80 con los linfocitos infectados (Haffar y asociados, 1993).

Los monocitos de sangre humana periférica expresan niveles bajos de CD80 y niveles superiores de CD86, mientras que la exposición a GM-CSF o IFN γ , da como resultado la regulación ascendente de la expresión de la superficie tanto de CD80 como de CD86 (Barcy y asociados, 1995). El LPS es un inductor fuerte de expresión de CD80 en monocitos de sangre humana periférica (Schmittely asociados, 1994).. No se reportan datos en macrófagos peritoneales en el sistema humano, pero los macrófagos de ratón murine en reposo expresan niveles bajos de CD80 y CD86 (Freeman y asociados, 1991; Hathcock y asociados, 1994).. La estimulación de LPS e IFN γ de macrófagos de ratón murine, incrementan la expresión en la superficie, aunque IFN γ en combinación con interleuquina 10, regula formador disminución ambos receptores (Ding y asociados, 1993).

Las células dendríticas esplénicas expresan bajos niveles de ambas moléculas, y las células de Langerhan expresan bajos niveles de CD86, aunque el cultivo tienda a incrementar la expresión en ambos tipos de células (Larsen y asociados, 1994). En células dendríticas, CD86 parece ser regulado formador aumento más fuertemente después del cultivo, aparece más temprano y puede jugar el papel más importante en la señalización mediada por la célula dendrítica (Hathcock y asociados, 1994). De manera sorprendente, aunque IL-10 no tiene efecto en la expresión CD80 en células

dendríticas, este actúa para regular formador disminución la expresión CD86 (Buelens y asociados, 1995). O'Doherty y asociados, (1993), reportó que aunque los niveles iniciales de CD80 fueron bajos, al momento de la maduración, las células dendríticas presentan niveles más altos de CD80. La expresión celular de Langerhan de CD80, es inhibida tanto por IL-10 como por IFN γ , pero la exposición GM-CSF puede invertir la inhibición de IFN γ , aunque no la inhibición de IL-10 (Ozawa y asociados, 1996).

En seres humanos y ratones, las citoquinas específicas han demostrado ejercer control sobre la expresión CD80 y CD86. IL-4 es un fuerte inductor de CD86 y hasta un punto más bajo de CD80 en células – B (Stack y asociados,, 1994), mientras que IFN γ incrementa la expresión de CD86 en una variedad de tipos de célula incluyendo monocitos y macrófagos de células – B (Hathcock y asociados,, 1994). Aunque IFN γ parece regular por incremento la expresión CD80 en monocitos, puede actuar para regular por disminución la expresión en macrófagos. IL-10, aún en la presencia de IFN γ , actúa para regular por disminución la expresión CD80 y CD86 en monocitos (Ding y asociados, 1993). Esta interacción puede ser un mecanismo potencial de un interruptor desde una respuesta Th1 (DTH) hasta una respuesta Th2 (humoral). Sin embargo, IL-10 no influencia la expresión de CD80 en células dendríticas (Buelens y asociados, 1995). Esto puede reflejar adicionalmente el papel de estas moléculas en la regulación del subgrupo auxiliar T, como células dendríticas que son consideradas importantes en la iniciación de una respuesta tipo 2. IL-7, incrementa la expresión CD80 en células-T, aunque no están definidos los efectos en otros tipos de células (Yssel y asociados,, 1993), mientras que la expresión CD80 de la célula-B ha mostrado estar mediada a través del cruce del receptor TNF p75, la expresión puede ser incrementada en la presencia de IL-4 (Ranheim y Kipps, 1995). De manera sorprendente, TNF pertenece a la misma familia de moléculas de CD40, otro potente iniciador de expresión CD80. GM-CSF parece regular por incremento las células dendríticas y la expresión de la célula de Langerhan de la superficie CD80, mientras que IFN γ únicamente causa regulación ascendente de CD86 en estas células (Larsen y asociados, 1994).

El reconocimiento, unión y lisis de células objetivo transformadas y viralmente infectadas por linfocitos-T citotóxicos CD8⁺ (CTL), fue largo aunque es mediado únicamente a través de reconocimiento TCR de péptidos extraños expresados en el contexto de MHC clase I (Berke, 1993). Recientemente, se ha determinado que se requiere de una variedad de moléculas de superficies expresadas por ambas de las células CTL y objetivo, para completar la interacción que tiene lugar (Mescher, 1992).

Un participante clave en esta interacción, es CD80 y su contra receptor CD28. La señal accesoria suministrada por la interacción B7-CD28, es requerida por los linfocitos en reposo pequeños CD8⁺, para diferenciar un estado lítico (Mescher, 1992). Sorprendentemente, una vez que CTL es diferenciado, esta señal secundaria ya no es requerida para la expresión de propiedades líticas (Hodge y asociados, 1994).

Durante mucho tiempo se ha sabido que los CTL es un mediador importante de la inmunidad viral. En individuos humanos infectados por virus de inmunodeficiencia (VIH), el no progreso a largo plazo se asocia con los altos niveles de CTL de memorias CD8⁺ de Gag, Pol y Env, y números de copia muy bajos de ADN y ARN de VIH en células mononucleares de sangre periférica (Rinaldo, 1995). De manera inversa, en individuos en las etapas avanzadas de la infección, el CTL de memoria (mCTL) está seriamente disminuido (Zanussi y asociados, 1996). La correlación de estos descubrimientos, apoya la idea de que mCTL puede ser un factor importante en el control huésped de la infección, y podría jugar un papel importante en el establecimiento de inmunidad protectora en individuos no infectados naíve (Zanussi y asociados, 1996). Además, las correlaciones patológicas con infección de VIH, reflejan un papel potencial para CD80 y CD28 en el progreso de la enfermedad.

El CD80 también ha sido propuesto para jugar un papel importante en el desarrollo de la patogénesis de una infección de VIH (Haffar y asociados, 1993). Las células-T, normalmente expresan CD80 y únicamente en niveles bajos, y únicamente después de la activación (Schwartz, 1992). En estudios in vitro de la infección de VIH en líneas de células-T primarias no-estimuladas, CD28 parece ser regulada por disminución, y la expresión CD80 parece ser mejorada junto con MHC CII (Haffar y asociados, 1993). Aunque no obstante que no se ha definido una razón para estos eventos, se pueden hipotetizar dos papeles de daño potencial. La presencia de CD80 en la superficie junto con la clase II, debería dar como resultado el contacto incrementado entre células-T infectadas y células CD4⁺ no infectadas (Haffar y asociados, 1993). Aunque esta interacción podría actuar para mejorar el rango de transmisión entre células-T, otro papel podría incrementar el reconocimiento mediado por CTL, y aniquilar a través del suministro de la señal secundaria mediante la interacción del CD80 en la célula infectada, con el CD28 expresado por la célula-T CD8⁺ (Haffar y asociados, 1993). Esto podría acelerar la disminución de la población de CD4⁺ ligada con el desencadenamiento de enfermedades relacionadas con SIDA (Haffar y asociados, 1993).

En sistemas tanto de ratón murine como de humano, la expresión de la familia de proteínas B7, parece ser un factor importante en el reconocimiento inmunológico de las células transformadas (Chen y asociados, 1992). Aunque se ha encontrado la expresión en algunas células transformadas, la mayoría de los tumores no expresan normalmente CD80 ó CD86, haciendo improbable de este modo, que cuando un antígeno de tumor potencialmente inmunogénico sea expresado, tenga lugar el reconocimiento completo a través de células-T (Chen y asociados, 1993). Sin embargo, han probado ser exitosos los experimentos de transfección que utilizan la molécula CD80 para mejorar la citolisis tumorocidal (Hodge y asociados, 1994).

Los vectores basados en retroviral y de vacunas, que expresan la molécula CD80 funcional, han sido utilizados para transfectar células malignas (Li y asociados, 1994; Hodge y asociados, 1994). Posteriormente, estas células que expresan CD80 además de antígenos de tumor conocidos normalmente de forma deficiente son reintroducidas en la huésped, en donde se considera que se genera una respuesta inmunológica celular contra antígenos del tumor expresados en las células malignas (Townsend and Allison, 1993). Los resultados de estos experimentos con algunas formas de tumores, han sido sorprendentemente efectivos. En muchos casos, la huésped tiene la capacidad de montar una fuerte respuesta celular contra la neoplasia maligna, y controlarla o eliminarla (Hodge y asociados, 1994).

La re-introducción subsecuente de células de tumor con o sin la molécula de superficies CD80 en la huésped, da como resultado niveles similares de inmunidad anti-tumor (Hodge y asociados, 1994). Por lo tanto, parece que una vez que se ha establecido la memoria, no se requiere la molécula CD80 para sostener la respuesta o para iniciarla, si ocurre la re-introducción (Hodge y asociados, 1994). Estos experimentos, demuestran que la molécula CD80 es un mediador eficiente de inmunidad celular, y que en tumores específicos, las respuestas celulares pueden ser inducidas para controlar posiblemente la neoplasia maligna y evitar el re-establecimiento (Hodge y asociados, 1994).

Tal como se observa en el desarrollo de algunas formas de autoinmunidad, la expresión de CD80 incrementada, puede tener efectos perjudiciales. Se considera que CD80 en sinergia con IL-12, es importante en el desarrollo temprano de esclerosis múltiple (EM), y da como resultado la estimulación de la célula-T, y el desarrollo de DTH (Windhagen y asociados, 1995). La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), puede ser inhibida parcialmente mediante la administración de CTLA-4Ig soluble, a sujetos de experimento. La inhibición de desmielinación

mediante el bloqueo de la interacción CD28 / CD80, refleja un papel potencial durante esta interacción en la exacerbación de la enfermedad (Arima y asociados, 1996).

Esta clara la importancia de la molécula de CD80 en el progreso de una respuesta inmunológica efectiva. Aunque el ADNc que codifica la proteína ha sido aislada en roedores y primates, ésta no ha sido aislada fuera de estos grupos. El felino, es un importante animal de compañía y modelo potencial de enfermedad retroviral. La clonación de reactivos inmunológicos procedentes de especies de felinos, proporciona herramientas para la investigación de enfermedades de importancia veterinaria, con relevancia potencial para el progreso o prevención de la enfermedad en otras especies.

Ejemplo 6

CLONACIÓN Y ELABORACIÓN DE SECUENCIAS DEL ADNc de CD28 FELINO INTRODUCCIÓN

El CD28 es una glicoproteína de superficie normalmente expresada como un homodímero compuesto de disulfuro idéntico unido con sub-unidades de 44 kDa. Es un miembro de la familia de supergenes de inmunoglobulina, y está caracterizado por una región simple extracelular V, un dominio transmembrana y una cola intracelular corta (Aruffo y Seed, 1987). Aunque la molécula es glicosilada, las porciones no parecen jugar un papel en la unión, y existe la hipótesis de que aumentan la solubilidad del dominio extracelular (Peach y asociados, 1994). Los péptidos codificadores de ADNc humano, de rata, ratón y conejo y una molécula análoga en la gallina han sido clonadas y se ha elaborado sus secuencias (Linsley y asociados, 1995a).

Se descubrió que el CD28 en la mayoría de los timocitos CD4⁺, CD8⁺ y las células T periféricas CD4⁺ y CD8⁺ con expresión aumentada resultantes del $\alpha \nu \tau 1$ - XΔ3, la estimulación PHA y PMA, y la supresión resultante de la unión anti-CD28 (Linsley y asociados, 1993b). Se determinó pronto, después de su descubrimiento, que la CD28 jugaba un papel importante en la regulación de la activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ (June y asociados, 1990). Además de aumentar la activación y proliferación de la célula T, se ha demostrado adicionalmente que la producción de esta señal secundaria también actúa para inducir las actividades citolíticas en el CTL (Azuma y asociados, 1993c).

El CD28 es expresada tempranamente en la maduración de las células T. Aunque las células CD3⁺ inmaduras son normalmente CD28⁻, las células intermedias

CD4⁺ CD8⁺, expresan niveles bajos, y los timocitos CD4⁺ o CD8⁺, y CD3⁺ expresan la CD28 en niveles altos (Turka y asociados, 1991). Después de la maduración, se ha encontrado el receptor en casi todas las CD4⁺, y más de la mitad de todas las células T CD8⁺ en los humanos (Turka y asociados, 1991), y cerca del 100% en las células T del ratón murine (June y asociados, 1990). La molécula no es expresada en niveles constantes en la superficie celular (Turka y asociados, 1990). Después de la activación de la célula T, la expresión de la superficie aumenta, mientras que la unión de la molécula por su ligando o mAb específicos, da como resultado una poca regulación del gen en ambos niveles, el ARNm y el de la proteína, en las células activadas (Linsley y asociados, 1993a). Aunque se encontró de manera importante en los linfocitos de linaje de la célula T, el CD28 ha sido reportado en los plasmocitomas de las biopsias de la médula ósea (Kozber y asociados, 1987), y expresado por cultivos de la línea celular leucémica natural, similar a la mortal (Azuma y asociados, 1992).

La CD28 comparte un grado de homología estructural con el otro receptor B7 de CTLA-4, y los dos son agrupados como una sub-familia dentro del grupo IgSF (Linsley y asociados (1995a). Las dos moléculas tienen una región extracelular IgV, una membrana sencilla que expande el dominio, y un dominio de señalización citoplásmico corto (Aruffo y asociados, 1987). Aunque la homología general entre las dos moléculas es sólo de aproximadamente el 31%, existen regiones cortas y residuos específicos que son completamente conservados entre las dos moléculas, reflejando un papel potencialmente importante para estos motivos en el reconocimiento de la B7 y la integridad estructural (Leung y Linsley, 1994). El motivo MYPPPY, una región de seis residuos, es retenido en todos los miembros aislados de la familia CD28/CTLA-4 (Peach y asociados, 1994). Esto traza una región de circuito similar a la CD3 dentro de las moléculas, y cuando es alterada por la mutación, da como resultado una avidez de unión reducida en ambas, la CD28 y la CTLA-4 (Peach y asociados, 1994). Esta región se ha propuesto como el sitio potencial de la unión del ligando en las proteínas CD28 y CTLA-4, pero no ha sido determinado si esta región es el sitio real de unión para la B7 o si proporciona los motivos estructurales requeridos indirectamente para que tenga lugar la unión (Peach y asociados, 1994). Aunque existen residuos conservados compartidos entre la CD28 y la CTLA-4, la CTLA-4 se enlaza tanto a la CD80 y la CD86, con una avidez más grande que la CD28 (Ellis y asociados, 1996). Por lo tanto, aunque la CTLA-4 es expresada en solamente del 2 al 3% del nivel de la

CD28 en las células T activadas, se enlaza con una avidéz mayor de 20 dobles *in vitro* (Linsley y asociados, 1995b).

5 Aunque las moléculas CTLA-4 y CD28 están relacionadas con la evolución, y comparten ligandos comunes, su función y capacidades de señalización parecen no estar relacionadas (Balazano y asociados, 1992). La comparación de las regiones de señalización de cada una de las moléculas no refleja una alta identidad y sugiere que son iniciadas diferentes trayectorias de señalización por cada una de las moléculas (Hutchcroft y Bierer, 1996).

10 Aunque la CD28 está expresada como que reside en las células T, y es regulada de manera ascendente, inicialmente en respuesta a la activación, los picos de expresión de la CTLA-4, 48 horas después de la activación y regresa a los niveles de la línea de base aproximadamente a las 96 horas posteriores a la activación (Linsley y asociados, 1992a). La expresión de la CTLA-4 parece corresponder a la regulación descendente de la CD28 (Lindsten y asociados, 1993). Adicionalmente, las trayectorias de señalización mediadas a través de la unión del ligando de la molécula CD28 parece ser importante en la regulación ascendente de la expresión de la CTLA-4 (Linsley y asociados, 1993a). Las células T que son CD28⁻ no expresan CTLA-4 apreciable en respuesta al estímulo con PMA o ionoforo de calcio (Lindsten y asociados, 1993).

20 Una secuencia completa de los eventos de la CD28 de señalización mediada permanecen definidos de una manera incompleta, aunque existe la hipótesis de que se ha establecido la cascada (Hutchcroft y Bierer, 1996). Se ha sugerido que la señalización de la CD28 comprende la movilización del Ca⁺ intracelular, el metabolismo del fosfatidilinositol y la inducción de la fosforilación de la tirosina de la proteína (Hutchcroft y Bierer, 1996).

25 La cola citoplásmica de la molécula CD28 ha definido motivos que se considera que están comprendidos en la señalización intracelular después de la unión cruzada por el CD80 o CD86 (June y asociados, 1994). La región intracitoplásmica de 41 aminoácido no tiene una actividad enzimática definible, no contiene motivos de activación de tirosina intracelular (como la TCR) ni residuos de cisteína para la unión de la familia Src de quinasas citoplásmicas de tirosina (June y asociados, 1994). Sin embargo, varios sitios potenciales de fosforilación son conservados entre las secuencias aisladas (Hutchcroft y Bierer, 1996). La actividad enzimática intracelular y las interacciones proteína-proteína frecuentemente son reguladas a través de la fosforilación diferencial de la proteína, aunque las enzimas responsables de esta

35

actividad por la CD28 no han sido elucidadas (Lu y asociados, 1992). Un sitio de consenso, YMXM, localizado en la cola citoplásmica, es un sitio propuesto del dominio de homología Src 2 y una fosfo-tirosina (dominio SH2) dependiente de la unión de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3 quinasa) (Prasad y asociados, 1995). Aunque ésta es una de las trayectorias potenciales de señalización de la CD28, se ha demostrado que la actividad de la quinasa PI3 no se correlaciona con la actividad IL-2, y como un aumento en la producción de IL-2 es una consecuencia principal de la señalización de la CD28, se siente que otras trayectorias contribuyen a la activación resultante de la señalización intracelular (June y asociados, 1994).

Aunque el papel de estos eventos no sea entendido completamente, la coestimulación de la CD28 conduce a una producción aumentada de citoquinas por la célula T. En las células T CD28⁺ activadas con anti-CD3 o PHA, anti-CD28 aumenta la condición estable de los niveles de ARN de una serie de citoquinas, incluyendo la IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, el factor de necrosis de tumor (TNF α), la linfoxina, la IFN γ , y el factor estimulante de la colonia de granulocito-monocito (GM-CSF), así como el receptor IL-2 (Lenschow y asociados, 1996). El aumento de la condición estable del ARNm es debido tanto a la estabilización de los transcritos como al aumento en la transcripción (Hutchcroft y Bierer, 1996).

Aunque la coestimulación de la CD28 fue documentada primero en los clones de la célula T CD4⁺ (Martin y asociados, 1986), ahora es conocido que la CD28 juega un papel en la activación de muchos tipos de células. La coestimulación de esta trayectoria ha demostrado regular la producción del IFN γ , una citoquina de tipo Th1, y la producción de IL-4, una citoquina del tipo Th2, en las sub-poblaciones de las células T del CD4⁺ del ratón naïve (Seder y asociados, 1994). La trayectoria coestimulante de la CD28 es también importante en la activación de la CTL CD8⁺, aunque no parece ser necesaria para la fase realizadora de la CTL mortal mediada (Hodge y asociados, 1994). De un modo interesante, también parece que la CD28 juega un papel importante en la infección por VIH. En los cultivos de los linfocitos provenientes de algunos individuos positivos para el virus, la unión de CD28 con el anticuerpo monoclonal puede dar como resultado un aumento en la producción del VIH (Asjo y asociados, 1993).

En los primates y roedores, la señal secundaria producida por la unión de CD80 con CD28 claramente tiene un papel que se puede demostrar en la activación inicial de las células T (Aruffo y Seed, 1987). Los datos recientes sugieren, sin embargo, que también un efecto de interacción importante, puede ser, sostener la

proliferación evitando la presentación de la apoptosis (Lenschow y asociados, 1996). El reposo de las células T en la fase G₀ del crecimiento puede convertirse en células T activadas a través de la formación del complejo TCR, pero no tiene la capacidad de proliferarse o secretar el IL-2 en ausencia de la unión cruzada con CD28, un estado denominado anergia clonal (Linsley y asociados, 1991a). Las células T maduras pueden llegar a ser activadas solamente a través de la unión de la TCR con la MHC en un APC, pero esto finalmente conduce a la activación inducida de células muertas a través de la apoptosis (Radvanyi y asociados, 1996). Aunque otras interacciones secundarias (por ejemplo, la coestimulación ICAM-1) pueden proporcionar señales auxiliares proliferativas, parece ser que la coestimulación mediada por la CD28 es única en la prevención de la presentación subsecuente de la anergia clonal y la apoptosis (Linsley y asociados, 1993a). Se ha mostrado que la CD28 puede jugar un papel en los genes reguladores conocidos que juegan un papel importante en la protección contra la apoptosis de los linfocitos T (Boise y asociados, 1995). Un aumento sostenido en la expresión bcl-x_L es observado en las células T coestimuladas por los unes cruzados de la CD28 (Boise y asociados, 1995). Se cree que la coestimulación de la CD28 puede actuar para estabilizar el ARNm de la bcl-x_L previniendo la presentación de la apoptosis, la expresión del polipéptido codificado (Radvanyi y asociados, 1996).

Se ha demostrado que el unes de la CD28 tiene un papel en el aumento de la producción de una variedad, tanto de las citoquinas auxiliares T del tipo 1 como del tipo 2 (Lenschow y asociados, 1996). También parece tener un papel para esta interacción en el desarrollo de las subpoblaciones específicas de auxiliares T. Las células T CD4⁺ del ratón naive normalmente desarrollarán un fenotipo Th1 si son activadas en la ausencia de la señalización mediada por la CD28/CD80 (Lenschow y asociados, 1996). Este puede ser un papel indirecto ya que la producción de IL-4 podría ser inducida por la inducción exógena del IL-2, y el papel de la señalización de la CD28 en la producción del IL-2 ya ha sido explicado (Seder y asociados, 1994). Los estudios adicionales que comprenden las CD28 de los ratones inconscientes, apoyan adicionalmente un papel para el receptor en el desarrollo de las células Th2.

Los ratones con CD28^{-/-} fueron desarrollados por Shaninian y asociados, con la intención de establecer la forma en que se adapta un animal a la infección, en ausencia de la señal secundaria derivada de la CD28 (Shaninian y asociados, 1993). El gen fue interrumpido en las células del tronco embrionario, por medio del reemplazo parcial del segundo exón con un gen de resistencia de neomicín (Shaninian y

asociados, 1993). El PBMC del homocigoto del ratón para dejarlo inconsciente, se encontró que no expresa la CD28 en sus células T, mientras que encontró que los heterocigotos CD28^{+/-} tienen una expresión reducida de la superficie de la molécula (Shaninian y asociados, 1993). La estimulación mitogénica de las células T derivadas de la CD28^{-/-} del ratón tenía una proliferación reducida de células T y una producción de citoquinas que solamente podría ser restaurada parcialmente por el exógeno IL-2 (Shaninian y asociados, 1993). Se ha demostrado, que las células T altamente purificadas no son activadas por lectinas en la ausencia de APC (Unanue, 1984). Con esta deformación de inconsciencia, se ha demostrado que se requiere la interacción de la CD28/CD80 para la mitogenicidad de las lectinas de célula T (Shaninian y asociados, 1993). También se encontró que la interacción es importante en la mediación de los cambios isotípicos de las células B, en respuesta al antígeno (Shaninian y asociados, 1993). Al contrario que los ratones inconscientes de CD80, un papel demostrable para la CD28, podría ser determinado, utilizando la tecnología de inconsciencia del gen. Todavía, se ha reportado el ratón inconsciente CTLA-4, pero ha sido estudiada la sobreproducción de la CTLA-4 Ig en un ratón transgénico (Lane y asociados, 1994). Como podría anticiparse, esta deformación tiene algunas características fenotípicas que son similares a las deformaciones deficientes de CD28 (Lane y asociados, 1994). Aunque las células T aisladas producen cantidades normales de IFN γ , se obtuvieron cantidades apreciables menores de IL-4 a la estimulación (Ronchese y asociados, 1994). Esto conduce a la falta de capacidad de las células B para montar o mantener una respuesta humoral apropiada (Ronchese y asociados, 1994). Aunque existen muchas trayectorias propuestas para la diferenciación de la Th1 y Th2, la interacción de CD28/B7 tiene una influencia demostrable en la diferenciación del sub-conjunto de células T.

La estabilización de la interleuquina-2 del ARNm puede ser tal vez una función crítica del cruce de la CD28, pero se ha demostrado que un rango de otras citoquinas son afectadas directa o indirectamente por esta interacción (Linsley y asociados, 1991a). Los mediadores inflamatorios IL-1 α , IL-6 y TNF α son producidos en las poblaciones de la memoria de la célula T en respuesta a la señalización de la CD28, mientras que en las poblaciones de ratones naive solamente se produjo el IL-1 α (Cerdan y asociados, 1991; van Kooten y asociados, 1991). La expresión de IL-4 también es regulada a través de la trayectoria de señalización de la CD28 (Seder y asociados, 1994). El IL-5, IL-10 e IL-13, otros mediadores importantes de la respuesta humoral, también son regulados de manera ascendente por medio de la interacción

(deWaal Malefyt y asociados, 1993, Minty y asociados, 1993). Además de la estimulación de la colonia y los factores de crecimiento que incluyen el GM-CSF, el CSF-1 y el IL-3 y los factores quimiotácticos que incluyen el IL-8, todos son regulados ascendentemente con la señal producida por la CD28 (Harlan y asociados, 1995).

5 Aunque se ha sido discutido anteriormente el uso potencial de la CD80 en la inducción de la inmunidad contra el cáncer, existe un rango de otros usos clínicos propuestos para la CD28 y la CD80. La prevención de la interacción entre la CD28 y la CD80 se ha demostrado en sistemas modelo de roedores para facilitar la prevención o tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes, en la
10 prevención de la presentación del rechazo de órganos, o trasplantes contra la enfermedad del huésped, y en la prevención de la citoquina liberada asociada con la sepsis (Harlan y asociados, 1995; Nickoloff y asociados, 1993; Thomas y asociados, 1994; Zhou y asociados, 1994). La adición del CTLA-4 Ig para bloquear la interacción CD28/CD80 en los ratones, puede evitar síntomas similares al lupus en los ratones
15 NZB/NZW, y puede proteger parcialmente contra el EAE letal y la nefritis letal en las ratas (Harlan y asociados, 1995). Aunque no se ha intentado esta forma de inmunoterapia para enfermedades autoinmunes en los humanos, se ha observado en los humanos que en la psoriasis y la artritis reumatoide, las biopsias demuestran la expresión de la CD80 mientras que en las biopsias normales, esta
20 expresión está ausente (Nickoloff y asociados, 1993; Thomas y asociados, 1994). En la médula ósea, y los trasplantes de órganos en los ratones y en los experimentos humanos *in vitro*, la adición de la CTLA-4 Ig y la prevención de la interacción de la CD28/B7 puede resultar en por lo menos una protección parcial contra el rechazo de órganos, la prevención de GVHD o la inducción de la tolerancia específica al antígeno
25 (Harlan y asociados, 1995). Y finalmente, la liberación de citoquina y la presentación de la sepsis que pueden conducir al choque séptico o a la septicemia, pueden ser evitados en los ratones mediante la administración del CTLA-4 Ig *in vivo* (Zhou, y asociados, 1994). La manipulación de la interacción de la CD28/CD80 proporciona una comprensión más completa de la coestimulación de la célula T y proporciona la
30 sentido del establecimiento de soluciones para una variedad de problemas.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Aislamiento de un fragmento inicial de CD28

El ARNm fue extractado de los linfocitos sanguíneos periféricos HK5
35 estimulados durante 16 horas con un Con A, utilizando el reactivo de extracción de

ARNzolB ARN (Biotexc, Houston, TX). Inicialmente el ADNc fue derivado de este ARN por la transcriptasa inversa (RT) una reacción que emplea el oligo dT como el cebador 3'. Brevemente, el ARN y el oligo dT fueron calentados a una temperatura de 75°C durante 3 minutos para remover la estructura secundaria. Posteriormente, se agregaron el RT, el dNTP, regulador y agua destilada, y la mezcla fue incubada durante 1 hora a una temperatura de 42°C. Después de esta incubación, la muestra fue calentada a una temperatura de 95°C durante 5 minutos para desactivar el RT. Los cebadores del degenerado derivado de las regiones de consenso encontrados dentro del CD28 de humanos, ratones murine y conejos, secuencias publicadas de ácido nucleico (GeneBank, Bethesda, MD), entonces fueron empleados para la amplificación inicial de un fragmento de nucleótido 673 que codifica la mayoría de la marco de lectura abierto.

CD28-113: CAA CCT TAG CTG CAA GTA CAC (NO. ID. SEC: 70)

CD28-768: GGC TTC TGG ATA GGG ATA GG (NO. ID. SEC: 71)

Para amplificar el producto, se utilizó un protocolo PCR de inicio caliente que emplea polimerasa Taq (95°C durante 5 minutos, 1 ciclo; 95°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, 30 ciclos; 72°C durante 7 minutos, 1 ciclo). Posteriormente, el fragmento fue visualizado en un gel de agarosa al 1%, y ligado dentro del vector de clonación TA (InVitrogen, San Diego, CA), y secuenciado tal y como se describió anteriormente. De la frecuencia del ADNc, se derivaron y sintetizaron cebadores 3' específicos para usarse en las reacciones RACE 5'.

CD28190: CGG AGG TAG AAT TGC ACT GTC C (NO. ID. SEC: 72)

CD28 239: ATT TTG CAG AAG TAA ATA TCC (NO. ID. SEC: 73)

Aislamiento de la región 5'

Se empleó un protocolo RACE 5' GIBCO modificado (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) para obtener la secuencia 5' restante de la molécula CD28 de feliNO. El ARN fue extractado de un PBMC estimulado Con A durante 16 horas. Se empleó un cebador específico del gen 3' para la primera hilera de síntesis de ADNc. El ARN y el cebador fueron calentados a una temperatura de 75°C durante 5 minutos antes de la adición de los otros reactivos RT. Después de la desnaturalización, la

mezcla fue enfriada a una temperatura de 4°C y se le agregaron el regulador de la reacción, cloruro de magnesio, dNTP, DTT y SuperScript RT (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). La mezcla de RT fue incubada a una temperatura de 42°C durante 30 minutos y luego calentada a una temperatura de 70°C durante 15 minutos para desnaturalizar el RT. El coctel de RNasa entonces fue agregado a la reacción incubada a una temperatura de 55°C durante 10 minutos para la remoción del ARN residual y para evitar la extensión de la transferasa terminal incorrecta (TdT). El ADNc entonces fue purificado sobre una columna de agitador GlassMax (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) para remover el dNTP y el cebador no incorporados. El ADNc purificado eluído de la columna fue probado después con TdT. El TdT fue empleado para agregar una cola dC del nucleótido 20 al 30 al ADNc. La enzima fue agregada a una mezcla de ADNc purificado, cloruro de magnesio, regulador de reacción, y dCTP después de la desnaturalización del ADNc a una temperatura de 95°C durante 3 minutos. La reacción fue incubada a una temperatura de 37°C durante 10 minutos, y luego la enzima desactivada, fue calentada a una temperatura de 70°C durante 10 minutos adicionales. El ADNc añadido fue amplificado en una polimerasa Taq basada en la reacción PCR de inicio caliente (95°C durante 5 minutos; 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos, 35 ciclos; 72°C durante 7 minutos). Los cebadores para esta reacción incluyeron cebador 3' localizado en el cebador de síntesis 5' del ADNc, y un cebador de ancla específico para el unidor dC y compuesto en gran parte de dG con pocos residuos de dI. Una μ l de esta reacción fue diluida en 50 μ l de agua y 5 μ l de esta solución fueron utilizadas entonces en una reacción PCR anidada (95°C durante 5 minutos, 1 ciclo; 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, 30 ciclos con una mezcla de polimerasa KlenTaq), con un cebador de ancla 5' dG/dI y un cebador específico 3' adicional de gen ascendente. Entonces se visualizaron treinta μ l de la reacción anidada en un gel de agarosa al 1.5%, y el fragmento apropiado fue extractado del gel. El ADNc fue purificado tal y como se describió anteriormente con el nebulizador de gel Amicon, y el filtro micropuro (Amicon, Beverly, MA). La muestra purificada de ADNc fue secuenciada a través de un ciclo finalizador de tinte, de la elaboración de secuencia del ciclo de finalizador de tinte (Perkin Elmer, Norwalk, CN). De los fragmentos completados, se derivó una secuencia de consenso. De la secuencia, se sintetizó un par de cebadores que comprendían el marco completo de lectura abierta del gen CD28 de felino:

feCD28 5': CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG

(NO. ID. SEC: 13)

feCD28 3': CGC GGA TCC TCT GGA TAG GGG TCC ATG TCA G

(NO. ID. SEC: 14)

5 Utilizando estos cebadores, una molécula ADNc que incluye la región de
codificación total, fue amplificada a partir del EK6 y ED3 estimulados por medio de
Con A del ADNc derivado del PBMC. El ADNc del PBMC fue producido anteriormente
y ha demostrado que contiene el ARN que codifica el gen. Esta reacción PCR (95°C
durante 5 minutos, 1 ciclo; 95°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos y
10 72°C durante 45 segundos, 30 ciclos; 72°C durante 7 minutos), utilizando polimerasa
de ADN KlenTaq con la esperanza de reducir los errores aleatorios, frecuentemente
asociados con la polimerasa Taq, se produjo un fragmento 754 bp, el cual fue clonado
dentro de un vector TA de clonación y secuenciado tal y como se describió
anteriormente. Igual que con la molécula CD80, cada uno de los sitios del nucleótido
15 fue confirmado por al menos tres secuencias derivadas independientemente.

RESULTADOS

La degeneración de los cebadores seleccionados de las regiones de
consenso dentro de las secuencias de ADNc del CD28 de ratón murine, humano y
20 conejo, fueron empleados en la reacción PCR y produjeron exitosamente un producto
que comprendió casi todas las secuencias codificadoras del felINO. Debido al grado
más alto de conservación encontrado en la molécula CD28, la amplificación inicial
usando los cebadores degenerados produjeron virtualmente la molécula completa. Al
contrario que con la molécula CD80 felina, en la cual solamente un fragmento central
25 pequeño fue producido inicialmente, faltaron solamente la mayoría 5' de los
nucleótidos 113 del marco de lectura abierta del ADNc de la CD28. Esta secuencia
del fragmento inicial compartió una homología del 86% con la región análoga dentro
de la secuencia humana, un 86% de identidad con el ADNc de conejo y una homología
del 79% con la secuencia codificadora del ratón murine.

30 El ATG 5', y los nucleótidos 110 adicionales, así como algunas secuencias 5'
ascendentes, fueron aislados utilizando un PCR RACE 5' (Gibco, Gaithersburg, MA).
El ADNc transcrito del EK6 estimulado mediante Con A del PBMC fue utilizado en las
reacciones de las colas. Con este material, la amplificación con cebador CD28-786 y
el cebador ancla dG produjeron un material poco definible. Aunque fueron amplificadas
35 bandas no identificables con la combinación del cebador dG/CD-786, el ADNc diluido

de esta reacción fue amplificado utilizando cebadores CD28 anidados, CD28-182 y CD28-239. Estuvo presente una banda visible en aproximadamente 600 bp. Este producto cuando fue aislado de un gel de agarosa y secuenciado, contenía una secuencia ascendente 5' que incluía y continuaba a través del codón de iniciación

5 De la secuencia de estos productos, se derivó un cebador 5' que incluyó el codón inicial. Este cebador, en combinación con la construcción 3' fueron usados para amplificar el ADNc del ARN extractado del EK6 y el ED3, el PBMC estimulado con Con A produciendo un producto 754 bp.

10 Por lo menos dos de los productos de cada animal, fueron secuenciados completamente, y cada sitio de ácido nucleico fue revisado y confirmado con, por lo menos tres secuencias de lectura correctamente independientes. Después de la elaboración de la secuencia del producto de longitud total, la secuencia del vector de clonación TA para asegurar un producto consistente y reproducible.

15 Dentro del fragmento final 685 bp codificador del marco de lectura abierto completo, se localizó el ATC 5' en la posición 1, el codón de detención fue encontrado en la posición 664-666, con los nucleótidos 19 adicionales en el UTR 3' (Figura 24). De un modo similar que con la molécula fe CD80, la posición 5' del codón ATG fue confirmada a través de la elaboración de la secuencia de los productos PCR RACE 5' (datos no mostrados).

20 Una vez secuenciado, el gen CD28 de felino, demostró una identidad general que fue lo más cercana a las secuencias del conejo y el humano. La homología con el ADNc del ratón murine todavía fue fuerte, aunque la identidad con la secuencia de gallina fue más divergente, de modo que es comparable a la que se ha visto entre la secuencia de gallina y otros genes de mamífero (Tabla 2).

Tabla 2: Comparación de la homología de secuencia del CD28 de felino con ratón murine, humano, gallina y conejo.

5	Especie	Porcentaje de homología con la secuencia felina:	
		Aminoácido	Nucleótido
	Humano	85%	82%
	Ratón	77%	74%
10	Conejo	84%	84%
	Gallina	59%	50%

15 Una secuencia de péptido de aminoácido fue derivada de la secuencia de ácido nucleico, tal y como se describió anteriormente. La identidad con las secuencias de péptido derivadas de los otros genes publicados, fue comparable con la identidad en el nivel de nucleótidos. La secuencia de señal del péptido se extiende desde la metionina 5' a través del residuo 19. Parece que la molécula felina, así como en otros

20 polipéptidos CD28 clonados, el dominio sencillo extracelular IgSF que parece variable se extiende desde el residuo 19 al 153. La membrana hidrofóbica que atraviesa el dominio se extiende para los siguientes 27 residuos, y es seguida por la cola citoplásmica de aminoácido 41. Igual que con la molécula CD28 humana, el polipéptido felino tiene 5 sitios potenciales de glicosilación unidos-N.

25 La comparación de las secuencias anticipadas de aminoácido de las proteínas CD28 felinas y humanas, demostraron regiones de homología con algunas diferencias. La mayoría de los cambios se pueden encontrar en el dominio de transmembrana y en la secuencia de señal y en el dominio terminal NH₃. El grado más alto de homología se encuentra en el dominio central IgSF similar al V, y en la

30 cola citoplásmica.

Las comparaciones de la molécula CD28 felina con las secuencias anticipadas de aminoácido del humano y los miembros murine de la familia CD28/CTLA-4 demuestran que, aunque existe solamente una homología general del 25% entre los miembros de este grupo, esas regiones específicas y los residuos son

35 mantenidos. El motivo MYPPPY es retenido por todos los miembros de este grupo.

Aparecen residuos adicionales retenidos en la molécula felina que se anticipa que son importantes para la integridad estructural, incluyendo un número de residuos conservados de cisteína.

5 El dominio citoplásmico de la molécula CD28 felina es conservado moderadamente con otras secuencias publicadas, especialmente secuencias de mamíferos. Se propone que una variedad de trayectorias de señalización intracelular, son mediadas como resultado del cruce de la porción extracelular del receptor (Hutchcroft y Bierer, 1995).

10 Las gráficas de hidrofiliidad de la secuencia anticipada de aminoácidos del CD28 felino cuando son comparadas con gráficas similares del polipéptido humano, demuestra adicionalmente, la probabilidad de que cada una de las proteínas, retiene una integridad estructural similar. Sin embargo, cuando ocurren cambios en la secuencia de aminoácidos, no parece haber cambios significativos en la hidrofiliidad de la molécula, los cuales reflejen que los cambios en la secuencia de aminoácidos
15 son homólogos de una manera importante. Es importante saber que la membrana hidrofóbica que atraviesa el dominio, en el cual los péptidos felinos y humanos solamente comparten una homología del 75%, aunque tienen perfiles de hidrofiliidad muy similares.

20 **EXPLICACIÓN**

Las secuencias de las moléculas de CD28 clonadas demostraron todas, un nivel moderado de conservación de evolución. Se puede tener la hipótesis de que el papel de la molécula en la activación y la mediación de la inmunidad mediada por las células T es retenida en una variedad de vertebrados más alta, desde las aves de
25 corral, hasta los roedores y carnívoros, y que incluye los primates mayores.

La comparación de las secuencias putativas de aminoácidos de cada una de las moléculas, muestra una homología moderada en las porciones del dominio extracelular, que se propone que estén involucradas con el cruce del ligando y en las regiones intracelulares, se propone que promueven la señalización intracelular. En
30 general, el grado más alto de homología se encuentra en los alrededores de la región del sitio propuesto del cruce del ligando, MYPPPY, localizado en el dominio IgV de los residuos del 118 al 123 en el polipéptido felino.

La secuencia de señal propuesta del péptido se extiende desde la metionina 5' hasta el residuo 19 (Aruffo y asociados, 1987). El CD28 monomérico está
35 compuesto de un dominio simple extracelular IgSF similar al variable, el cual se

extiende desde el residuo 19 al 153 (Aruffo y asociados, 1987). La membrana hidrofóbica que atraviesa el dominio se extiende para los siguientes 27 residuos, y es seguida por una cola citoplásmica de 41 aminoácidos (Aruffo y asociados, 1987). La proteína del felino tiene 5 sitios potenciales de glicosilación enlazadas en posiciones idénticas a aquellas encontradas en la proteína humana. Es interesante, que el sitio de glicosilación localizado en el residuo 105 en la proteína felina es NQS, mientras que la secuencia en el humano es NQT. Esta divergencia del aminoácido refleja adicionalmente que, aunque existen cambios de frecuencia entre las moléculas, las características generales de la estructura son retenidas.

Como podría esperarse, debido al nivel de homología compartido por la proteína, la comparación de las gráficas de hidrofiliidad del CD28 felino y humano demuestra que las moléculas comparten patrones de conformación potencialmente similares. Sin embargo, también revela que cuando existe un residuo que es alterado, el cambio es generalmente homólogo.

Aunque el dominio transmembrana es el área de la molécula con el grado más bajo de conservación, retiene simplemente su carácter hidrofóbico requerido, el dominio citoplásmico de la molécula CD28 del felino es conservada moderadamente con otras secuencias publicadas. Se propone que una variedad de trayectorias y de señalización intracelular son mediadas a través del cruce de la porción extracelular del receptor y aunque la porción intracelular del polipéptido CD28 no tiene actividad enzimática intrínseca, sino más bien un rol de ligando, da como resultado la activación de las moléculas realizadoras intracelulares (Aruffo y asociados, 1987). Existen cuatro residuos de tirosina conservados (Y^{173} , Y^{188} , Y^{101} y Y^{200}) que han sido propuestos como sitios potenciales para la fosforilación de la tirosina (Lu y asociados, 1992). Adicionalmente, la secuencia MNM que comienza en el residuo 193 de la molécula felina, se propone como un sitio de un dominio de SH2 en las proteínas humana y de ratón murine (Prasad y asociados, 1995). Un sitio potencial de fosforilación por la quinasa C de la proteína es retenida en el S^{185} , mientras que el T^{202} puede ser un sitio de la prolina Erk1 o Erk2 de la actividad de la quinasa dirigida por serina/treonina (Hutchcroft y Bierer, 1996). Como se explicó anteriormente, la función de señalización del receptor CD28 es multifacética, por lo que no es sorprendente, que la cola citoplásmica del péptido tenga mediadores de señalización potencial múltiples.

Las aplicaciones futuras de la molécula CD28 felina deben de incluir el desarrollo de herramientas para detectar la expresión de la superficie del receptor y monitorear la expresión de la CD28 después de las infecciones con virus, tales

como el VIF. Si las herramientas para la detección de las proteínas pueden ser combinadas por los procedimientos existentes de detección de mensajes, se puede determinar información valiosa acerca de los niveles de expresión durante el curso de la infección. Una correlación adicional de la expresión de los patrones de expresión de la CD28 durante el curso de la infección VIF crónica, actuará para ejemplificar el sistema felino, como el modelo apropiado de la infección VIH en los humanos, y también puede conducir a respuestas más definitivas con respecto al curso de la infección en ambos sistemas.

Ejemplo 7

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CD28/D80

INTRODUCCIÓN

Aunque la comunicación del sistema inmunológico es mediada en gran parte a través de factores solubles, la iniciación de una respuesta de las células T primarias en los primates y en los roedores, se ha determinado que requiere dirigir el contacto de células a célula (Mescher, 1992). Originalmente, se tenía la idea de que esta interacción comprendía únicamente la interacción entre el TCR en las células T y el MHC en las células de presentación del antígeno, pero se ha aclarado, que para la activación completa de las células T, se requiere el une entre las moléculas accesorias (Schwartz, 1992). Como se explicó, la evidencia apoya la interacción entre CD28 y la CD80 como el mediador de esta señal accesorio (Linsley y asociados, 1991a).

Muchos de los receptores y ligandos en los vertebrados son miembros de la superfamilia IgSF (Springer, 1990). Las moléculas son caracterizadas por la presencia de una región similar a la inmunoglobulina, normalmente en la porción extracelular de la molécula (Buck, 1992). Aunque la conservación varía, frecuentemente es limitada a aquellos residuos requeridos para generar el doblado de la Ig (Beale, 1985). Las características del dominio Ig incluyen dos hilos β paralelos, cercanamente asociados conectados por circuitos que siguen la topología conservada (Williams y Barclay, 1988). Aunque existe una participación de las propiedades estructurales entre los miembros de esta familia, existe una distribución diversa de las interacciones de une, y las propiedades de señalización particulares a esta familia (Anderson y asociados, 1988).

Como miembros de la familia IgSF, tanto la CD28 como la CD80 comparten un grado de similitud estructural en sus dominios extracelulares. La CD28 tiene una región V extracelular simple, aunque es expresada como un heterodímero unido por disulfuro (Aruffo y asociados, 1987). La región extracelular de la molécula CD80, sin

embargo, tiene tipos de dominio C y similares al V, y es expresada como un monómero (Freedman y asociados, 1989). Debido a que los miembros de la familia IgSF comparten características estructurales, se pueden utilizar plantillas, de una manera limitada, con el objeto de establecer una idea de la estructura tridimensional de las moléculas relacionadas que no han sido cristalizadas (Bajorath y asociados, 1993). Aunque ni el polipéptido de la CD28, ni el de la CD80 han sido cristalizados, las moléculas CD2 (Driscoll y asociados, 1991) y CD8 (Leahy y asociados, 1992), con dominios extracelulares análogos, han sido examinados mediante cristalografía de rayos X para darnos alguna idea con respecto a la estructura de los miembros relacionados del grupo IgSF (Linsley y asociados, 1995a).

Tal y como se explicó anteriormente, la CD80 y la CD86 comparten una avidéz de unión similar con la CD28 y la CTLA-4. Sin embargo, la CD28 es un receptor de baja afinidad para los ligandos mientras que la CTLA-4 tiene alta afinidad para ambas moléculas (Linsley y asociados, 1994a). Aunque se ha propuesto un mecanismo potencial, no es clara la forma en que el receptor de baja afinidad, con un rango de disociación rápido, tal como lo posee la CD28 pueda producir la señal coestimulante necesaria para el desarrollo de las células T (Linsley y asociados, 1995a). Existe la hipótesis de que el une de la CD80 a la CD28 en la superficie de las células T pueden promover la oligomerización del receptor el cual facilitaría el une cruzado productivo, y la producción de la señal (Linsley y asociados, 1995a). Se ha descubierto que la CD28 está distribuida de manera uniforme en las células T activadas y por lo tanto, se propone que la molécula migra en la membrana después de encajarse en la célula T (Damle y asociados, 1994). Las altas concentraciones de la CD28 oligomerizada promovería la nueva asociación de la CD28 libre, en la región del contacto célula a célula, y promovería la producción de la señal a pesar del rango rápido de disociación (Linsley y asociados, 1995a). Este proceso, que se denomina tapado mutuo, aunque no es observado directamente en la interacción de la CD28/CD80, ha sido demostrado para otros receptores en los cuales se requiere una iniciación similar del contacto de célula a célula (Singer, 1992).

Aunque se ha demostrado que la interacción de la CD28/CD80 es crítico para la promulgación de la respuesta inmunológica mediada por la célula T, permanece una gran parte que no es clara, acerca de los mecanismos exactos de esta trayectoria de señalización (Linsley y asociados, 1993a). La existencia de dos receptores y dos ligandos en esta interacción, plantea preguntas con respecto al papel que juega cada uno en la actividad de la célula T (Linsley y asociados, 1992b). Aunque la CTLA-4 se

une de una manera más fuerte, es expresada mucho más tarde después de la activación, y aunque se han propuesto trayectorias de señalización para la CD28, no se ha determinado si una señal es producida al unirse del ligando con la CTLA-4 (Linsley y asociados, 1995a).

5

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Preparación de Insertos

Los siguientes cebadores fueron usados para amplificar el marco de lectura abierto completo de los genes de la CD28 y CD80 felina para la inserción dentro de los

10

vectores de expresión:
feCD80 5': CGC GGA TCC GCA CCA TGG GTC ACG CAG CAA AGT GGA AAA C (NO. ID SEC.: 11)

fe CD80-960: CCT AGT AGA GAA GAG CTA AAG AGG C (NO. ID. SEC.: 12)

feCD28 5': CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG (NO. ID. SEC.: 13)

15

feCD28 3': CGC GGA TCC TCT GGA TAG GGG TCC ATG TCA G (NO. ID. SEC.: 14)

El cebador 5' de la CD80 y ambos cebadores de la CD28 fueron diseñados con los sitios BamHI y los unidores apropiados para facilitar la inserción dentro de los sitios múltiples de clonación. El sitio 3' BamHI fue diseñado sobre la secuencia del

CD80 por medio de la digestión de salida del vector de clonación TA. Los cebadores 5' también contienen una caja Kosak, y el ATG 5' para ambos genes. En cada caso, los cebadores fueron usados para amplificarlos a partir de la plantilla, codificando la secuencia completa de cada gen que había sido clonado anteriormente, dentro del vector de clonación TA, descrito anteriormente. Se utilizaron aproximadamente diez

nanogramos de cada plásmido en una amplificación PCR basada en polimerasa Taq (95° C durante 5 minutos, un ciclo; 95° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos, 68° C durante 45 segundos, 30 ciclos; 68° C durante 7 minutos 1 ciclo). Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa y posteriormente, son ligados dentro del vector de clonación TA (Invitrogen, San

Diego, CA), tal y como se describió anteriormente. La reacción de unión de ligación cruzada para transformar las células de componente InvαF', y los clones positivos fueron clasificados y seleccionados, tal y como se describió anteriormente.

20

25

30

35

Clonación dentro del pSI.

Para que sea usada la clonación dentro del vector pSI en la transformación de las células COS-7, el plásmido fue digerido con EcoRI, luego la enzima fue removida con la columna giratoria Micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Después de la
5 remoción de la enzima, el plásmido fue tratado con fenol:cloroformo para remover cualquier proteína residual y precipitada en alcohol. Los insertos fueron digeridos a partir de 50 µg de ADN de plásmido QIAGEN purificado (Qiagen, Chatsworth, CA) de los clones contenidos en el vector de clonación TA con los insertos apropiados, utilizando los sitios EcoRI encontrados en el vector flanqueando el inserto. El digerido
10 de 100 µl fue sometido a electroforesis, en un gel de agarosa de 1.5%, y se cortó el fragmento digerido. Posteriormente, el inserto fue purificado a partir de la agarosa con un nebulizador de gel y una unidad de filtro microcon (Amicon, Beverly, MA). El tratamiento con fosfatasa alcalina del pSI digerido con EcoRI, redujo las oportunidades de la autoligación del vector. Una hora de tratamiento a una temperatura de 37° C con
15 0.1 U/µg de fosfatasa alcalina intestinal de becerro (CIP) desfosforiló los extremos digeridos del vector. El CIP fue removido por desnaturalización por calor a una temperatura de 65° C durante 30 minutos seguido por la purificación por agitación con una columna de agitación micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Los insertos fueron ligados directamente dentro del corte y el vector pSI desfosforilado, durante la noche a
20 una temperatura de 16° C utilizando una ligaza de ADN T4. La proporción molar del ligando al vector fue de aproximadamente tres a uno, con un inserto de CD28 o CD80 de 0,05 µg a 0,1 µg de pSI. Luego se utilizó un µl de la reacción de ligación para transformar la célula y el InvαF' competentes. Las células fueron pasadas sobre placas LB con un contenido de 50 µg/ml de ampicilina. Las placas fueron incubadas durante
25 la noche a una temperatura de 37° C y el día siguiente, las colonias fueron inoculadas dentro de 5 ml de medio de LB con un contenido de 100 µg/ml de ampicilina. Después de la incubación durante la noche a una temperatura de 37° C con una agitación a 220 rpm, se extractó el ADN plásmido, con lisis alcalina, el ADN fue purificado por extracción con fenol:cloroformo, y precipitado con dos volúmenes de etanol al 95%. El
30 ADN fue tratado con RNasa y luego digerido con 10 U de EcoRI. Los digeridos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% para identificar los clones positivos. El ADN del plásmido fue extractado entonces a partir de 5 ml del cultivo de la noche anterior de los clones positivos, utilizando las columnas de agitación QISprep (QIAGEN, Chatsworth, Ca). Entonces, el ADN purificado fue secuenciado mediante la
35 elaboración de secuencia de ciclo de tinte terminador con un cebador 3' interno para

determinar la orientación del inserto en el plásmido. La localización del cebador fue tal que la elaboración de secuencia hubiera procedido durante toda la unión entre el vector y el inserto para asegurar que la orientación fuera completa. Un clon de cada uno de los genes con el plásmido en la orientación apropiada fue cultivado después en un cultivo de 100 ml, y el plásmido extractado con una columna maxi-prep QIAGEN (Chatsworth, CA).

Clonación dentro del SFV

Para la inserción dentro vector SFV, los vectores y el plásmido fueron tratados de un modo muy similar. Cien µg del sector SFV fueron digeridos con 120 U de BamHI durante una hora a una temperatura de 37° C. La enzima fue removida del digerido por medio de centrifugación a través de un filtro micropure EZ (Amicon, Beverly, MA). Luego el plásmido fue tratado con CIP. El CIP fue calentado e desactivado y luego el plásmido fue purificado nuevamente con un filtro micropure EZ. Los insertos fueron extractados del ADN del vector de clonación TA purificado por la digestión del BamHI. Los insertos fueron purificados y ligados dentro del vector, tal y como se describió anteriormente. Después de la transformación de las células InvαF' competentes, el inserto de plásmido y la orientación fueron confirmados con la elaboración de secuencia de ciclo de tinte terminador, tal como se describió anteriormente. Una gran escala de la preparación del plásmido fue realizada en un clon positivo de cada gen.

Expresión de la Proteína pSI.

Para la transformación de la proteína pSI de las células eucarióticas, se obtuvieron células COS-7 de una colección de cultivo tipo americano (ATCC). El material congelado, se volvió a suspender en 15 ml de DMEM más suero fetal de becerro al 10% (FCS). Entonces, los cultivos fueron cultivados como una monocapa en matraces T-75. Una noche antes de la transfección, las células fueron removidas de los matraces después de su tratamiento con una solución al 0,25% de EDTA tripsina, lavándolos con PBS. Las células luego fueron sembradas en una confluencia de ~20% dentro de matraces de cultivo de tejido de 100 mm y se permitió que crecieran a una confluencia de ~50% durante el día siguiente. Para que cada uno de los platos fuera transfectado, se mezclaron 5 ml de DMEM-NuSuero, (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) con 0,2 ml de una solución de DEAE-dextrano/cloroquina. Entonces se le agregaron a la mezcla diez µg/ml del plásmido del

pSI purificado. El medio fue aspirado de las células COS y la solución de DMEM-NuSuero/DEAE-dextrano/cloroquina/ADN fue agregada a las células. El cultivo fue incubado durante 3,5 horas en un incubador de CO₂ al 5% seguido por la remoción del medio y el reemplazo con 5 ml de DMSO al 10% en PBS. Después de 2 minutos esta
5 solución fue aspirada, y las células cultivadas durante la noche en 5 ml de DMEM/FBS al 10%. Al día siguiente, las células fueron divididas en dos trastes de cultivo de 100mm. Después de 3 días, el medio fue aspirado y las células transformadas removidas con PBS/0,5 µM de EDTA. La mezcla de PBS/EDTA fue agregada a las células y luego fueron incubadas durante 15 minutos a una temperatura de 37°C. El
10 flotante fue removido, y combinado con lavados de PBS subsecuentes. El flotante y los lavados fueron centrifugados posteriormente. La pídora resultante se volvió a suspender en DMEM/FBS, y se contaron las células COS.

Expresión de la Proteína SFV.

15 La transfección con el vector SFV fue realizada en células de riñón de hamster bebé (BHK). Treinta µg de plásmido purificado fueron digeridos con Spel durante 1 hora a una temperatura de 37°C. La enzima fue removida entonces con un filtro micropure EZ (Amico, Beverly, MA) y el ADN precipitado con 2,5 volúmenes de EtOH al 95%. Entonces se utilizaron una y media µg del plásmido como plantilla para
20 la transcripción *in vitro* mediada por Sp6. Brevemente, el ADN fue incubado durante una hora a una temperatura de 37°C con: regulador de transcripción, 100 mM de DTT, 10 mM de mezcla de G(5') ppp (5') G, rNTP, agua, RNasin, y 60 U de polimerasa de ARN Sp6. Después de la transcripción, la reacción fue dividida en alícuotas y se visualizó una muestra en gel de agarosa al 1%. Se utilizaron cuarenta y cinco µl de la
25 reacción de transcripción para transfectar células BHK en una confluencia de ~80% en matraces T-75. El medio de GMEM más el medio FCS 10% fue aspirado de las células y reemplazado por un medio Opti-MEM. Después de una incubación de 2 minutos, este medio fue reemplazado con medio Opti-MEM/9 µg/ml de ARN de lipofectin/transcrito. Los cultivos fueron incubados durante dos horas a una
30 temperatura de 37° C en un CO₂ al 5% con una agitación manual frecuente. Después de 2 horas, el medio fue removido, y reemplazado con GMEM-FCS al 10%. Los cultivos fueron incubados durante un periodo de 7 a 9 horas, y las células fueron removidas posteriormente mediante tripsinización.

Clonación dentro del pQE.

Un vector de expresión bacteriana pQE, también fue construido con el gen CD28 y CD80 felino. El corte, y el plásmido pQE tratado con CIP preparado y purificado tal y como se describió anteriormente, fue ligado con ligasa T4 de ADN en una proporción molar de plásmidos del inserto de cuatro a uno con 50 ng de CD28 o CD80 purificado con gel. La ligación fue incubada durante 16 horas a una temperatura de 16° C, luego se utilizaron dos μ l de la reacción de ligación para transformar las células INV α F' competentes. Las colonias positivas fueron seleccionadas y la orientación del inserto confirmado por medio de la elaboración de la secuencia. Se realizó la preparación de larga escala de los plásmidos purificados y fue usada para transformar las células M15 pREP4 hechas competentes por medio de un tratamiento con cloruro de rubidio. Las células transformadas fueron cultivadas en placas LB con 50 μ g/ml de Canamicina y ampicilina para asegurar que ambos plásmidos del pQE y el pREP4 ayudante fueran retenidos en estas colonias. Luego las colonias positivas fueron seleccionadas por medio de mini-preparados de lisis alcalina, y digestión de restricción de BamHI. Las colonias con insertos confirmados fueron congeladas en una solución de material de glicerol al 50% para uso futuro.

Ensayo de Une.

Los ensayos de unión para las células transfeccionadas que expresan el CD80 felino y el CD28 felino, fueron realizados después del protocolo descrito en Linsley y asociados, 1994a. Un día después de las transfección, las células COS-7 que expresan el CD28 fueron removidas de los matraces T-75 con un tratamiento de tripsina-EDTA. Se permitió que las células se adhirieran en las placas de 24 recipientes en una concentración de células 1×10^5 por ml. Dos días después, las células feCD80/pSI transfeccionadas con COS-7 fueron removidas de los matraces T-75 con PBS/0.5 μ M EDTA. Estas células luego fueron etiquetadas de manera fluorescente con una solución de 5 μ M de Calceína AM (Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS/BSA al 1% estéril durante 30 minutos a una temperatura de 37° C (Akeson y Woods, 1993). Las células COS-7 infectadas transfeccionadas fueron etiquetadas del mismo modo. Las células etiquetadas luego fueron lavadas tres veces con DMEM más FCS al 10% para remover la etiqueta no incorporada, contadas y se agregaron directamente a la monocapa. Se permitió que las dos poblaciones de células interactuaran durante 1 hora a una temperatura de 37° C. Las células no adherentes fueron removidas mediante un lavado suave de la monocapa 3 veces con

DMEM+FCS al 10%. Después del lavado, la fluorescencia de cada uno de los recipientes fue cuantificada en un fluorímetro de microplaca. La fluorescencia en los recipientes que contenían poblaciones infectadas fueron comparadas con los recipientes, en los cuales las células de expresión CD80 fueron agregadas a las células COS-7 transfeccionadas con solamente el plásmido pSI.

Los ensayos de unión competitivos, utilizando proteínas de fusión CTLA-4 Ig y CD80 Ig (Amablemente proporcionadas por P. Linsley, Bristol-Meyers Squibb) para inhibir las interacciones de célula/célula, que fueron diseñadas para demostrar la especificidad de la interacción. Después de la etiquetación con calceína, pero antes de la adición de las células de expresión CD80 a la monocapa, se incubaron células CTLA-4 Ig en DMEM/FCS en una concentración de 1 µg/ml con las células transfeccionadas etiquetadas durante 30 minutos. Las células fueron lavadas dos veces en DMEM/FCS y agregadas a la monocapa. Alternativamente, las células de expresión CD28 en la monocapa fueron incubadas durante 30 minutos, con una concentración de CD80 Ig de 1 µg/ml en DMEM/FCS y seguido del lavado, y se le agregaron las células de expresión CD80 etiquetadas de manera fluorescente. La inhibición del uno por las proteínas de fusión fue calibrada comparando la fluorescencia en estos recipientes con el uno observado en los recipientes sin los competidores.

RT-PCR.

Las células COS transfeccionadas también fueron ensayadas por la transcripción del ARNm por RT-PCR. Después de tres días, el ARN fue extractado de las células transfeccionadas con pSI por medio de feCD28, feCD80 o sin inserto. El ARN fue tratado con DNasa libre de RNasa para remover el potencial de contaminación del ADN. Medio µg de ARN entonces fue sometido a transcripción inversa utilizando un cebador oligo dT, y transcriptasa inversa MuMLV. Cada muestra de ADNc entonces fue amplificada con conjuntos de preparación específicos para CD28, CD80 y G3PDH con el siguiente ciclo de temperatura; 95° C 5 minutos 1 ciclo; 95° C 30 segundos, 55° C 30 segundos, 72° C 30 segundos, 30 ciclos; 72° C 5 minutos, 1 ciclo. Entonces se visualizaron 20 µl de cada una de las reacciones en un gel de agarosa al 1%.

RESULTADOS

Los genes del CD28 y CD80 felinos fueron insertados de manera exitosa en tres vectores de expresión de proteína (pSI, SFV y pQE). Después de la ligación de

los vectores respectivos, los genes fueron usados para transformar las células INV α F' competentes.

Se realizaron ensayos de unión para demostrar que la proteína funcional podría ser expresada. Los ensayos iniciales fueron realizados para determinar la relación entre el uno de las COS-7 transfeccionadas por las CD28 y CD80, y las CD28 tranfectadas y las células COS-7 de imitación transfeccionadas. La fluorescencia en los recipientes en los que se etiquetaron de manera fluorescente las células CD80 transfeccionadas no adherentes, fueron agregados en donde eran mayores que los recipientes de control en las dos diluciones iniciales. La interacción fue en respuesta a la dosis, y después de dos diluciones iniciales, la retención de la fluorescencia fue la misma en los recipientes en los cuales la proteína de la superficie expresada de las células adherentes como en los controles de imitación transfectados.

Para ilustrar que esta interacción podría ser inhibida, las líneas celulares transfeccionadas fueron incubadas con un receptor contador soluble antes de la mezcla. En concentraciones de células 5×10^5 y 1×10^5 , la fluorescencia en los recipientes que contenían las células COS que expresaban la CD28 y la CD80 fueron similares a las observadas en los experimentos anteriores. En los recipientes en los que las células adherentes fueron incubadas con el receptor-contador CD80Ig antes de la mezcla, la retención de la fluorescencia fue comparable con la encontrada en los recipientes de células de imitación transfeccionadas usadas para el control. Cuando las células COS transfeccionadas con CD80 pSI fueron incubadas con CTLA-4 soluble, antes de su exposición a las células CD28 transfeccionadas por pSI, sin embargo, la fluorescencia no fue inhibida tan completamente. Aunque los niveles no son tan significativos como aquellos que se vieron con los grupos no inhibidos, éste fue claramente mayor que con cualquiera de los grupos de control u otros grupos experimentales (Figura 40). El RT-PCR fue llevado a cabo en ARN derivado de células COS-7 transformadas con pSI-CD28, pSI-CD80 y células de imitación transfeccionadas para demostrar la presencia específica del ARNm por cada gen en la línea celular. La figura 32 ilustra el gel de agarosa al 1% para cada línea celular. El gen para la G3PDH fue amplificado en cada conjunto para mostrar la integridad de ARN, y como un control positivo el conjunto de imitación transfectado. Las células COS-7 transfeccionadas por CD80 pSI expresaron un mRNA CD80, y un mensaje G3PDH, mientras que las células COS-7 transfeccionadas con CD28 pSI expresaron los genes para el CD28 y el G3PDH. Las células de imitación transfeccionadas expresaron solamente el G3PDH.

EXPLICACIÓN.

La carencia de anticuerpos adecuados indicó que no se podría realizar un ensayo directo para demostrar la expresión del péptido. Los anticuerpos monoclonales CD28 anti-hu y CD80 anti-hu disponibles en el mercado fueron probados en linfocitos aislados para determinar si existía una reactividad cruzada. El análisis FACS utilizando los anticuerpos en las células confirmadas por el PCR como células de expresión de mensajes para ambas proteínas de la superficie no tuvo éxito. Esto en combinación con el hecho de que los anticuerpos no reconocen la expresión de la superficie en las células transfeccionadas por pSI, nos condujo a la conclusión de que estos anticuerpos no eran reactivos cruzados. No se esperaba que el anticuerpo CD80 se reactivara de manera cruzada. La homología limitada entre la molécula CD80 humana y felina limitaría el potencial para la reactividad cruzada en un anticuerpo derivado de manera monoclonal. Esto fue algo sorprendente, sin embargo, que el CD28 anti-hu no fuera reactivo cruzado. Aunque existe un grado más alto de conservación entre las moléculas CD28 clonadas, no se encontró un anticuerpo CD28 anti-hu comercialmente disponible que reaccionara de manera cruzada con la proteína de ratón. Igual que con el anticuerpo CD80 anti-hu, la prueba de los monoclonales CD28 hu tampoco tuvo éxito. Por lo que se tuvo que idear un ensayo que pudiera demostrar, no solamente la probabilidad de que los péptidos hubieran sido expresados, sino también mostrar que ellos fueran funcionales y con capacidad de interacción.

El ADNc del CD80 y CD28 felinos fueron insertados de manera exitosa en una serie de vectores de expresión. Aunque el vector pSI cumplió con los requerimientos necesarios para realizar el ensayo de una, los vectores adicionales pueden facilitar expresiones futuras de proteínas.

Después de la transfección, se confirmó la expresión del ARNm de CD28 y CD80 por las líneas celulares COS-7 transformadas, por medio del RT-PCR. El tratamiento de DNasa del ARN antes de la reacción PCR debe de haber reducido de manera significativa cualquier posibilidad de contaminación genómica o de ADN plásmido. Además, no se percibió que la célula COS-7 se expresara de manera natural, ya sea de ligando el cual fue confirmado adicionalmente por la falta de mensaje de ya sea de cualquiera de las proteínas de la superficie y las células de control y de imitación transfeccionadas usadas para el control. La amplificación del mensaje correcto ARN provenientes de las células transfeccionadas, parece reflejar que la plantilla pSI estuvo presente dentro de las células, y que el mensaje codificado por el plásmido estaba siendo transcrito.

Los ensayos de unión realizados fueron diseñados después de aquellos realizados por Peter Linsley para demostrar la avidez similar de unión de la CD80 y CD86 humana (Linsley y asociados, 1994 a). Se utilizó un formato modificado para demostrar que la CD28 felina expresada en la superficie se enlazó a la CD80 felina expresada en la superficie, y que la interacción pudo ser inhibida con el receptor soluble. Se podría deducir el nivel de unión a partir de la retención de las células de manera fluorescente en los recipientes específicos. Debido a que se utilizó un lector de placa fluorescente, no se requirió que las células fueran lisadas antes de la medición de la fluorescencia.

El ensayo inicial demostró que la retención de las células COS transfeccionadas con CD80-pSI etiquetadas de manera fluorescente, era mayor en los recipientes en los cuales fueron transfeccionadas las células adherentes con CD28-pSI, que en los recipientes en los cuales las células adherentes fueron transfeccionadas a modo de imitación. Las células de control, y las células de imitación COS transfeccionadas con el pSI carentes de un inserto, aseguraron que ni la presencia del vector, ni el proceso de transfección mismo, ni las propiedades adhesivas de las células, dan como resultado la adhesión entre las células mediada por la interacción entre la CD80 y la CD28 expresadas en la superficie. En la dilución inicial de las células 1×10^6 , la fluorescencia en los recipientes en los cuales las células estaba expresado el CD28 fue aproximadamente 5 veces mayor que el de los recipientes, en los cuales las células transfeccionadas con CD80 etiquetadas de manera fluorescente fueron introducidas dentro de los recipientes que contenían las células transfeccionadas por imitación. En las células de 5×10^5 de fluorescencia cae, de manera significativa, a la reducción en el número de células, pero el nivel todavía es significativamente más alto que la fluorescencia en las células de control. Por medio de una concentración de células de 1×10^5 , no se puede distinguir de manera estadística, la diferencia entre las células experimentales y las de control y las de 1×10^4 ellas son cercanamente idénticas. Este ensayo indica que está ocurriendo una interacción entre las células COS transfeccionadas con CD80 y CD28, la cual da como resultado la retención de las células transfeccionadas CD80 etiquetadas de manera fluorescente en los recipientes. Cuando las células adherentes no fueron proteínas de expresión de superficie, sin embargo, las células transfeccionadas con CD80 fueron removidas por medio de un lavado suave, este efecto podría ser titulado, y por medio de la fluorescencia de las células 1×10^4 en los recipientes que fueron virtualmente

idénticas. Con el objeto de confirmar que estaba ocurriendo una interacción, se introdujeron receptores solubles para inhibir la interacción de la CD28/CD80.

El segundo ensayo comprendió la introducción de formas solubles de receptores-contadores para cada uno de los péptidos, en un intento de inhibir la interacción entre los socios de adhesión. Un receptor soluble para el CD80, huCTLA-4Ig y para el CD28, huCD80-Ig fueron incubados con las células COS transfeccionadas respectivas que expresan el receptor-contador de cada molécula antes de la mezcla de los dos tipos de células. Aunque las proteínas solubles no fueron de origen felino, se sintió que debido al nivel de conservación encontrado entre las regiones propuestas de unión de las moléculas humanas y las regiones análogas de las moléculas felinas, habría una reactividad cruzada suficiente. Además, los socios de fusión de las moléculas humanas se unen con sus receptores-contadores de las moléculas de ratón murine (P. Linsley, comunicación personal). Debido al número de células requeridas en el ensayo, no fue posible realizar el ensayo de las células 1×10^6 . La primera concentración fue de células 5×10^5 demostrando las células transfeccionadas CD28/CD80 solas, un promedio de fluorescencia similar encontrado en el experimento anterior. No resultó claro por qué las células adherentes encubadas con el receptor CD80 soluble tuvieron una fluorescencia cercana a la del control de imitación transfectado, mientras que las células CD80 transfeccionadas etiquetadas de manera fluorescente no adherentes, incubadas con el CTLA-4 soluble tuvieron aproximadamente un doblez de dos a tres de fluorescencia más alta de dos a tres dobleces. Independientemente de las diferencias mediadas por el tipo de receptor soluble, existió una reducción marcada en la cantidad de fluorescencia en los recipientes, en los cuales el receptor soluble fue introducido sobre los recipientes en los cuales no estuvo presente el receptor. La interacción demostrada por el ensayo anterior puede ser inhibida mediante la introducción del receptor-contador soluble apropiado antes de la mezcla de las células.

Aunque los anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas de superficie, en general parecerían preferibles para este tipo de ensayo, en la ausencia de reactivos apropiados parece un formato viable a través del cual, la expresión de los receptores-contadores funcionales pueden ser demostrados. Los resultados de los ensayos iniciales de unión en combinación con los ensayos de unión competitivo, confirman que el ADNc de la CD80 y la CD28 de felino funcional han sido aislados, y además, que las proteínas expresadas mediante la funcionalidad del mensaje interactúen. Aunque las aplicaciones de este tipo de ensayo de unión son limitadas,

continúa siendo un sistema eficiente para demostrar la probabilidad de la expresión funcional de la superficie y la interacción.

Ejemplo 8

5 INFECCIÓN.

INTRODUCCIÓN

Los virus Lwoff definidos como "entidades estrictamente intracelulares y potencialmente patógenas con una fase infecciosa y 1) que poseen solamente un tipo de ácido nucleico, 2) que se multiplican en la forma de su material genético, 3) que no tienen la capacidad de crecer y de pasar por la fisión binaria, y 4) están desprovistas de un sistema Lippmann" (Lwoff, 1957). Los virus no son de naturaleza celular, cuyo genoma, ya sea ARN o ADN, dirige la síntesis de las partículas vírales adicionales por medio de una célula huésped infectada (Luria y Darnell, 1968). Las enfermedades virales representan un sistema interesante, en el cual puede ser demostradas las aplicaciones prácticas del complejo de señalización B7/CD28. Entre los retrovirus, la infección con el VIH en los humanos, y el virus de inmunodeficiencia felina (VIF) en los gatos, resulta en la destrucción de la función inmunológica normal, la cual existe la hipótesis de que ocurre a través de la eliminación de las células T CD4⁺ (Fauci y asociados, 1984; Pedersen y asociados, 1987). Se considera que el complejo de señalización CD28/CD80 juega un papel en la enfermedad, y que la manipulación de la expresión del receptor puede exacerbar la infección (Harlan y asociados, 1995).

El VIF, es un problema clínico muy real en los gatos domésticos, que causa una serie de manifestaciones clínicas y subclínicas que son cercanamente parecidas a las de la infección del VIH en los seres humanos (Pedersen y asociados, 1987). Conforme se acumula más información acerca del VIF, lo apropiado de esta información a un modelo animal para el SIDA humano, se está volviendo cada vez más evidente y que no es el modelo de primate que imitó de manera más cercana el progreso de la enfermedad en los humanos (Pedersen y asociados, 1987). Las similitudes moleculares, biológicas y patógenas, también sugieren que mucha de la información obtenida en los estudios del VIH, puede acelerar la comprensión de la infección del VIF en los gatos.

Inicialmente, la infección de VIH se manifiesta por medio de una linfopenia transiente con el desarrollo similar al síndrome de la mononucleosis, durante el tiempo de la seroconversión (Clark y asociados, 1991). Existe una disminución en la

población de células T CD4⁺ y las células T CD8⁺ a corto plazo, que da como resultado una disminución inicial de las proporciones CD4:CD8 que puede contribuir a una disminución adicional durante la fase asintomática de la enfermedad (Cooper y asociados, 1984). Por medio de la presentación de los síntomas relacionados con el SIDA, la población de las células T CD4⁺ disminuye de una manera seria, y conforme progresa la enfermedad hasta su fase terminal, la población completa de linfocitos es disminuida de una manera drástica (Fauci y asociados, 1984). Aunque la linfocitopenia inicial es ocasionada probablemente por los cambios inducidos por los corticosteroides en la población de células inmunológicas, tal y como se ve en otras enfermedades vírales, se considera que la pérdida adicional de células T CD4⁺, y la expansión de células T CD8⁺ está relacionada con la producción viral y con la patogénesis (Fauci y Dale, 1975; Fauci y asociados, 1984). El desarrollo de sistemas modelo apropiados es un paso crítico en los mecanismos adicionales de elucidación de la infección y de la enfermedad inducida viralmente.

El VIF, un retrovirus linfotrópico T, fue descrito originalmente en una colonia de gatos de California en la cual ocurrieron infecciones crónicas múltiples frecuentemente (Pedersen y asociados, 1987). Aunque la enfermedad se manifiesta en sí misma de una manera similar al VIH en los humanos, y está relacionada taxonómicamente distante, es antigénicamente distinta del agente causante del SIDA en los humanos (Siebelink y asociados, 1990). La transmisión de la infección ocurre a través del intercambio de fluidos corporales infectados como con el VIH, pero a diferencia del VIH en la cual la transmisión sexual es la ruta principal de infección, parece ser que con el VIF la mayoría de las infecciones ocurren por medio de la transmisión por medio de la saliva, a través de las mordidas (Yamamoto y asociados, 1989). A pesar de las diferencias en la transmisión, el síndrome de inmunodeficiencia resultante es uno de los mejores modelos de las enfermedades relacionadas en los humanos (Siebelink y asociados, 1990).

El progreso clínico del VIF es similar al del VIH, siendo la enfermedad subdividida en cinco etapas clínicas. La etapa inicial se caracteriza por fiebre, malestar y linfadenopatía, y sigue una fase larga asintomática a la infección y precede a la presentación de las tres etapas finales en las cuales ocurre la pérdida de peso, y las infecciones oportunistas y secundarias múltiples (English y asociados, 1994). Aunque no es claro si la ruta de la infección celular es la misma, el VIF es trópico para las células T CD4⁺ así como las células T CD8⁺ (Brown y asociados, 1991). Los animales infectados viralmente experimentan una disminución en la actividad de la

célula T CD4⁺ tal vez debido a la formación sincia de la lisis de las células (Siebelink y asociados, 1990). La presentación de la etapa final de la infección coincide con una pérdida significativa de células T CD4⁺ y una disminución en la proporción de CD4:CD8 (Novotney y asociados, 1990). Aunque el VIH y la enfermedad inducida del
5 VIH y el FIV no pueden mediar la pérdida de las células T CD4⁺ de la misma manera, el fenotipo resultante y el mal funcionamiento del sistema inmunológico, parece estar manifestado de una manera bastante similar.

Aunque es claro que la infección de las células T CD4⁺ con el VIH afecta de manera adversa el desarrollo de la respuesta inmunológica normal, el mecanismo
10 exacto de la interacción que da como resultado la inmunodeficiencia no ha sido definido de una manera concluyente. En las últimas etapas de la infección, los eventos resultantes en la reducción de las células T CD4⁺ no está definido (Connor y asociados, 1993). Mientras que el desarrollo de la sincia, la inducción de la apoptósis, y la eliminación por medio del CTL, todos han demostrado que reducen las
15 poblaciones de células T en las infecciones de VIH (Schattner y Laurence, 1994; Fouchier y asociados, 1996), un mecanismo mediado por la CD28, también ha sido propuesto (Haffar y asociados, 1995). Las líneas de células T infectadas se ha demostrado que regulan de manera descendente la expresión de la CD28 en ambas las proteínas, y el nivel de ARNm en la estimulación alo-antígeno (Haffar y asociados,
20 1995). Como se explicó anteriormente, los unes cruzados CD28 son una señal crítica de la maduración de una respuesta de las células T (Linsley y asociados, 1991 a). Si la infección de VIH da como resultado una regulación descendente de la expresión de la superficie de la CD28, entonces las células T infectadas que reconocen el antígeno presentado pueden convertirse en apópticas, en vez de ser activadas completamente
25 (Schattner y Laurence, 1994). Mientras la apoptósis es un mecanismo normal de la muerte de las células infectadas por el VIH, esta trayectoria puede ser un contribuyente adicional para la eliminación concomitante de las células T (Brinchmann y asociados, 1994).

El CTL de las CD8⁺ ha sido relacionado con el desarrollo de la supervivencia
30 a largo plazo de la infección del VIH, con niveles altos de CTL asociados con la no-progresión a largo plazo de los individuos infectados por SIDA (Landay y asociados, 1994). En contraste, la inmunidad humoral solamente ha sido ineficaz generalmente en el control de la enfermedad lentiviral asociada, ha mostrado que los anticuerpos pueden aumentar realmente la enfermedad (Lombardi y asociados, 1994; Siebelink y
35 asociados, 1995). La presentación de la etapa clínica final de la infección del VIH y la

inmunodeficiencia concomitante están correlacionadas con el cambio de una respuesta celular del tipo 1 a una respuesta humoral del tipo 2 en muchos pacientes (Schattner y Laurence, 1994). Esto coincide con las observaciones de que el progreso de una condición saludable al desarrollo del SIDA está relacionada con una
5 disminución de la actividad antiviral del CD8⁺ mediada por el CTL (Lewis y asociados, 1994). La expresión del CD28 en el CTL del CD8⁺ también parece estar relacionada con una actividad antiviral fuerte mediada por el CTL asociada con la expresión de las poblaciones CD28 en el CD8 dentro de los individuos infectados (Landay y asociados, 1993).

10 La expresión de superficie de la CD28, aunque se ha propuesto como un mediador que requiere la resistencia para promover el VIH, es afectado de manera adversa, por la presencia del VIH tanto en las células T infectadas como en las no infectadas (Caruso y asociados, 1994). En el principio de las etapas asintomáticas de una infección de VIH, se detecta una reducción en el porcentaje de células T CD28
15 portadoras del CD4⁺ y el CD8⁺ (Lewis y asociados, 1994). Se propone que esto puede ser responsable de las anomalías en los patrones de secreción de citoquina vistos al principio de la infección (Caruso y asociados, 1994) así como a la respuesta de las células T CD8⁺ alteradas en las etapas finales (Zanussi y asociados, 1996). En las personas infectadas con VIH, se propone que la reducción en la proliferación de las
20 células T CD8⁺ en la etapa inicial de la infección, está relacionada con la regulación descendente de la CD28 ya que solamente proliferan las células T CD8⁺ que expresan la CD28 en respuesta a la IL-2 (Brinchmann y asociados, 1994). Desafortunadamente, en las personas infectadas, las células T CD28, las CD8⁺ pueden constituir tanto como el 75% de la población de CD8⁺ mientras que en los individuos normales, ellas forman
25 solamente el 25% de la población (Saukkonen y asociados, 1993). Por lo tanto, mientras que las poblaciones de CD8⁺ pueden permanecer normales en las personas infectadas, la efectividad de esta población en su capacidad para montar una respuesta inmunológica antiviral efectiva, puede ser afectada de manera adversa, aún en la fase inicial de la infección (Caruso y asociados, 1994).

30 Los estudios también han demostrado que la transducción de señal de la CD28 puede estar involucrada en la actividad del virus (Asjo y asociados, 1993; Smithgall y asociados, 1995). La coestimulación de las células T CD4⁺ sanguíneas periféricas infectadas con VIH con el anti-CD3 y el anti-CD28 da como resultado una replicación viral más alta que con la estimulación con el anti-CD3 solo (Smithgall y
35 asociados, 1995). Esta respuesta puede ser ablada mediante la adición de CTLA-4 Ig

como una forma soluble del receptor CD80, y a un grado menor por el anti-IL-2 (Smithgall y asociados, 1995). En otros estudios con linfocitos T CD4⁺ infectados, en un 40% de los pacientes se demostró que la ligación de la CD28 sola, dio como resultado una regulación ascendente en la producción del virus, sin que se requiriera un estímulo adicional (Asjo y asociado, 1993).

El tratamiento previo de la población de linfocitos con la glicoproteína de la superficie VIH gp120 da como resultado la regulación descendente de la CD80 en la superficie de la APC (Chirmule, 1995). Aunque la expresión de la CD28 en las células T parece ser regulada de manera descendente por la infección del VIH, la expresión CD80 es regulada de manera ascendente en estas células (Haffer y asociados, 1993). Este es un mecanismo propuesto por medio del cual la infección puede ser transferida a las células T no infectadas conforme a la interacción entre la CD28 en las células T no infectadas y la CD80 en las células T infectadas puede facilitar el contacto de célula a célula que permite la transferencia del virus (Haffar y asociados, 1993).

Aunque los efectos de la CD28 en el VIH han sido explorados, el papel de la proteína de la superficie en el VIF no ha sido distinguido. Si se pueden demostrar resultados similares en los gatos, conforme son observados en el sistema humano, esto confirmaría adicionalmente la utilidad del felino como un modelo retroviral.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Infección in vivo.

Tres gatos hembra adultos específicos libres de patógenos (SPF) fueron infectados intravenosamente con 1×10^5 de TCID₅₀ de la deformación de Maryland del virus VIF. Dos hembras similares fueron infectadas de manera simulada con un suero que no contiene el virus que sirve como control. La sangre fue extraída antes de la infección y una vez cada semana durante siete semanas. En la semana inicial de la infección, las gatas fueron monitoreadas dos veces al día para asegurarse de que no existía reacción inicial proveniente de la inyección. Conforme progresó la infección, los animales fueron monitoreados en una base diaria. Cada semana durante la etapa aguda de la enfermedad clínica, se recolectaron muestras de sangre de 5 a 10 ml para la determinación del CBC y el aislamiento del PBMC. El CBC fue determinado por la cuenta de los tipos celulares en una muestra de sangre manchada por inmersión rápida (Jorgensen Lab., Loveland, CO).

El PBMC fue extractado de la sangre, mediante la separación por un gradiente de histopaquio (Sigma, St. Louis, MO). Después del lavado inicial con una

solución de Alsever, las células $\sim 5 \times 10^5$ fueron removidas y divididas en 5 pocillos de un plato con 48 recipientes. Las células se volvieron a suspender en 500 μ l de RPMI completo, y luego fueron etiquetadas con anticuerpos directamente contra, ya sea la CD4 o la CD8. Después de una hora de incubación a la temperatura ambiente, con un balanceo suave, las células fueron lavadas dos veces con PBS. Después del lavado, el anticuerpo secundario, y el IgG de cabra anti-ratón (H+L) etiquetado FITC (KP&L, Gaithersburg, MD), en una concentración de 1:500 fue agregado e incubado a la temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Luego se lavaron las células tres veces con PBS y fueron fijadas con formaldehído al 3,7%. Las poblaciones etiquetadas de manera fluorescente fueron cuantificadas en un citómetro de flujo FACSCalibur.

Los PBMC restantes se lavaron durante un tiempo adicional con 10 mL de solución Alsever. Después de la centrifugación, el flotante fue removido, y se le agregó 1 mL de ULTRASPEC (Biotexc, Houston, TX) para la extracción del ARN. El ARN fue purificado y precipitado como se describió anteriormente. Luego, la concentración fue cuantificada mediante la medición de la absorbencia en 260 nm en un espectrofotómetro. El ARN se volvió a suspender posteriormente en 50 μ l de DEPC tratado con agua y congelado a una temperatura de -70°C para un uso posterior.

RT-PCR semi-cuantitativo

Antes de la amplificación del PCR de la muestra de ARN, se recolectaron 60 mL de sangre de un gato desangrado de manera terminal. El PBMC fue aislado tal y como se describió anteriormente. Las células fueron contadas en un hemacitómetro y divididas en 4 matraces en una concentración de 5×10^5 células por mL. Las células fueron estimuladas con Con A durante 0, 8, 16 y 24 horas antes de la centrifugación y extracción del ARN de la píldora celular con ULTRASPEC tal y como se describió anteriormente. El RT-PCR fue revisado utilizando 1,5 μ g de ARN transcrito al ADNc con transcriptasa inversa MMLV y un cebador 3' oligo dT. El ARN, el cebador dT y dH_2O tratado con DEPC fueron incubados durante 5 minutos a una temperatura de 70°C para remover la estructura secundaria del ARN y permitir el cocido del cebador. El regulador de transcripción, MgCl_2 , dNTP, y DTT fueron agregados después y la mezcla fue incubada durante 2 minutos a una temperatura de 42°C . Luego se le agregó un μ l de transcriptasa inversa y se permitió que la reacción procediera durante 30 minutos. Luego se le agregaron cuatro μ l de la reacción de las 25 μ l de RT a cada

uno de los tres tubos para la amplificación del CD80 y tres tubos para la amplificación del CD28.

Luego se le agregaron a la mezcla el regulador PCR 10X, dNTP y los cebadores específicos CD28 o CD80 al ADNc. Los cebadores de CD80 fueron:

5 Cebador 5' B7-S220: CAT GTC TGG CAA AGT ACA AG

(NO. ID SEC: 74)

Cebador 3' B7-284: TTA TAC TAG GGA CAG GGA AG

(NO. ID SEC: 75)

mientras que los cebadores usados para el CD28 fueron:

10 Inicio 5' CD28: CGC GGA TCC ACC GGT AGC ACA ATG ATC CTC AGG

(NO. ID SEC: 13)

3' CD28-239: ATT TTG CAG AAG TAA ATA TCC

(NO. ID SEC: 73)

Los tres tubos de cada producto fueron incubados posteriormente a una
 15 temperatura de 95°C durante 5 minutos y después se les agregaron 0,25 µl de polimerasa Taq en 10 µl de agua a cada tubo. Las reacciones fueron sometidas a los ciclos de los perfiles siguientes de temperatura: 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, y 72°C 30 segundos. Un tubo fue removido en 20, 25 y 30 ciclos respectivamente. Se visualizaron veinte µl de cada reacción en un gel de agarosa al
 20 1%. El gel de agarosa fue fotografiado y se determinó el número de ciclos en los cuales apareció el producto. Después de estos experimentos preliminares, el ARN extractado anteriormente del animal infectado y el de control fueron amplificados de un modo similar.

25 **Infección *in vitro***

Las líneas de células T infectadas con VIF *in vitro* fueron estimuladas durante Con A para 0, y 16 horas, y la expresión de la CD28 y CD80 fueron ensayadas mediante el procedimiento RT-PCR semi-cuantitativo. La línea celular FETJ es una población de linfocitos T mezclada que crece en la ausencia de la IL-2 en el medio de
 30 cultivo. Las subpoblaciones independientes de estas células han sido expuestas a la deformación Maryland y la deformación Petaluma del virus VIF. Se estimularon aproximadamente veinte millones de células infectadas con Petaluma e infectadas con FETJ de Maryland durante 0 y 16 horas con 8 µg/mL de Con A. El ARN fue extractado de estas células después de la incubación con el reactivo para extracción de ARN

ULTRASPEC (Biotexc, Houston, TX) y fueron purificadas tal y como se describió anteriormente.

La MCH 5.4 es una línea celular T derivada de un gato en una colonia que tuvo infecciones de VIF múltiples, aunque esta línea no está infectada crónicamente con el VIF. Se hicieron píldoras de aproximadamente veinte millones de células MCH por medio de centrifugación, y se volvieron a suspender en 5 mL de un flotante concentrado de células de VIF infectadas. Las células fueron incubadas en esta concentración durante 30 minutos en un incubador de CO₂ del 5% a una temperatura de 37°C antes de ajustarlas a una concentración de $\sim 5 \times 10^5$ y cultivados durante 24 horas. Después de que se estimularon las células normales y las células MCH 5.4 infectadas durante 0 y 16 horas con 8 µg/mL de Con A. El ARN fue extractado con el reactivo de extracción de ARN ULTRASPEC (Biotexc, Houston, TX) y fueron purificadas tal y como se describió anteriormente.

15 **Transferencia de tipo northern**

Para la transferencia de tipo northern, las concentraciones de ARN fueron determinadas por medio de un análisis espectrofotométrico en 260 nm. Se concentraron quince µg de cada muestra de ARN a 3 µg/µl y se volvieron a suspender en 3 volúmenes del regulador de carga de la muestra. Las muestras fueron calentadas entonces a una temperatura de 70°C durante 15 minutos para desnaturalizar el ARN, y remover la estructura secundaria. Las muestras, en un volumen de 20 µl, fueron cargadas sobre gel desde agarosa desnaturalizada al 1% y luego sometidas a electroforesis en 70 voltios durante 2,5 horas hasta que se alcanzó el frente de tinte azul de bromofenol dentro de 2 centímetros del fondo del gel. El ARN entonces fue transferido del gel a una membrana de nylon Genescreen (Dupont, NEN, Boston, MA) mediante la acción capilar descendente. El ARN fue unido cruzado con rayos UV sobre la membrana mediante la exposición a la luz UV de baja intensidad durante 3 minutos y luego las bandas fueron visualizados para ver la integridad de las bandas de ribosoma de las sombras de UV.

Una muestra felina específica de CD28 fue construida utilizando la etiquetación de ADNc preparada aleatoriamente. Se cortó una molécula CD28 de longitud total del vector de clonación TA utilizando los sitios de flanqueo EcoRI. El fragmento fue purificado por electroforesis de gel y extractado de la agarosa con un nebulizador de gel Amicon (Amicon, Beverly, MA). 25 ng del producto purificado fue incubado con decámeros aleatorios durante 5 minutos a una temperatura de 95°C

para remover la estructura secundaria (Ambion, Austin, TX). Luego la reacción fue enfriada rápidamente en nitrógeno líquido, y el dNTP carente de dATP y se le agregaron a la mezcla P^{32} adATP. Después de 1 minuto de incubación a una temperatura de 37°C, se agregó 1 µl de polimerasa de ADN Klenow, y la mezcla fue incubada durante 30 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 1 µl de 0,5 M EDTA, y fue purificada subsecuentemente en una columna giratoria de Sephadex G-50 (Sigma, St. Louis, MO) para remover el nucléotido radio-etiquetado no incorporado. 1 µl de la reacción fue diluida en 1 mL de fluido de centelleo y la actividad de la muestra fue determinada en un contador de centelleo. Las manchas fueron prehibridadas durante 15 minutos a una temperatura de 65°C en 5 mL de un fluido de hibridación Rapid Hyb (Amersham Life Science, Cleveland, OH). Cinco µl de la muestra, en una concentración de $3\text{-}5 \times 10^6$ cpm/µl, fue agregada a cada mancha, y fue incubada con rotación durante 1,5 horas a una temperatura de 65°C. La muestra fue removida, y las manchas lavadas dos veces en una solución del 1% de SSC/0.1% SDS a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las muestras fueron exploradas entonces con un contador Geiger y se volvieron a lavar si fue necesario a una temperatura de 65°C. La etiquetación fue cuantificada en un aparato de exploración Betagen. Se realizó un lavado final a una temperatura de 65°C durante 15 minutos, y la mancha colocada en la película para 16-24 horas a una temperatura de -70°C con un colador intensificador. Se desarrolló la autorradiografía, y las bandas fueron cuantificadas por medio de densitometría. La integridad del ARN y la concentración fueron confirmadas con una muestra específica G3PDH (proporcionada amablemente por el Prof. J. Piedrahita, Texas A&M University), etiquetadas e hibridadas de manera similar.

RT-PCR semi-cuantitativo a partir de células infectadas *in vitro*

La presencia del CD28 fue medida adicionalmente por el PCR semi-cuantitativo. Tal y como se describió anteriormente, la concentración de ARN extractada fue estimada por medio de lecturas espectrofotométricas en 260 nm. Se transcribieron dos µg de ARN (25 µl volumen final) al ADNc utilizando un cebador oligo dT y transcriptasa inversa MMLV tal y como se describió anteriormente. Tres y media µl de la reacción de RT fueron transferidas entonces a siete tubos PCR. Tres tubos fueron amplificados utilizando cebadores específicos de CD80, tres tubos fueron amplificados utilizando cebadores específicos de CD28 y el tubo restante fue amplificado con cebadores específicos de G3PDH:

G3PDH 5': CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T

(NO. ID SEC: 76)

G3PDH 3': CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC

(NO. ID SEC: 77)

5 Tal y como se describió anteriormente, los tubos fueron removidos en 20, 25 y 30 ciclos. Se visualizaron veinte µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1%. Además, se ensayó de una manera similar la presencia de ciertas citoquinas derivadas de célula T, a partir del ARN de las células FETJ y MCH 5.4. Los cebadores específicos para:

10

IL-2 5': CAA CCC CAA ACT CTC CAG GAT G

(NO. ID SEC: 78)

IL-2 3': GGT CAG CGT TGA GAA GAT GCT TTG

(NO. ID SEC: 79)

15 IL-4 5': TAT TAA TGG GTC TCA CCT ACC

(NO. ID SEC: 80)

IL-4 3': TTG GCT TCA TTC ACA GAA CAG

(NO. ID SEC: 81)

IFN_γ 5': GGG TCG CTT TTC GTA GAC ATT TTG

20 (NO. ID SEC: 82)

IFN_γ 3': CAG GCA GGA CAA CCA TTA TTT C

(NO. ID SEC: 83)

fueron utilizados para amplificar el ADNc transcrito de 1,25 µg de ARN. El veinte por ciento de la reacción de transcripción fue amplificada por cada citoquina. El ADNc restante fue amplificado utilizando cebadores específicos G3PDH. El ADNc fue amplificado durante 30 ciclos utilizando los siguientes parámetros: 95°C 5 minutos 1 ciclo; 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 30 segundos 30 ciclos; 72°C 5 minutos 1 ciclo. Luego se visualizaron veinte µl de la reacción en un gel de agarosa al 1%.

30

RT-PCR para determinar la infección

La infección de las células FETJ y MCH 5.4 fue confirmada a través de la amplificación RT-PCR de la secuencia gag específica. El ARN en una concentración de 1,25 µg fue transcrito al ADNc utilizando los parámetros anteriormente descritos y usando MMLV RT y un cebador gag 3' específico. Se amplificaron diez µl de la

35

reacción RT por medio de PCR de inicio caliente con los siguientes parámetros: 95°C 5 minutos; 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 30 segundos, 30 ciclos; 72°C 5 minutos. Después de la amplificación, se visualizaron 20 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1%.

5

RESULTADOS

Con el objeto de determinar los efectos de la infección aguda *in vivo* en la expresión CD28, y las AUO4, AUU3 y OAC2 de gato fueron infectadas con el virus por medio de inyección intravenosa, mientras que las AWG3 y OAE6 de gato fueron inyectadas solamente con medio. El análisis FACS mostró algunas diferencias entre las proporciones de CD4:CD8 con los animales experimentales y los de control. Mientras los animales de control mantenidos generalmente en una proporción casi constante de alrededor de dos a uno, existieron algunas fluctuaciones en el grupo experimental con la inmersión de la proporción tan baja como de uno a uno en un animal (Tabla 3).

15

Tabla 3: Proporciones de linfocito T CD4:CD8 a partir de PBMC extraído de gatos infectados agudamente y no infectados.

20

CD4:CD8	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 8
Infectado							
AUO 4	4.5	N/D	1.9	1.2	1.0	1.5	1.6
AUU 3	N/D	2.3	2.9	1.3	1.2	1.1	2.1
OAC 2	2.8	1.48	2.3	1.9	1.1	1.14	1.1
No infectado							
AWG 3	2.6	1.5	1.9	2.0	1.8	1.9	2.2
OAE 6	2.1	1.5	1.9	1.2	1.8	2.0	2.0

25

30

Se realizó la prueba del curso del tiempo de la expresión de ARN CD80 y CD28 para demostrar que el mensaje para cada molécula estaba presente y que podría ser amplificado por medio de los PCR en los puntos de tiempo de 0, 8, 16 y 24 horas después de la estimulación mediante Con A. Este procedimiento de PCR semi-cuantitativo, observó para detectar una banda visible en el número inferior de los ciclos de amplificación la cual se pudiera deducir como una medida relativa de la abundancia

35

del mensaje. No se apreció un CD80 específico definitivo en un intervalo de 20 a 25 ciclos en ningún momento posterior a la infección, por lo que el mensaje del CD80 fue visible en el gel en los 30 ciclos en cada uno de los grupos experimentales. El mensaje del CD28 también fue visible en cada punto de tiempo en los 30 ciclos, por lo que el punto de tiempo de 16 horas tuvo una banda ligeramente visible en 25 ciclos. Se empleó un protocolo similar con el ARN extractado de las PBMC de los gatos infectados con VIF y los no infectados. La amplificación RT-PCR del ARN específico de CD28 y CD80 fue utilizada para demostrar una idea relativa de la cantidad del mensaje transcrito por cada péptido. Tal y como se realizó anteriormente en los experimentos de curso de tiempo, las muestras fueron removidas en 20, 25 y 30 ciclos. No pudo ser detectado mensaje alguno después de 20 ciclos, aunque ambos productos CD80 y CD28 fueron visibles en 25 ciclos (Tabla 4). No existieron diferencias demostrables en la expresión de cualquiera de los mensajes entre los grupos experimentales y de control. Ambos sub-conjuntos tuvieron fluctuaciones en cuanto al punto del ciclo de amplificación en el que ese producto fue visible.

Tabla 4: Determinación semi-cuantitativa de productos RT-PCR de CD80 y CD28 amplificados a partir de ARN PBMC infectado y no infectado en intervalos durante la etapa aguda de una infección VIF.

CICLO No.	ANTES INFECCIÓN	SEMANA 1	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 6	SEMANA 8
B/C						
INFECTADO	30 / 30	30 / 30	30 / 30	- / 25	30 / 25	25 / 25
AUO 4	30 / 30	30 / 30	25 / 25	- / 25	30 / 25	- / 30
AUU 3	30 / 30	30 / 30	30 / 30	- / 30	25 / 30	25 / 25
OAC 2						
NO INFECTADO						
AWG 3	25 / 30	30 / 30	30 / 25	- / 30	30 / 25	25 / 25
OAE 6	30 / 30	- / 30	- / 30	- / 25	30 / 30	25 / 25

La amplificación PCR del ARNm de las células FETJ y MCH 5.4, utilizando cebadores de VIF gag específicos demostró que la línea celular MCH 5.4 se pudo infectar, y transportó una infección activa mientras que las líneas celulares FETJ no produjo ARN gag específico amplificado. El producto VIF específico fue fácilmente amplificable a partir del ARN extractado de las muestras de MCH 5.4 infectadas aunque no de las del ARN extractado de manera similar de los controles no infectados

(Figura 44). Se llevaron a cabo reacciones similares en el ARN extractado de las líneas de células FETJ expuestas a las deformaciones Petaluma y Maryland del VIF que no tuvieron producto visible bajo condiciones similares (datos no mostrados).

Se llevaron a cabo los ensayos de inmunotransferencia de tipo northern y PCR semi-cuantitativo para detectar los mensajes de la CD28 en líneas celulares FETJ y MCH 5.4 normales. La línea celular MCH 5.4 tuvo un grupo experimental infectado y un grupo de control no infectado, mientras que la línea celular FETJ fue utilizada como un control de célula T no permisible.

El PCR semi-cuantitativo demostró que cada línea celular tenía la capacidad de producir un mensaje de la CD28. La amplificación en las células FETJ de control no infectadas demostró un patrón de expresión similar al que se vió en la prueba del curso del tiempo para el CD28 explicado anteriormente. Aunque en un período de 0 horas posteriores a la estimulación, no fue visible una banda hasta después de 30 ciclos, a las 16 horas posteriores a la estimulación, la banda fue visible después de 25 ciclos. Un patrón similar fue observado en la línea de células MCH 5.4 no infectadas sin bandas visibles antes de los 30 ciclos en 0 horas y bandas visibles después de los 25 ciclos después de 16 horas de incubación. Resulta interesante, que las líneas de células MCH 5.4 infectadas demostraron un patrón diferente al de cada uno de los controles. En el grupo experimental, el mensaje no fue visible ni en 0 ni en 16 horas hasta los 30 ciclos. El mensaje G3PDH fue amplificado como un control para asegurar la integridad y la concentración del ARN. La infección pareció influir la expresión del mensaje ARN del CD28.

Un análisis de inmunotransferencia de tipo northern fue utilizado para confirmar los datos descubiertos utilizando las técnicas RT-PCR semi-cuantitativas. El ARN de las 16 horas de las células MCH 5.4 estimuladas mediante Con A que no estaban infectadas demostraron la hibridación de la muestra más fuerte. Las muestras no estimuladas de la línea no infectada tuvo un rango mayor de hibridación que el ARN de cualquiera de las líneas celulares MCH 5.4 estimuladas o no estimuladas.

Además de las autorradiografías, la radioactividad fue medida en el BetaGen. Los recuentos simples de la hibridación del CD28 fueron estandarizados con los recuentos obtenidos a partir de una muestra GAPDH subsecuente de la mancha (Figura 48) (Tabla 5).

Tabla 5: Recuentos normalizados para la técnica de inmunotransferencia tipo northern del CD28 del BetaGen.

5

	G3PDH	CD28	CD28 norm.
MCH 5.4 nor	14995	14921	14807
MCH 5.4 Con A	13336	13270	15430
MCH 5.4 inf	16700	10854	9867
MCH 5.4I Con A	15112	11077	10967

10 La amplificación RT-PCR del ARN de citoquina de las líneas celulares MCH 5.4 mostraron un mensaje que se podría amplificar solamente para la IL-2. Ni la IL-4, IL-6 o IFN_γ pudieron ser amplificados con 30 ciclos, por lo que el mensaje IL-2 fue fácilmente detectable.

EXPLICACIÓN

15 El mensaje del CD28 fue medido en la infección *in vivo* e *in vitro* para determinar que la expresión de la CD28 podría ser ensayada, y si la infección era con el retrovirus alteraban las expresiones del mensaje. Cuando el ARN suficiente pudo ser recuperado, el mensaje CD28 fue medido por medio de inmunotransferencia de tipo northern y por un ensayo RT-PCR semi-cuantitativo cuando la recuperación fue
20 limitada.

Después de los experimentos *in vivo*, la infección de tres animales con deformaciones Maryland de VIF, tal y como se explicó anteriormente, fueron sometidos a la amplificación del mensaje CD28 y CD80 específico del ARN extractado de las células PBMC de aislados de sangre de estos animales infectados y de los
25 controles no infectados. Aunque la determinación por medio del manchado del Norte hubiera sido preferible, se empleó el RT-PCR semi-cuantitativo debido a las limitaciones en el número de células y a la cantidad de ARN disponible. Se hicieron sangrar a los gatos en intervalos semanales, por lo que un máximo de 10mL de sangre estuvo disponible para cada experimento.

30 El análisis FACS de las proporciones CD4 / CD8 de la PBMC de animales infectados disminuyó en un período de 8 semanas tal y como se comparó con los animales no infectados, en los cuales las proporciones permanecieron relativamente constantes. Existen diferencias entre los dos grupos experimentales. Aunque las proporciones de CD4/CD8 parecen diferir en los animales infectados contra los

animales no infectados, no fueron detectables diferencias reales en la expresión de CBC o CD80 y CD28 (datos no mostrados).

Con el objeto de determinar de manera óptima la expresión del CD28 se requirieron células T puras. Del PBMC aislado, en un promedio, tal vez el 40% de las células fueron de hecho células T. De estas células, en algunos momentos hasta la mitad, serían células T CD8⁺ las cuales no expresan el CD28 en la misma concentración que las células T CD4⁺. Esto, en conjunto con el hecho de que en otras especies, la CD28 no expresada en niveles altos haciendo reposar las células T (los cuales constituyen la mayoría de las células T en circulación) condujo a la decisión de emplear la determinación PCR en vez de la inmunotransferencia de tipo northern. Los experimentos preliminares intentando detectar el mensaje CD28 de 20 µg de ARN extractado de PBMC no tuvieron éxito. La reacción RT-PCR semi-cuantitativa detecta la presencia del ARN codificador del CD28. Esta técnica también fue usada para amplificar el mensaje específico para la CD80.

Las líneas celulares *in vitro* proporcionaron ARN del cual el mensaje CD28 fue detectado por la técnica de inmunotransferencia de tipo northern. Se seleccionó la MCH 5.4 debido a que, como línea de células T, todas las células expresan potencialmente el mensaje CD28, y una línea derivada había sido utilizada anteriormente como un puente para la infección viral próxima. Un beneficio final, fue que como una línea celular, hubo un recipiente de ARN disponible mayor que el de los linfocitos de la sangre extractada de un sólo animal.

También se hicieron intentos para detectar el mensaje del CD80 por medio de inmunotransferencia de tipo northern. Aunque la CD80 está presente en una concentración inferior en las células B en reposo, y los monocitos, los niveles más altos de expresión se encontraron en los monocitos y macrófagos estimulados. Un antígeno felino que presenta líneas celulares no estuvo disponible, y normalmente las células T solamente expresan el péptido en niveles bajos. Los experimentos para detectar el mensaje específico del CD80 a partir del ARN extractado de la PBMC no tuvieron éxito probablemente por razones similares a las explicadas con el CD28. Alternativamente, se empleó el PCR semi-cuantitativo con células derivadas de animales infectados para demostrar el mensaje de la CD80 y CD28. Aunque no se obtuvo una respuesta definitiva con respecto a la cantidad de mensaje, este ensayo no demuestra que haya un mensaje presente y un despliegue relativo de abundancia.

El análisis de inmunotransferencia de tipo northern del mensaje CD28 de la línea celular T felina tuvo éxito. Cuando el mensaje para el CD28 fue comparado en

las células infectadas y no infectadas, existieron diferencias en los patrones de expresión. El mensaje CD28 fue más abundante en las células no infectadas expuestas al Con A durante 16 horas. El mensaje también fue detectado en las células no estimuladas y no infectadas. Mientras el mensaje se pudo detectar en el

5 ARN de las células infectadas con VIF estimuladas y no estimuladas, los niveles fueron marcadamente inferiores que los de las células no infectadas. Estos datos se correlacionan bien con descubrimientos similares encontrados utilizando la técnica de detección RT-PCR.

La capacidad para detectar el mensaje de la CD28 no está obstaculizada por

10 las mismas limitaciones encontradas con la molécula CD80. Sin embargo, si se puede aislar una población grande de células con expresión del CD80, sería ciertamente posible detectar el mensaje a través de la inmunotransferencia de tipo northern. Cuando los anticuerpos monoclonales específicos del péptido son desarrollados para estas proteínas de superficie, sería interesante correlacionar los niveles del mensaje

15 con la cantidad de expresión de la superficie para cada péptido.

El ADNc de la citoquina fue amplificado para asegurar que no hubiera diferencia en las líneas infectadas y no infectadas. El IL-2 de cada grupo fue amplificado independientemente de la condición de infección. No se amplificaron otros mensajes de citoquina.

La inmunotransferencia de tipo northern indica que la expresión CD28 en el nivel ARNm es regulada de manera descendente *in vitro* por la presencia del VIF. Aunque este descubrimiento debe de ser confirmado mediante la medición de la expresión de superficie de la proteína, parece que la infección VIF *in vitro*, puede influenciar la expresión de la CD28 tal como se ha demostrado en las células T

20 humanas infectadas con VIH (Brinchmann y asociados, 1994).

25

CONCLUSION

La clonación y elaboración de secuencias de ADNc codificador del complejo de señalización CD28 y CD80 del sistema felino, rindió productos análogos al de las

30 moléculas aisladas por otros sistemas. Aunque la secuencia putativa de amino ácidos de la proteína felina demostró una identidad relativamente baja con los polipéptidos humanos y de ratón murine, las comparaciones de la homología entre moléculas anteriormente clonadas, la retención de los residuos de las características, y el hecho de que no se considera que el ligando de la superficie tenga una función de

35 señalización, nos llevó a la conclusión de que, en efecto, el producto aislado fue un

análogo felino del CD80. En contraste, la molécula felina CD28 retuvo una identidad moderada, tanto en el ácido nucleico, como en los niveles putativos de amino ácidos y fue análogo a las moléculas clonadas en otras especies.

5 La naturaleza de las moléculas fue identificada adicionalmente por medio de la interacción que demuestran los ensayos de *une*. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas análogas en otra especie, no podrían reaccionar con las proteínas felinas expresadas. Por lo que se diseñó un conjunto de ensayos de unión para demostrar que ocurrió la interacción, y que dicha interacción se pudo inhibir por medio del receptor soluble. En estos ensayos, el *une* fue demostrado por medio de la
10 retención de las células etiquetadas de manera fluorescente, las cuales se pudieron inhibir por la introducción de receptores-contadores solubles. Este ensayo demostró, no solamente que la proteína para las CD80 y CD28 felinas podrían ser expresadas, sino también que las moléculas de la superficie pudieron interactuar.

La expresión de las moléculas en una infección activa también fue
15 caracterizadas. La expresión de la CD28 y CD80 fueron ensayadas en sistemas *in vivo* e *in vitro* expuestos al virus del VIF. La expresión de la CD28, la cual se ha mostrado que es alterada en las células humanas infectadas con el virus del VIH (Asjo y asociados, 1993) también fue afectada de manera adversa por la infección VIF de las células T felinas. La información adicional con respecto a la expresión de cada una
20 de estas moléculas en la progresión de la enfermedad, debe de continuar para establecer el sistema felino como un modelo importante de infección retroviral.

Las aplicaciones a largo plazo de estas moléculas son potencialmente vastas. Una comprensión de los sistemas inmunológicos divergentes evolucionalmente de los sistemas humanos, solamente pueden conducir a un entendimiento más amplio de la
25 forma en que funcionan los sistemas en el hombre. Además, la importancia de la especie felina como modelo en la infección retroviral está establecida de una manera clara (Siebelink y asociados, 1990). La CD80 se ha propuesto como un adyuvante potencial para inducir la CTL de la memoria en las vacunas anti-retrovirales. El sistema felino sería un modelo excepcional en el cual probar la eficacia de este sistema.

REFERENCIAS

- Azuma, M., et al., *J. Immunology* 149, 1115-1123 (1992).
- Azuma, M., et al., *Nature* 366, 76-79 (1993).
- Chambers, et al., *Current Opinion in Immunology* 9, 396-404. (1997)
- Chen, et al., *J. Immunology* 148, 2617-2621 (1992).
- Chen, et al., *Cell* 71, 1093-1102 (1992).
- Donnelly JJ, et al., *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 617-648
- Freeman, et al., *J. Immunology* 143 2714-2722 (1989).
- Freeman, et al., *J. Exp. Med.* 174, 625-631 (1991).
- Gimmi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6575-6579 (1991).
- Hathcock, et al., *J. of Exp. Med.* 180, 631-640 (1994)
- Hassett and Whitton, *Trends Microbiol* 1996; 4: 307-312.)
- Linsley, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5031-5035 (1990).
- Jenkins, et al., *J. Immunology* 147, 2461-2466 (1991).
- Riley, et al., *J. Immunology* 158, 5545-5553 (1997).
- Tsuji, et al., *Eur J Immunology* 27(3), 782-787 (1997).
- PCT International Application WO 92/00092, Bristol Myers Squibb.
- PCT International Application WO 92/15671, Cytomed, Inc. 17 September 1992.
- PCT International Application WO 93/00431, Bristol Myers Squibb, 7 January 1993.
- Akeson, A.L. and Woods, C.W. (1993). A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J. Immunol. Meth.* 163, 181-185.
- Allison, J.P., and Lanier L. (1987). The structure, serology, and function of the T-cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 5, 503-540.
- Allison, J.P. (1994). CD28-B7 interaction in T-cell activation, *Current Opinion Immunol.* 6, 414-419.
- Anderson, P., Morimoto, C., Breitmeyer, J.B., Schlossman, S.F. (1988). Regulatory interactions between members of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Today* 9, 199-203.
- Antonia, S.J., Munoz-Antonia, T., Soldevila, G., Miller, J., Flavell, R.A. (1995). B7-1 expression by a non-antigen presenting cell- derived tumor. *Can. Res.* 55, 2253-2256.
- Arima, T., Rehman, A., Hickey, W., Flye, M. (1996). Inhibition by CTLA-4Ig of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 156, 4917-4924.

- Arruffo, A. and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a COS cell expression system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84, 8573-8577.
- Asjo, B., Cefai, D., Debre, P., Dudoit, Y., Autran, B. (1993). A novel mode of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activation: ligation of CD28 alone induces HIV-1 replication in naturally infected lymphocytes. *J. Virol.* 67, 4395-4398.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1992). Involvement of CD28 in MHC unrestricted cytotoxicity mediated by a human killer leukaemic cell line. *J. Immunol.* 149, 1115-1123.
- Azuma, M., Yssel, H., Phillips, J.H., Spits, H., Lanier, L.L., (1993b) Functional expression of B7/BB1 on activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177, 845-850.
- Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1993c). Requirements for CD28-dependant T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 150, 2091-2101.
- Bajorath, J., Stenkamp, R., Aruffo, A. (1993). Knowledge based protein modeling: concepts and examples. *Prot. Sci.* 2, 1798- 1810.
- Bajorath, J., Peach, R., Linsley, P.S. (1994). Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86). *Prot. Sci.* 3, 2148-2150.
- Balazano, C., Buonavista, N., Rouvier, E., Golstein, P. (1992) CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes. *Int. J. Can. Suppl.* 7, 28-32.
- Barcy, S., Wettendorf, M., Leo, O., Urbain, J., Kruger, M., Ceuppens, J.L., de Boers, M. (1995). FcR crosslinking on monocytes results in impaired T cell stimulatory capacity. *Int. Immunol.* 7, 179-189.
- Beale, D. (1985). A comparison of the amino acid sequences of the extracellular domains of the immunoglobulin superfamily. Possible correlations between conservancy and conformation. *Comp Biochem Physiol.* 80, 181-194.
- Bellone, M., Iezzi, G., Manfredi, A.A., Protti, M.P., Dellabona, P., Casorati, G., Rugarli, C. (1994). In vitro priming of cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic epitopes by engineered antigen presenting cells. *Eur. J. Immun.* 24, 2691-2698.
- Berke, G. (1993). The functions and mechanisms of action of cytolytic lymphocytes. In "Fundamental Immunology," (W. Paul). pp. 965-1014. New York: Raven Publ. 3rd ed.
- Berke, G. (1994). The binding and lysis of target T- cells by cytotoxic lymphocytes. *Annu. Rev. of Immunol.* 12, 735-773.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M., Lindstein, T., Thompson, C.B. (1993). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xl. *Immunity* 3, 87-89.
- Brinckmann, J.E., Doblung, J.H., Heger, B.H., Haaheim, L.L., Sannes, M., Egeland, T. (1994). Expression of costimulatory molecule CD28 on T-cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: functional and clinical correlations. *J. Inf Dis.* 169, 730-738.
- Brown, W.C., Bissey, L., Logan, K.S., Pedersen, N.C., Elders, J.H., Collisson, E.W. (1991). Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8 T-lymphocytes. *J. of Virol.* 62, 3359- 3364.
- Buck, C.A. (1992). Immunoglobulin Superfamily: structure function and relationship to other receptor molecules. *Semin. Cell Biol.* 3, 179-188.
- Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J.P., Velu, T., Goldman, M. (1995). Interleukin 10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur. J.*

Immunol. 25, 2668- 2675.

Caruso, A., Cantalamessa, A., Licenziati, S., Peroni, L., Prati, E., Martinelli, F., Canaris, A.D., Folghera, S., Gorla, R., Balsari, A. (1994). Expression of CD28 on CD8+ and CD4+ lymphocytes during HIV infection. *Scan. J. Immunol.* 40, 485-490.

Cerdan, C., Martin, Y., Brailly, H., Courcoul, M., Flavetta, S., Costello, R., Mawas, C., Birg, F., Olive, D. (1991). IL-1 is produced by T lymphocytes activated via the CD2 plus CD28 pathways. *J. Immunol.* 146, 560-564.

Chen, L., Linsley, P.S., Hellstrom, K.E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol. Today* 14, 483-486.

Chesnut, R.W. and Grey, H.M. (1986). Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv. Immunol.* 39, 51-59.

Clark, S.J., Saag M.S., Decker, W.D., Campbell, H.S., Roberson, J.L., Veldkamp, P.J. (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptoms of primary HIV-1 infection. *N. Eng. J. Med.* 324, 954-960.

Clayberger, C., Lyu, S.C., DeKruyff, R., Parham, P., Krensky, A.M. (1994). Peptides corresponding to the CD8 and CD4 binding domains of HLA molecules block T-lymphocyte immune responses in vitro. *J. Immunol.* 153, 946-951.

Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., Terhorst, C. (1988). The T-cell receptor-CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 629-662.

Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y., Ho, D.D. (1993). Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+T- lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol.* 67, 1772-1777.

Cooper, D.A., Tindall, B., Wilson, E.J., Imreie, A.A., Penny, R. (1988). Characterization of T-lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J. Inf. Dis.* 157, 889-896.

Damle, N.K., Doyle, L.V., Grossmaire, L.S., Ledbetter, J.A. (1988). Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 molecule during the activation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 140, 1753-1761.

Damle, N.K., Klussman, K., Leytze, G., Myrdal, S., Arruffo, A., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S. (1994). Costimulation of lymphocytes with integrin ligands ICAM-1 or VCAM-1 induces functional expression of CTLA-4 a second receptor for B7. *J. Immunol.* 152, 2686-2697.

Davis, M.M. and Bjorkman, P.K. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.

de Boer, M., Kasran, A., Kwekkeboom, J., Walter, H., Vandenberghe, P., Ceuppens, J.L. (1993). Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T-cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 3120-3125.

deWaal Malefyt, R., Yssel, H., de Vries, J.E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* 150, 4754-4765.

Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting upregulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151, 1224-1234.

Driscoll, P.C., Cyster, J., Campbell, I., Williams, A. (1991). Structure of domain 1 of rat T-lymphocyte CD2 antigen. *Nature* 353, 762-765.

Ellis, J.H., Burden, M., Vinogradov, D., Linde, C., Crowe, J. (1996). Interactions of CD80 and CD86 with CD28 and CTLA-4. *J. Immunol.* 155, 2700-2709.

Englehard, V.H. (1994). Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Op. Immunol.* 6, 13-21.

- English, R.V., Nelson, P., Johnson, C.M., Nasisse, M., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B. (1994). Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Inf. Dis.* 170, 543-552.
- Fauci, A.S. and Dale, D.C. (1975). The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocytes. *Blood* 46, 235-243.
- Fauci, A., Macher, A., Longo, D., Lane, H., Rook, A., Masur, H., Gelmann, E. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiological, clinical, immunological and therapeutic considerations. *Ann. Int. Med.* 100, 92-106.
- Fong, T.A. and Mosmann, T.R. (1990). Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol.* 144, 1744-1752.
- Fouchier, R.A., Meyaard, L., Brouwer, M., Hovenkamp, E., Schuitemaker, H. (1996). Broader tropism and higher cytopathicity for CD4+ T-cells of syncytium-inducing compared to a non-syncytium-inducing HIV-1 isolate as a mechanism for accelerated CD4+ T cell decline in vivo. *Virology* 219, 87-95.
- Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J., Nadler, L.M. (1987). A B-cell restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol.* 139, 3260-3267.
- Freeman G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., McKnight, A.J., Kim, J., Du, L., Lombard, D.B., Gray, G.S., Nadler, L.M., Sharpe, A.H. (1993). Uncovering a functional alternative CTLA-4 counter receptor in B7-1 deficient mice. *Science* 262, 907-909.
- Gajewski, T. F., Schell, S.R., Nau, G., Fitch, F. W. (1989). Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. *Immunol Rev.* 111, 79-110.
- Germain, R.N. (1993). The Biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 403- 450.
- Haffar, O.K., Smithgall, M.D., Bradshaw, J., Brady, W., Damle, N.K., Linsley, P.S. (1993). Costimulation of T-cell activation and virus production by B7 antigen on activated CD4+ T-cells from human immunodeficiency virus type 1-infected donors. *Immunology* 90, 11094-11098.
- Harlan, D.M., Abe, R., Lee, K.P., June, C.H. (1995). Potential roles of the B7 and CD28 receptor families in autoimmunity and immune evasion. *Clin. Immunol. Immunopath.* 75, 99-111.
- Hodge, J.W., Abrami, S., Schlom, J., Kantor, J.A. (1994). Induction of antitumor immunity by recombinant vaccinia viruses expressing B7-1 or B7-2 costimulatory molecules. *Can. Res.* 54, 5552-5555.
- Hutchcroft, J.E. and Bierer, B.E. (1996). Signaling through CD28/CTLA-4 family receptors. *J. Immunol.* 155, 4071-4074.
- Jenkins, M.K., Pardoll, D.M., Mizuguchi, J., Quill, H., Schwartz, R.H. (1987). T cell responsiveness in vivo and in vitro: Fine specificity of induction and molecular characterisation of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* 95, 113-135.
- June, C.H., Ledbetter, J.H., Linsley, P.S., Thompson, C.B. (1990). Role of the CD28 molecule in T-cell activation. *Immunol. Today* 11, 211-216.
- June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M., Thompson, C.B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* 12, 321-333.
- Kozber, D., Moretta, A., Messner, H.A., Moretta, L., Croce, C.M. (1987). Tp44 molecules involved in antigen-independent T cell activation are expressed on human plasma cells. *J. Immunol.* 138, 4128-4132.
- Kupfer, A. and Singer, S.J. (1989). Cell biology of cytotoxic and helper T-cell functions. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 309-337.

Landay, A.L., Mackewicz, C.E., Levy, J.A. (1993). An activated CD8+ T cell phenotype coorelates with an anti-HIV activity and assymptomatic clinical status. *Clin Immun. Immunopath.* 69, 106-116.

Lane, P., Burdet, C., Hubele, S., Scheidegger, D., Muller, U., McConnell, F., Kosco-Vilbois, M. (1994). B cell function in mice transgenic for mCTLA4-H gamma 1: lack of germinal centers correlated with poor affinity maturation and class switching despite normal priming of CD4+ T-cells. *J Exp Med.* 179, 819-830.

Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J.H., Linsley, P.S., Okumura, K., Ito, D., Azuma, M. (1995). CD80 (B7) and CD86 (B7O) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154, 97-105.

Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Pearson, T.C., Linsley, P.S., Lowry, R.P. (1992). Functional expression of the costimulatory molecule B7/BB1 in murine dendritic cell populations. *J. Exp. Med.* 176, 1215-1220.

Leahy, D., Axel, R., Hendrickson, W. (1992). Crystal structure of a soluble form of human T cell counter receptor CD8 at 2.8 resolution. *Cell* 68, 1145-1162.

Lechler, R.I., Lombardi, G., Batchelor J.R., Reinsmoen N., Bach, F.H. (1990). The molecular basis of alloreactivity. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 83-88.

Lenschow, D.J., Su, G.H-T., Zuckermann, L.A., Nabavi, N., Jellis, C.L., Gray, G.S., Miller, J., Bluestone, J.A. (1993). Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90, 11054-11058.

Lenschow, D.J., Walunas, T.L., Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14 233- 258.

Leung, H.T. and Linsley, P.S. (1994). The CD28 costimulatory pathway. *Therap. Immunol* 1, 217-228.

Lewis, D.E., Ng Tang, D.S., Adu-Oppong, A., Schober, W., Rodgers, J. (1994). Anergy and apoptosis in CD8+ T-cells from HIV infected persons. *J. Immunol.* 153, 412-420.

Li, Y., McGowan, P., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Chen, L. (1994). Costimulation of tumor reactive CD4 and CD8 T-lymphocytes by B7 a natural ligand for CD28 can be used to treat established mouse melanoma. *J. Immunol.* 153, 421-428.

Lindsten, T., Lee, K.P., Harris, E.S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P.J., Lombard, D.B., Freeman, G.J., Nadler, L.M., Gray, G.S. (1993). Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T-cells. *J. Immunol.* 151, 3489-3499.

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., Ledbetter, J.A. (1991a). Binding of the B-cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T-cell proliferation and Interleukin-2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173, 721- 730.

Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K., Ledbetter, J. A. (1991b). CTLA-4 is a second receptor for the B-cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174, 561-569.

Linsley, P. S., Wallace, P.M., Johnson, J., Gibson, M.G., Greene, J.L., Ledbetter, J. A., Singh, C., Tepper, M.A. (1992a). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257, 792-795.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J.A., Anasetti, C., Damle, N.K. (1992b). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176, 1595-1604.

Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A. (1993a). The role of CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Ann. Rev. Immunol.* 11, 191-212.

Linsley, P.S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L., Thompson, C.B. (1993b). CD28 engagement by B7/BB-1

induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J. Immunol.* 150, 3161- 3169.

Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., Peach, R. (1994a). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA- 4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.

Linsley, P.S., Peach, R., Gladstone, P., Bajorath, J. (1994b). Extending the B7(CD80) gene family. *Prot. Sci.* 3, 1341-1343.

Linsley, P.S., Ledbetter, J., Peach, R., Bajorath, J. (1995a). CD28/CTLA-4 receptor structure, binding stoichiometry and aggregation during T cell activation. *Res. Immunol.* 146, 130- 140.

Linsley, P.S., Nadler, S.G., Bajorath, J., Peach, R., Leung, H.T., Rogers, J., Bradshaw, J., Stebbins, M., Leytze, G., Brady, W., Malacko, A.R., Marquardt, H., Shaw, S. (1995b). Binding stoichiometry of the cytotoxic T-lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA- 4). *J. Biol. Chem.* 270, 15417-15424. Littman, D.R. (1987). The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu. Rev. Immunol.* 5, 561-584.

Liu, C.C., Welsh, C.M., Young, J. D-E. (1995). Perforin: Structure and function. *Immunol. Today* 16, 194-201.

Liu, Y., Jones, B., Brady, W., Janeway, C.A., Linsley, P. (1992). Murine CD4 T cell growth: B7 and heat stable antigen both participate in co-stimulation. *Eur. J. Immunol.* 115, 1905- 1912.

Lombardi, S., Garzelli, C., Pistello, M., Massi, C., Matteucci, D., Baldinotti, F., Cammarota, G., Da Prato, L., Bandecchi, P., Tozzini, F., Bendinelli, M. (1994). A neutralizing antibody- inducing peptide of the V3 domain of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein does not induce protective immunity. *J. Virol.* 68, 8374-8379.

Lu, Y., Granelli-Piperno, A., Bjorn Dahl, J.M., Phillips, C.A., Trevillyan J.M. (1992). CD28-induced T cell activation. Evidence for a protein-tyrosine kinase signal transduction pathway. *J. Immunol.* 149, 24-29.

Luria, S.E. and Darnell, J.E. (1968). "General Virology." New York: John Wiley and Sons, Inc.

Lwoff, A. (1957). The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* 17, 239- 253.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." New York: Cold Spring Harbor Press.

Martin, P.J., Ledbetter, J.A., Morishita, Y., June, C.H., Beatty, P.J., Hansen, J.A. (1986). A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 136, 3282-3287.

Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A., Wilson, I.A. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257, 927-934.

Mescher, M.F. (1992). Surface contact requirements for activation of cytotoxic T-lymphocytes. *J. Immunol.* 49, 2402-2405.

Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Lepiatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C., Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P., Caput, D., (1993). Interleukin 13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 362, 248-250.

Moffett, C.W. and Paden, C.M. (1994). Microglia in the rat neurohypophysis increase expression of class I major histocompatibility antigens following central nervous system injury. *J. Neuroimmunol.* 50, 139-51.

Mosmann, T. and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.

Nabavi, N., Freeman, G.J., Gault, D., Godfrey, G.N., Nadler, L.M., Glimcher, L.M. (1992). Signaling through the MHC CII cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 360, 266-268.

- Nagata, S. and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1465.
- Nickloff, B.J., Mitra, R.S., Lee, K., Turka, L.A., Greem, J., Thompson, C., Shimizu, Y. (1993). Discordant expression of CD28 ligands BB-1 and B7 on keratinocytes in vitro and psoriatic cells in vivo. *Am J. Path.* 142, 1029-1040.
- Novotney, C., English, R., Housman, J., Davidson, M., Nasisse, M., Jeng, C.R. (1990). Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS* 4, 1213-1218.
- O'Doherty, U., Steinman, R.M., Peng, M., Cameron, P.U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W.J., Pope, M., Bhardwaj, N. (1993). Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned media. *J. Exp. Med.* 178, 1067-1076.
- Ozawa, H., Aiba, S., Nakagawa, S., Tagami, H. (1995). Interferon gamma and interleukin 10 inhibit antigen presentation by Langerhan's cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur. J. Immunol.* 26 648-652.
- Page, C., Thompson, C., Yacoub, M., Rose, M. (1994). Human endothelial stimulation of allogenic T-cells via a CTLA-4 independant pathway. *Trans. Immunol.* 2, 342-347.
- Peach, R., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., Linsley, P.S. (1994). CDR1 and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J. Exp. Med.* 180, 2049-2058.
- Peach, R., Bajorath, J., Naemura, J., Leytze, G., Greene, J., Aruffo, A., Linsley, P.S. (1995). Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T-cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J. Biol. Chem.* 270, 21181-21187.
- Pedersen, N.C., Ho, E., Brown, M.L., Yamamoto, J.K. (1987). Isolation of a T lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency like syndrome. *Science* 235, 790-793.
- Prasad, K.V., Cai Y.C., Raab, M., Duckworth, B., Cantley, L., Shoelson, S.E., Rudd, C.E. (1994). T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase Phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 2834-2838.
- Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B., Miller, R.G. (1996). CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J. Immunol.* 158, 1788-1798.
- Ranheim, E.A. and Kipps, T.J. (1995). Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) on human B cells by activated T-cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L. *Cell. Immunol.* 161, 226-235.
- Razi-Wolf, Z., Freeman, G., Galvin, F., Benacerraf, B., Nadler, L., Reiser, H. (1992). Expression and function of the murine B7 antigen and the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89, 4210- 4214.
- Ronchese, F., Hausmann, B., Hubele, S., Lane, P. (1994). Mice transgenic for a soluble form of murine CTLA-4 show enhanced expansion of antigen-specific CD4+ T-cells and defective antibody production in vivo. *J. Exp Med.* 179, 809- 817.
- Rotzschke, O. and Falk, K. (1994). Origin structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr. Op Immunol.* 6, 45-51.
- Russel, J.H. (1983). Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte induced target damage. *Immunol. Rev.* 72, 97- 118.
- Saukkonen, J.J., Kornfield, H., Berman, J.S. (1993). Expansion of a CD8+CD28+ cell population in the blood and lung of HIV- positive patients. *JAIDS* 11, 1194-1199.
- Schattner, E. and Laurence, J. (1994). HIV induced T-lymphocyte depletion. *Clin. Lab. Med.* 14, 221-227.

- Schmittel, A., Schelbenbogen, C., Keilholz, U. (1995). Lipopolysaccharide effectively up-regulates B7-1 (CD80) expression and costimulatory function of human monocytes. *Scan. J. Immunol.* 42, 701-704.
- Schwartz, R.H. (1992). Costimulation of T-lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068.
- Seder, R.A., Germain, R.N., Linsley, P.S., Paul, W.E. (1994). CD28 mediated co-stimulation of IL-2 production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and IFN γ production, *J. Exp Med.* 179, 299-304.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., Mak, T.B. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28 deficient mice. *Science* 261, 609-612.
- Sher, A., Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Clerici, M., Kullberg, M., Pearce, E.J., Berzofsky, J.A., Mosmann, T.R., James, S.L., Morse, H.C. (1992). Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev.* 127, 183-204.
- Siebelink, K.H., Chu, I.H., Rimmelzwaan, G.F., Weijer, K., van Herwijnen, H.R., Knell, P. (1990). Feline Immunodeficiency virus (FIV) infection in the cat as a model for HIV infection in man: FIV induced impairment of immune function. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6, 1373-1378.
- Siebelink, K.H., Tijhaar, E., Huisman, R.C., Huisman, W., deRonde, A., Darby, I.H., Francis, M.J., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D. (1995). Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *J Virol.* 69, 3704-3711.
- Singer, S.J. (1992). Intracellular communication and cell:cell adhesion. *Science* 255, 1671-1674.
- Smithgall, M.D., Wong, J.G., Linsley, P.S., Haffar, O.K. (1995). Costimulation of CD4+ T-cells via CD28 modulates human immunodeficiency type 1 infection and replication in vitro. *AIDS Res. Hu. Retro.* 11, 885-892.
- Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K., Marlin, S.D. (1987). The lymphocyte function associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 5, 223-252.
- Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- Stack, R.M., Lenschow, D.J., Gray, G.S., Bluestone, J.A., Fitch, F.W. (1994). IL-4 treatment of small splenic B cells induces co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J. Immunol.* 152, 5723-5733.
- Symington, F.W., Brady, W., Linsley, P.S. (1993). Expression and function of B7 on human epidermal Langerhan's cells. *J. Immunol.* 150, 1286-1295.
- Taylor, M.K. and Cohen, J.J. (1992). Cell mediated cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 338-343.
- Thomas, R., Davi, L.S., Lipsky, P.E. (1994). Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen presenting dendritic cells. *J. Immunol.* 152, 2613-2623.
- Townsend, S.E., and Allison, J.P. (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T-cells by B7 transfected melanoma cells. *Science* 259, 368-370.
- Turka L.A., Ledbetter, J.A., Lee, K., June, C.H., Thompson, C.B. (1990). CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J. Immunol.* 144, 1646-1653.
- Turka, L.A., Linsley, P.S., Paine, R., Schieven, G.L., Thompson, C.B., Ledbetter, J.A. (1991). Signal transduction via CD4, CD8 and CD28 in mature and immature thymocytes. *J. Immunol.* 146, 1428-1436.
- Unanue, E.R. (1984). Antigen presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 395-428.
- van Kooten, C., Rensink, I., Pascual-Salcedo, D., van Oers, R., Aarden, L. (1991). Monokine production by human T-cells: IL-1 alpha production is limited to memory T-cells. *J. Immunol.* 146, 2654-2658.

- van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Shaw, S. (1991). Roles of multiple accessory molecules in T cell activation. *Curr. Opin Immunol.* 3, 294-303.
- Wang, R., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Weaver, C., Russell, J.H. (1993). Differential activation of antigen-stimulated suicide and cytokine production pathways in CD4+ T-cells is regulated by the antigen-presenting cell. *J Immunol.* 150, 3832-42.
- Weiss, A. and Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.
- Williams, A. and Barclay, A. (1988). The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 381-405.
- Windhagen, A., Newcombe, J., Dangond, F., Strand, C., Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L., Hafler, D.A. (1995). Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) and interleukin 12 in multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 182, 1985-1996.
- Yamamoto, J.K., Hansen, H., Ho, W.E., Morishita, T.Y., Okuda, T., Sawa, T.R. (1989). Epidemiological and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J.A.V.M.A.* 194, 213-220.
- Yasukawa, M., Inatsuki, A., Kobayashi, Y. (1989). Differential in vitro activation of CD4+CD8- and CD8+CD4-herpes simplex virus-specific human cytotoxic T-cells. *J. Immunol.* 143, 2051-2057.
- Yssel, H., Schneider, P.V., Lanier, L.L. (1993). Interleukin 7 specifically induces B7/BB1 antigen on human cord blood and peripheral blood T-cells and T cell clones. *Int. Immunol.* 5, 753-759.
- Zanussi, S., Simonelli, C., D'Andrea, M., Caffau, C., Clerici, M., Tirelli, U., DePaoli, P. (1996). CD8+ lymphocyte phenotype and cytokine production in long-term non-progressor and in progressor patients with HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 105, 220-224.
- Zhou, T., Weaver, C., Linsley, P.S., Mountz, J.D. (1994). T-cells of Staphylococcal enterotoxin B-tolerized autoimmune MRL- lpr/lpr mice require costimulation through the 37- CD28/CTLA-4 pathway for activation and can be reenergized in vivo by stimulation of the T cell receptor in the absence of costimulatory signal. *Eur. J. Immunol.* 24, 1019-1025.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Collisson, Ellen W
Hash, Stephen M.
Insou, Choi

<120> Feline CD80, Feline CD86, Feline CTLA-4 Nucleic Acid And Polypeptides

<130> 54954-A-PCT

<140> Desconocido por el momento

<141> 1999-04-30

<150> 09/071,699 <151> 1998-05-01

<160> 55

<170> PatentIn ver. 2.0

<210> 1

<211> 941

<212> DNA

<213> feline CD80

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(876)

<400> 1

```

atg ggt cac gca gca aag tgg aaa aca cca cta ctg aag cac cca tat   48
Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr
    1             5             10             15

ccc aag ctc ttt ccg ctc ttg atg cta gct agt ctt ttt tac ttc tgt   96
Pro Lys Leu Phe Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys
                20             25             30

tca ggt atc atc cag gtg aac aag aca gtg gaa gaa gta gca gta cta   144
Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu
    35             40             45

tcc tgt gat tac aac att tcc acc aaa gaa ctg acg gaa att cga atc   192
Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr Glu Ile Arg Ile
    50             55             60

tat tgg caa aag gat gat gaa atg gtg ttg gct gtc atg tct ggc aaa   240

```


Val Ile Thr Ala Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala
 260 265 270
 agg tgg aga caa aga gaa atg ggg aga gcg cgg aaa tgg aaa aga tct 864
 Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser
 275 280 285
 cac ctg tct aca tagattctgc agaaccactg tatgcagagc atctggaggt 916
 His Leu Ser Thr
 290
 agcctcttta gctcttctct actag 941

<210> 2
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> feline CD80

<400> 2

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

90

145		150		155		160
Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu						
		165		170		175
Glu Asn Glu Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp						
		180		185		190
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met						
		195		200		205
Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr Gly Asn Leu Leu						
		210		215		220
Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn						
		225		230		240
Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val						
		245		250		255
Val Ile Thr Ala Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala						
		260		265		270
Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser						
		275		280		285
His Leu Ser Thr						
		290				

<210> 3
 <211> 879
 <212> DNA
 <213> feline CD80

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(876)

<400> 3

atg ggt cac gca gca aag tgg aaa aca cca cta ctg aag cac cca tat	48
Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr	
1 5 10 15	
ccc aag ctc ttt ccg ctc ttg atg cta gct agt ctt ttt tac ttc tgt	96
Pro Lys Leu Phe Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys	
20 25 30	

tca ggt atc atc cag gtg aac aag aca gtg gaa gaa gta gca gta cta	144
Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu	
35 40 45	
tcc tgt gat tac aac att tcc acc aaa gaa ctg acg gaa att cga atc	192
Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr Glu Ile Arg Ile	
50 55 60	
tat tgg caa aag gat gat gaa atg gtg ttg gct gtc atg tct ggc aaa	240
Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys	
65 70 75 80	
gta caa gtg tgg ccc aag tac aag aac cgc aca ttc act gac gtc acc	288
Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr	
85 90 95	
gat aac cac tcc att gtg atc atg gct ctg cgc ctg tca gac aat ggc	336
Asp Asn His Ser Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly	
100 105 110	
aaa tac act tgt atc att caa aag att caa aaa ggg tct tac aaa gtg	384
Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Lys Val	
115 120 125	
aaa cac ctg act tcg gtg atg tta ttg gtc aga gct gac ttc cct gtc	432
Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala Asp Phe Pro Val	
130 135 140	
cct agt ata act gat ctt gga aat cca tct cat aac atc aaa agg ata	480
Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile	
145 150 155 160	
atg tgc tta act tct gga ggt ttt cca aag cct cac ctc tcc tgg ctg	528
Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu	
165 170 175	
gaa aat gaa gaa gaa tta aat gcc atc aac aca aca gtt tcc caa gat	576
Glu Asn Glu Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp	
180 185 190	
cct gaa act gag ctc tac act att agc agt gaa ctg gat ttc aat atg	624
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met	
195 200 205	
aca aac aac cat agc ttc ctg tgt ctt gtc aag tat gga aac tta ata	672
Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr Gly Asn Leu Ile	
210 215 220	

gta tca cag atc ttc aac tgg caa aaa tca gag cca cag cct tct aat 72
 Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn
 225 230 235 240

aat cag ctc tgg atc att atc ctg agc tca gta gta agt ggg att gtt 76
 Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val
 245 250 255

gtg atc act gca ctt acc tta aga tgc cta gtc cac aga cct gct gca 81
 Val Ile Thr Ala Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala
 260 265 270

agg tgg aga caa aga gaa atg ggg aga gcg cgg aaa tgg aaa aga tct 86
 Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser
 275 280 285

cac ctg tct aca tag 87
 His Leu Ser Thr
 290

<210> 4

<211> 292

<212> PRT

<213> feline CD80

<400> 4

Met Gly His Ala Ala Lys Trp Lys Thr Pro Leu Leu Lys His Pro Tyr
 1 5 10 15

Pro Lys Leu Phe Pro Leu Leu Met Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Phe Cys
 20 25 30

Ser Gly Ile Ile Gln Val Asn Lys Thr Val Glu Glu Val Ala Val Leu
 35 40 45

Ser Cys Asp Tyr Asn Ile Ser Thr Lys Glu Leu Thr Glu Ile Arg Ile
 50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Asp Asp Glu Met Val Leu Ala Val Met Ser Gly Lys
 65 70 75 80

Val Gln Val Trp Pro Lys Tyr Lys Asn Arg Thr Phe Thr Asp Val Thr
 85 90 95

Asp Asn His Ser Ile Val Ile Met Ala Leu Arg Leu Ser Asp Asn Gly
 100 105 110

Lys Tyr Thr Cys Ile Ile Gln Lys Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Lys Val
 115 120 125
 Lys His Leu Thr Ser Val Met Leu Leu Val Arg Ala Asp Phe Pro Val
 130 135 140
 Pro Ser Ile Thr Asp Leu Gly Asn Pro Ser His Asn Ile Lys Arg Ile
 145 150 155 160
 Met Cys Leu Thr Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro His Leu Ser Trp Leu
 165 170 175
 Glu Asn Glu Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
 180 185 190
 Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Glu Leu Asp Phe Asn Met
 195 200 205
 Thr Asn Asn His Ser Phe Leu Cys Leu Val Lys Tyr Gly Asn Leu Ile
 210 215 220
 Val Ser Gln Ile Phe Asn Trp Gln Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ser Asn
 225 230 235 240
 Asn Gln Leu Trp Ile Ile Ile Leu Ser Ser Val Val Ser Gly Ile Val
 245 250 255
 Val Ile Thr Ala Leu Thr Leu Arg Cys Leu Val His Arg Pro Ala Ala
 260 265 270
 Arg Trp Arg Gln Arg Glu Met Gly Arg Ala Arg Lys Trp Lys Arg Ser
 275 280 285
 His Leu Ser Thr
 290

<210> 5
 <211> 1080
 <212> DNA
 <213> feline CD86

<220>
 <221> CDS
 <222> (63)..(1052)

<400> 5

gtttctgtgt tcctcgggaa tgtcactgag cttatacatc tggctctctgg gagctgcagt 60

gg atg ggc att tgt gac agc act atg gga ctg agt cac act ctc ctt	107
Met Gly Ile Cys Asp Ser Thr Met Gly Leu Ser His Thr Leu Leu	
1 5 10 15	
gtg atg gcc ctc ctg ctc tct ggt gtt tct tcc atg aag agt caa gca	155
Val Met Ala Leu Leu Leu Ser Gly Val Ser Ser Met Lys Ser Gln Ala	
20 25 30	
tat ttc aac aag act gga gaa ctg cca tgc cat ttt aca aac tct caa	203
Tyr Phe Asn Lys Thr Gly Glu Leu Pro Cys His Phe Thr Asn Ser Gln	
35 40 45	
aac ata agc ctg gat gag ctg gta gta ttt tgg cag gac cag gat aag	251
Asn Ile Ser Leu Asp Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Asp Lys	
50 55 60	
ctg gtt ctg tat gag ata ttc aga ggc aaa gag aac cct caa aat gtt	299
Leu Val Leu Tyr Glu Ile Phe Arg Gly Lys Glu Asn Pro Gln Asn Val	
65 70 75	
cat ctc aaa tat aag ggc cgt aca agc ttt gac aag gac aac tgg acc	347
His Leu Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Phe Asp Lys Asp Asn Trp Thr	
80 85 90 95	
ctg aga ctc cac aat gtt cag atc aag gac aag ggc aca tat cac tgt	395
Leu Arg Leu His Asn Val Gln Ile Lys Asp Lys Gly Thr Tyr His Cys	
100 105 110	
ttc att cat tat aaa ggg ccc aaa gga cta gtt ccc atg cac caa atg	443
Phe Ile His Tyr Lys Gly Pro Lys Gly Leu Val Pro Met His Gln Met	
115 120 125	
agt tct gac cta tca gtg ctt gct aac ttc agt caa cct gaa ata aca	491
Ser Ser Asp Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Thr	
130 135 140	
gta act tct aat aga aca gaa aat tct ggc atc ata aat ttg acc tgc	539
Val Thr Ser Asn Arg Thr Glu Asn Ser Gly Ile Ile Asn Leu Thr Cys	
145 150 155	
tca tct ata caa ggt tac cca gaa cct aag gag atg tat ttt cag cta	587
Ser Ser Ile Gln Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Glu Met Tyr Phe Gln Leu	
160 165 170 175	
aac act gag aat tca act act aag tat gat act gtc atg aag aaa tct	635
Asn Thr Glu Asn Ser Thr Thr Lys Tyr Asp Thr Val Met Lys Lys Ser	
180 185 190	

95

```

caa aat aat gtg aca gaa ctg tac aac gtt tct atc agc ttg cct ttt 683
Gln Asn Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asn Val Ser Ile Ser Leu Pro Phe
      195                200                205

tca gtc cct gaa gca cac aat gtg agc gtc ttt tgt gcc ctg aaa ctg 731
Ser Val Pro Glu Ala His Asn Val Ser Val Phe Cys Ala Leu Lys Leu
      210                215                220

gag aca ctg gag atg ctg ctc tcc cta cct ttc aat ata gat gca caa 779
Glu Thr Leu Glu Met Leu Leu Ser Leu Pro Phe Asn Ile Asp Ala Gln
      225                230                235

cct aag gat aaa gac cct gaa caa ggc cac ttc ctc tgg att gcg gct 827
Pro Lys Asp Lys Asp Pro Glu Gln Gly His Phe Leu Trp Ile Ala Ala
      240                245                250                255

gta ctt gta atg ttt gtt gtt ttt tgt ggg atg gtg tcc ttt aaa aca 875
Val Leu Val Met Phe Val Val Phe Cys Gly Met Val Ser Phe Lys Thr
      260                265                270

cta agg aaa agg aag aag aag cag cct ggc ccc tct cat gaa tgt gaa 923
Leu Arg Lys Arg Lys Lys Lys Gln Pro Gly Pro Ser His Glu Cys Glu
      275                280                285

acc atc aaa agg gag aga aaa gag agc aaa cag acc aac gaa aga gta 971
Thr Ile Lys Arg Glu Arg Lys Glu Ser Lys Gln Thr Asn Glu Arg Val
      290                295                300

cca tac cac gta cct gag aga tct gat gaa gcc cag tgt gtt aac att 1019
Pro Tyr His Val Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Cys Val Asn Ile
      305                310                315

ttg aag aca gcc tca ggg gac aaa aat cag tag gaaaatggtg gcttggcgtg 1072
Leu Lys Thr Ala Ser Gly Asp Lys Asn Gln
      320                325                330

ctgacaat 1080

```

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

<213> feline CD86

<400> 6

```

Met Gly Ile Cys Asp Ser Thr Met Gly Leu Ser His Thr Leu Leu Val
  1             5             10             15

```

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

Arg Lys Arg Lys Lys Lys Gln Pro Gly Pro Ser His Glu Cys Glu Thr
 275 280 285
 Ile Lys Arg Glu Arg Lys Glu Ser Lys Gln Thr Asn Glu Arg Val Pro
 290 295 300
 Tyr His Val Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Cys Val Asn Ile Leu
 305 310 315 320
 Lys Thr Ala Ser Gly Asp Lys Asn Gln
 325

<210> 7

<211> 688

<212> DNA

<213> feline CD28

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(663)

<400> 7

atg atc ctc agg ctg ctt ctg gct ctc aac ttc ttc ccc tca att caa 48
 Met Ile Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Phe Phe Pro Ser Ile Gln
 1 5 10 15
 gta aca gaa aac aag att ttg gtg aag cag ttg ccc agg ctt gtg gtg 96
 Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Leu Pro Arg Leu Val Val
 20 25 30
 tac aac aat gag gtc aac ctt agc tgc aag tac act cac aac ttc ttc 144
 Tyr Asn Asn Glu Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Thr His Asn Phe Phe
 35 40 45
 tca aag gag ttc cgg gca tcc ctt tat aag gga gta gat agt gct gtg 192
 Ser Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asp Ser Ala Val
 50 55 60
 gaa gtc tgc gtt gtg aat gga aat tac tcc cat cag cct cag ttc tac 240
 Glu Val Cys Val Val Asn Gly Asn Tyr Ser His Gln Pro Gln Phe Tyr
 65 70 75 80
 tca agt aca gga ttc gac tgt gat ggg aaa ttg ggc aat gaa aca gtg . 288
 Ser Ser Thr Gly Phe Asp Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Thr Val
 85 90 95

```

aca ttc tac ctc cga aat ttg ttt gtt aac caa acg gat att tac ttc 336
Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Leu Phe Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe
      100                105                110

tgc aaa att gaa gtc atg tat cca cct cct tac ata gac aat gag aag 384
Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Ile Asp Asn Glu Lys
      115                120                125

agc aat ggg acc att atc cac gtg aaa gag aaa cat ctt tgt cca gct 432
Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Glu Lys His Leu Cys Pro Ala
      130                135                140

cag ctg tct cct gaa tct tcc aag cca ttt tgg gca ctg gtg gtg gtt 480
Gln Leu Ser Pro Glu Ser Ser Lys Pro Phe Trp Ala Leu Val Val Val
      145                150                155                160

ggg gga atc cta ggt ttc tac agc ttg cta gca aca gtg gct ctt ggt 528
Gly Gly Ile Leu Gly Phe Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Gly
      165                170                175

gct tgc tgg atg aag acc aag agg agt agg atc ctt cag agt gac tat 576
Ala Cys Trp Met Lys Thr Lys Arg Ser Arg Ile Leu Gln Ser Asp Tyr
      180                185                190

atg aac atg acc ccc cgg agg cca ggg ccc acc cga agg cac tac caa 624
Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Arg His Tyr Gln
      195                200                205

cct tac gcc cca gca cgc gac ttt gcg gca tac cgt tcc tgacatggac 673
Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
      210                215                220

ccctatccag aagcc 688

```

<210> 8
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> feline CD28

<400> 8

```

Met Ile Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Phe Phe Pro Ser Ile Gln
  1                5                10                15

Val Thr Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Leu Pro Arg Leu Val Val
      20                25                30

Tyr Asn Asn Glu Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Thr His Asn Phe Phe

```

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

<210> 9
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4

<220>
 <221> CDS
 <222> (27)..(698)

<400> 9

aacctgaaca ctgctcccat aaagcc atg gct tgc ttt gga ttc cgg agg cat 53
 Met Ala Cys Phe Gly Phe Arg Arg His

100

1

5

ggg gct cag ctg gac ctg gct tct agg acc tgg ccc tgc act gct ctg	101
Gly Ala Gln Leu Asp Leu Ala Ser Arg Thr Trp Pro Cys Thr Ala Leu	
10 15 20 25	
ttt tct ctt ctc ttt atc ccc gtc ttc tcc aaa ggg atg cat gtg gcc	149
Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro Val Phe Ser Lys Gly Met His Val Ala	
30 35 40	
cac cct gca gtg gtg ctg gcc agc agc cga ggt gtc gcc agc ttc gtg	197
His Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val Ala Ser Phe Val	
45 50 55	
tgt gaa tat ggg tct tca ggc aat gcc gcc aaa ttc cga gtg act gtg	245
Cys Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Asn Ala Ala Lys Phe Arg Val Thr Val	
60 65 70	
ctg agg caa act ggc agc caa atg act gaa gtc tgt gct gcg aca tac	293
Leu Arg Gln Thr Gly Ser Gln Met Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr	
75 80 85	
aca gtg gag aat gag ttg gcc ttc cta aat gat tcc acc tgc act ggc	341
Thr Val Glu Asn Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Ser Thr Cys Thr Gly	
90 95 100 105	
atc tcc agc gga aac aaa gtg aac ctc acc atc caa ggg ttg agg gcc	389
Ile Ser Ser Gly Asn Lys Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala	
110 115 120	
atg gac acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca cca	437
Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro	
125 130 135	
ccc tac tat gca ggc atg ggc aat gga acc cag att tat gtc atc gat	485
Pro Tyr Tyr Ala Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp	
140 145 150	
cct gaa cct tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctc gca gca	533
Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala	
155 160 165	
gtc agt tca gga ttg ttt ttt tat agc ttc ctt atc aca gct gtt tct	581
Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Ser	
170 175 180 185	
ttg agc aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt act aca ggg gtc tat	629
Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr	

ES 2 352 745 T3

101

190	195	200	
gtg aaa atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct			677
Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro			
205	210	215	
tat ttt att ccc atc aat tga cacaccgtta tgaagaagga agaacactgt			728
Tyr Phe Ile Pro Ile Asn			
220			
ccaattttcta agagctgagg c			749
<210> 10			
<211> 223			
<212> PRT			
<213> feline CTLA-4			
<400> 10			
Met Ala Cys Phe Gly Phe Arg Arg His Gly Ala Gln Leu Asp Leu Ala			
1	5	10	15
Ser Arg Thr Trp Pro Cys Thr Ala Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro			
20	25	30	
Val Phe Ser Lys Gly Met His Val Ala His Pro Ala Val Val Leu Ala			
35	40	45	
Ser Ser Arg Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Gly Ser Ser Gly			
50	55	60	
Asn Ala Ala Lys Phe Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Gly Ser Gln			
65	70	75	80
Met Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Thr Val Glu Asn Glu Leu Ala			
85	90	95	
Phe Leu Asn Asp Ser Thr Cys Thr Gly Ile Ser Ser Gly Asn Lys Val			
100	105	110	
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile			
115	120	125	
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Ala Gly Met Gly			
130	135	140	
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser			
145	150	155	160

Asp	Phe	Leu	Leu	Trp	Ile	Leu	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Phe
				165					170					175	
Tyr	Ser	Phe	Leu	Ile	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Met	Leu	Lys	Lys
			180					185					190		
Arg	Ser	Pro	Leu	Thr	Thr	Gly	Val	Tyr	Val	Lys	Met	Pro	Pro	Thr	Glu
		195					200					205			
Pro	Glu	Cys	Glu	Lys	Gln	Phe	Gln	Pro	Tyr	Phe	Ile	Pro	Ile	Asn	
	210					215					220				

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> feline CD80 primer

<400> 11

cgcggtatccg caccatgggt cagcagcaa agtgaaaaac 40

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> feline CD80 primer

<400> 12

cctagtagag aagagctaaa gaggc 25

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> feline CD28 primer

<400> 13

cgcggtacca ccggtagcac aatgacctc agg 33

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> feline CD28 primer

<400> 14

cgcggtacct ctggataggg gtocatgtca g 31

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> feline CTLA-4 primer

<400> 15

atggcttcgc ctggatttc cagcagg 27

<210> 16

<211> 29

<212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 16
 tcaattgaat gaggaataaa ataaggctg 29

 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 17
 tgttgggttt ctgactctga cttccctg 28

 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 18
 gcatagtagg gtggtgggta catg 24

 <210> 19
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 19
 tgttgggttt ctgactctga cttccctg 28

 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 20
 acatgagctc caccttcag 20

 <210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 21
 ccatcctaatac agactcact atagggc 27

 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> feline CTL-4 primer

 <400> 22
 gtgaatatgg gtcttcaggc aatg 24

 <210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

<400> 23
 actcactata gggctcgagc ggc 23

 <210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 24
 gaaatccgag tgactgtgct gag 23

 <210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 25
 aacctgaaca ctgctcccat aaag 24

 <210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> feline CTLA-4 primer

 <400> 26
 gcctcagctc ttagaaattg gacag 25

 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 27
 tagtatittg gcaggaccag g 21

 <210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 28
 ctgtgacatt atcttgagat ttc 23

 <210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 29
 gagcatgcac taatgggact gag 23

 <210> 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 30
 ctgtgacatt atcttgagat ttc 23

<210> 31
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 31
 ccatcctaac acgactcact atagggc 27

 <210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 32
 tgggtaacct tgtatagatg agcaggtc 28

 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 33
 actcactata gggctcgagc ggc 23

 <210> 34
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 34
 caggttgact gaagttagca agcac 25

 <210> 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 35
 ccatcctaac acgactcact atagggc 27

 <210> 36
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 36
 ggacaagggc acatatcact gtttc 25

 <210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 37
 actcactata gggctcgagc ggc 23

 <210> 38
 <211> 25

<212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 38
 cagtgtgtgc taacttcagt caacc 25

 <210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 39
 cggaatgtc actgagctta tag 23

 <210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> feline CD86 primer

 <400> 40
 gatcttttc aggttagcag ggg 23

 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> feline CD80 primer

 <400> 41
 atgggtcacg cagcaaagtg 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> feline CD80 primer

 <400> 42
 ctatgtagac aggtgagatc 20

 <210> 43
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> feline CD80 primer

 <400> 43
 caggaaacag ctatgac 17

 <210> 44
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> feline CD80 primer

 <400> 44
 aatacgactc actatagg 18

 <210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> feline CD80 primer

<400> 45
aacaccattt catcatcctt t 21

<210> 46
<211> 23
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 46
atacaagtgt attgccatt gtc 23

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 47
agctctgacc aataacatca 20

<210> 48
<211> 22
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 48
attagaaatc cagttcactg ct 22

<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 49
tcatgtctgg caaagtacaa g 21

<210> 50
<211> 18
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 50
attcactgac gtcaccga 18

<210> 51
<211> 16
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 51
aaggctgtgg ctctga 16

<210> 52
<211> 29
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 52
tcgagaattc gggtcacgca gcaaagtgg 29

<210> 53
<211> 32
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 53
gctaggatcc aatctatgta gacaggtag at 32

<210> 54
<211> 32
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 54
gatgaattcc atgacctca ggctgggctt ct 32

<210> 55
<211> 29
<212> DNA
<213> feline CD80 primer

<400> 55
gatcagatct caggaacggt atgccgcaa 29

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica un ligando de CD86 felino que tiene la SEC ID N° 6 o un ligando de CD86 soluble que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 6 pero que carece de la región transmembrana o hidrófoba.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 5.
3. La molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 ó 3, en la que la molécula de ácido nucleico es ADN o ARN.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que el ADN es ADNc o ADN genómico.
5. Un oligonucleótido de por lo menos 12 nucleótidos complementarios a una secuencia presente únicamente en el ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El oligonucleótido de la reivindicación 5, que tiene una longitud de por lo menos 15 ó 16 nucleótidos.
7. El oligonucleótido de las reivindicaciones 5 ó 6, en el que el oligonucleótido está marcado de forma detectable.
8. El oligonucleótido de la Reivindicación 7, en el que el marcador detectable comprende un radioisótopo, un fluoróforo o biotina.
9. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el oligonucleótido se metila de forma selectiva.
10. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
11. El vector de la reivindicación 10, que es el vector plasmídico denominado B7-2#19-2/011298 (n° de registro en la ATCC N° 209821).
12. El vector de las reivindicaciones 10 ó 11, que comprende un promotor unido de manera operable a la molécula de ácido nucleico.
13. Una célula huésped que comprende un vector de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
14. La célula huésped de la reivindicación 13, en la que la célula huésped es una célula eucariótica o procariótica.
15. La célula huésped de la reivindicación 14, en la que dicha célula huésped se selecciona del grupo constituido por: E. Coli, levadura, células COS, células PC12, células CHO y células GH4C1.

16. El polipéptido ligando de CD86 felino o polipéptido ligando soluble de CD86 codificado por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 5 17. Un procedimiento de producción del polipéptido de la reivindicación 16, que comprende el cultivo de una célula huésped que expresa el polipéptido y la recuperación del polipéptido producido de esta manera.
18. Una vacuna que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido de la Reivindicación 16 y un vehículo adecuado.
- 10 19. La vacuna de la reivindicación 18, en la que la cantidad efectiva es una cantidad desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 100 mg por dosis.
20. La vacuna de la reivindicación 18, en la que la cantidad efectiva es una cantidad desde aproximadamente 0,25 mg/kg de peso del cuerpo de un felino/día hasta aproximadamente 25 mg/kg por peso de un felino/día.
- 15 21. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que además comprende un inmunogen derivado de un patógeno.
22. La vacuna de la reivindicación 21, en la que el patógeno es un patógeno felino, un virus de la rabia, clamidia, Toxoplasmosis gondii, Dirofilaria immitis, una pulga o un patógeno bacteriano.
- 20 23. La vacuna de la reivindicación 22, en la que el patógeno felino es el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIP), el virus de la panleucopenia felina, el calicivirus felino, el reovirus felino del tipo 3, el rotavirus felino, el coronavirus felino, el virus sincitial felino, el virus de sarcoma felino, el virus del herpes felino, el virus de la enfermedad Borna felina, o un parásito felino.
- 25 24. Uso de una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23 para la preparación de una composición farmacéutica para inducir inmunidad en un felino.
25. Uso de una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23 para la preparación de una composición farmacéutica para potenciar una respuesta inmunitaria en un felino.
- 30 26. El uso de las reivindicaciones 24 ó 25, en el que la vacuna se administra por vía subcutánea, intramuscular, sistémica, tópica u oral.
27. Uso de una cantidad efectiva de un polipéptido de la reivindicación 18 o un polipéptido resultante del procedimiento de la reivindicación 19 para la
- 35

preparación de una composición farmacéutica para suprimir una respuesta inmunitaria en un felino.

28. El uso de la reivindicación 27, en el que la cantidad es de aproximadamente 0,25 mg/kg de peso corporal/día hasta aproximadamente 25 mg//kg de peso corporal/día.
29. El uso de la reivindicación 27 ó 28, en el que e el felino está sufriendo una enfermedad autoinmunitaria o es el receptor de un trasplante de tejido u órgano.
30. Uso de un ácido nucleico que hibrida con un transcrito de ARNm de un ligando de CD86 felino codificado por el ácido nucleico de las reivindicaciones 1-4 y que inhibe la traducción de dicho ARNm para la preparación de una composición farmacéutica para suprimir una respuesta inmunitaria en un felino.

FIG.1A-1

FeB72

GTTTCTGTGTTTCCTCGGGAATGTCAGCTTATACATCTGGTCTCTGGGAGCTGCAGT	60
GGATGGGCATTTGTGACAGCACTATGGGACTGAGTCACACTCTCCTTGTGATGGCCCTCC	
Met Gly Ile Cys Asp Ser Thr Met Gly Leu Ser His Thr Leu Leu Val Met Ala Leu	120
TGCTCTCTGGTGTTCCTTCCATGAAGAGTCAAGCATATTTCAACAAGACTGGAGAACTGC	
Leu Leu Ser Gly Val Ser Ser Met Lys Ser Gln Ala Tyr Phe Asn Lys Thr Gly Glu Leu	180
CATGCCATTTTACAAACTCTCAAAACATAAGCCTGGATGAGCTGGTAGTATTTTGGCAGG	
Pro Cys His Phe Thr Asn Ser Gln Asn Ile Ser Leu Asp Glu Leu Val Val Phe Trp Gln	240
ACCAGGATAAGCTGGTTCTGTATGAGATATTCAGAGGCAAAGAGAACCCTCAAAATGTTT	
Asp Gln Asp Lys Leu Val Leu Tyr Glu Ile Phe Arg Gly Lys Glu Asn Pro Gln Asn Val	300
ATCTCAAATATAAGGGCCGTACAAGCTTTGACAAGGACAACCTGGACCCTGAGACTCCACA	
His Leu Lys Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Phe Asp Lys Asp Asn Trp Thr Leu Arg Leu His	360
ATGTTTCAGATCAAGGACAAGGGCACATATCACTGTTTCATTTCATTATAAAGGGCCCCAAG	
Asn Val Gln Ile Lys Asp Lys Gly Thr Tyr His Cys Phe Ile His Tyr Lys Gly Pro Lys	420
GACTAGTTCCCATGCACCAAAATGAGTTCTGACCTATCAGTGCTTGCTAACTTCAGTCAAC	
Gly Leu Val Pro Met His Gln Met Ser Ser Asp Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln	480
CTGAAATAACAGTAACCTTCTAATAGAACAGAAAATTCTGGCATCATAAATTTGACCTGCT	
Pro Glu Ile Thr Val Thr Ser Asn Arg Thr Glu Asn Ser Gly Ile Ile Asn Leu Thr Cys	540
CATCTATACAAGGTTACCCAGAACCTAAGGAGATGTATTTTCAGCTAAACACTGAGAATT	
Ser Ser Ile Gln Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Glu Met Tyr Phe Gln Leu Asn Thr Glu Asn	600
CAACTACTAAGTATGATACTGTCATGAAGAAATCTCAAATAATGTGACAGAACTGTACA	
Ser Thr Thr Lys Tyr Asp Thr Val Met Lys Lys Ser Gln Asn Asn Val Thr Glu Leu Tyr	660
ACGTTTCTATCAGCTTGCCTTTTTCAGTCCCTGAAGCACACAATGTGAGCGTCTTTTGTG	
Asn Val Ser Ile Ser Leu Pro Phe Ser Val Pro Glu Ala His Asn Val Ser Val Phe Cys	720
CCCTGAAACTGGAGACACTGGAGATGCTGCTCTCCCTACCTTTCAATATAGATGCACAAC	
Ala Leu Lys Leu Glu Thr Leu Glu Met Leu Leu Ser Leu Pro Phe Asn Ile Asp Ala Gln	780
CTAAGGATAAAGACCCTGAACAAGGCCACTTCCTCTGGATTGCGGCTGTACTTGTAATGT	
Pro Lys Asp Lys Asp Pro Glu Gln Gly His Phe Leu Trp Ile Ala Ala Val Leu Val Met	840
TTGTTGTTTTTTGTGGGATGGTGTCTTTTAAACACTAAGGAAAAGGAAGAAGAAGCAGC	
Phe Val Val Phe Cys Gly Met Val Ser Phe Lys Thr Leu Arg Lys Arg Lys Lys Lys Gln	900

FIG.1A-2

CTGGCCCCCTCTCATGAATGTGAAACCATCAAAAGGGAGAGAAAAGAGAGCAAACAGACCA 960
Pro Gly Pro Ser His Glu Cys Glu Thr Ile Lys Arg Glu Arg Lys Glu Ser Lys Gln Thr

ACGAAAGAGTACCATACCACGTACCTGAGAGATCTGATGAAGCCCAGTGTGTTAACATTT 1020
Asn Glu Arg Val Pro Tyr His Val Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Cys Val Asn Ile

TGAAGACAGCCTCAGGGGACAAAAATCAGTAGGAAAATGGTGGCTTGGCGTGCTGACAAT 1080
Leu Lys Thr Ala Ser Gly Asp Lys Asn Gln

FIG.1'B

Gráfico de hidrofobicidad: CD86 felino (B7-2)

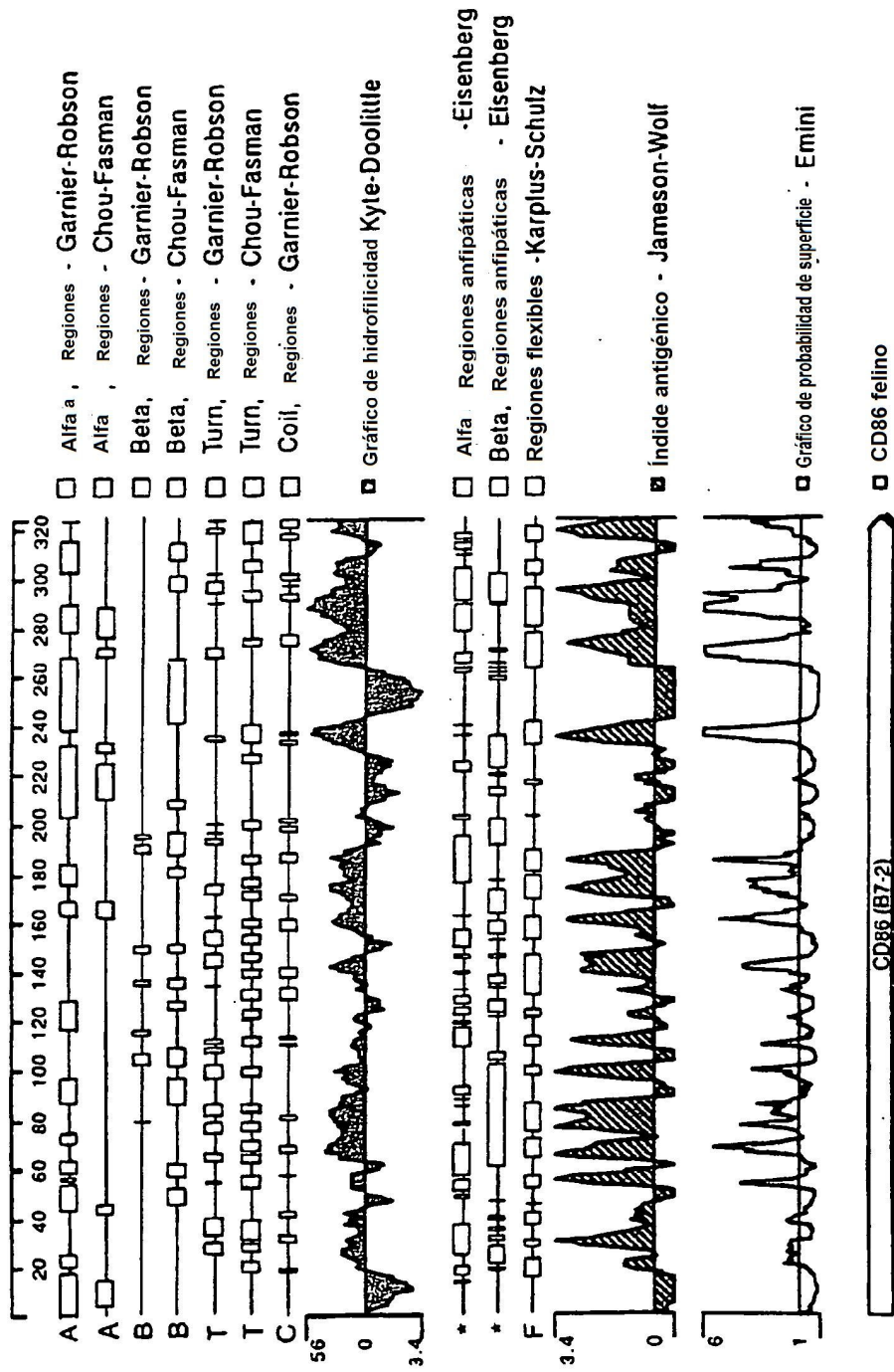


FIG. 2A

FeCD28

ATGATCCTCAGGCTGCTTCTGGCTCTCAACTTCTTCCCTCAATTCAAGTAACAGAAAAC 60
 Met Ile Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Phe Phe Pro Ser Ile Gln Val Thr Glu Asn

AAGATTTTGGTGAAGCAGTTGCCAGGCTTGTGGTGTACAACAATGAGGTCAACCTTAGC 120
 Lys Ile Leu Val Lys Gln Leu Pro Arg Leu Val Val Tyr Asn Asn Glu Val Asn Leu Ser

TGCAAGTACACTCACAACTTCTTCTCAAAGGAGTCCGGGCATCCCTTTATAAGGGAGTA 180
 Cys Lys Tyr Thr His Asn Phe Phe Ser Lys Glu Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val

GATAGTGCTGTGGAAGTCTGCGTTGTGAATGGAAATTACTCCCATCAGCCTCAGTTCTAC 240
 Asp Ser Ala Val Glu Val Cys Val Val Asn Gly Asn Tyr Ser His Gln Pro Gln Phe Tyr

TCAAGTACAGGATTCGACTGTGATGGGAAATTGGGCAATGAAACAGTGACATTCTACCTC 300
 Ser Ser Thr Gly Phe Asp Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Thr Val Thr Phe Tyr Leu

CGAAATTTGTTTGTAAACCAAACGGATATTTACTTCTGCAAAATTGAAGTCATGTATCCA 360
 Arg Asn Leu Phe Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro

CCTCCTTACATAGACAATGAGAAGAGCAATGGGACCATTATCCACGTGAAAGAGAAACAT 420
 Pro Pro Tyr Ile Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Glu Lys His

CTTTGTCCAGCTCAGCTGTCTCCTGAATCTTCCAAGCCATTTTGGGCACTGGTGGTGGTT 480
 Leu Cys Pro Ala Gln Leu Ser Pro Glu Ser Ser Lys Pro Phe Trp Ala Leu Val Val Val

GGTGGAATCCTAGGTTTCTACAGCTTGCTAGCAACAGTGGCTCTTGGTGCTTGCTGGATG 540
 Gly Gly Ile Leu Gly Phe Tyr Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Gly Ala Cys Trp Met

AAGACCAAGAGGAGTAGGATCCTTCAGAGTGACTATATGAACATGACCCCCCGGAGGCCA 600
 Lys Thr Lys Arg Ser Arg Ile Leu Gln Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro

GGGCCCCACCCGAAGGCACTACCAACCTTACGCCCCAGCACGCGACTTTGCGGCATACCGT 660
 Gly Pro Thr Arg Arg His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg

TCCTGACATGGACCCCTATCCAGAAGCC 688
 Ser

FIG. 2B

Gráfico de hidrofobicidad : CD28

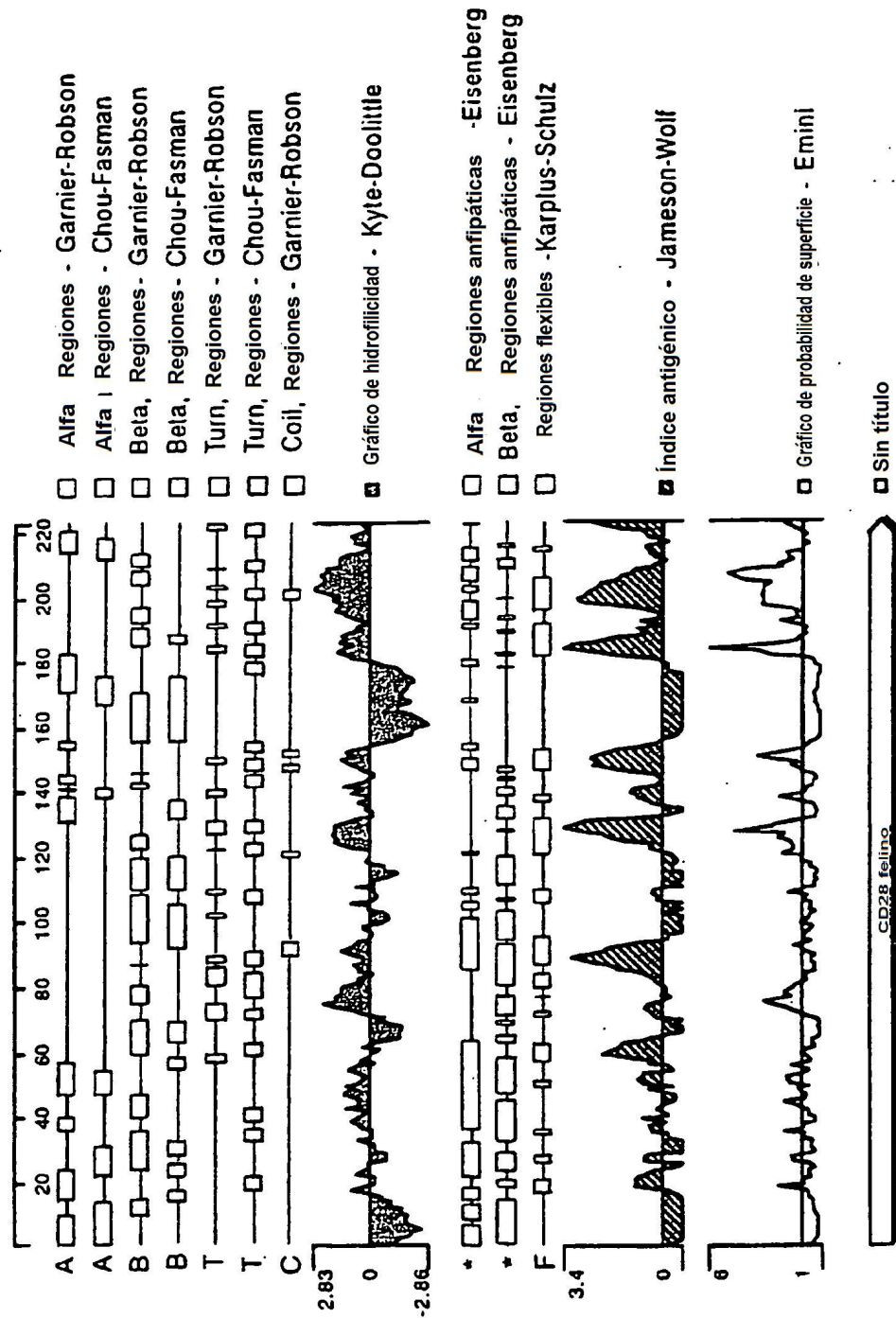


FIG. 3A

Fe CTLA4

AACCTGAACACTGCTCCCATAAAGCCATGGCTTGCTTTGGATTCCGGAGGCATGGGGCTC 60

Met Ala Cys Phe Gly Phe Arg Arg His Gly Ala

AGCTGGACCTGGCTTCTAGGACCTGGCCCTGCACTGCTCTGTTTTCTTTCTTTATCC 120
 Gln Leu Asp Leu Ala Ser Arg Thr Trp Pro Cys Thr Ala Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile

CCGTCTTCTCCAAAGGGATGCATGTGGCCACCCCTGCAGTGGTGCTGGCCAGCAGCCGAG 180
 Pro Val Phe Ser Lys Gly Met His Val Ala His Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg

GTGTGCCCAGCTTCGTGTGTGAATATGGGTCTTCAGGCAATGCCGCCAAATTCCGAGTGA 240
 Gly Val Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Gly Ser Ser Gly Asn Ala Ala Lys Phe Arg Val

CTGTGCTGAGGGAAACTGGCAGCCAAATGACTGAAGTCTGTGCTGCGACATACACAGTGG 300
 Thr Val Leu Arg Gln Thr Gly Ser Gln Met Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Thr Val

AGAATGAGTTGGCCTTCCTAAATGATTCCACCTGCACTGGCATCTCCAGCGGAAACAAAG 360
 Glu Asn Glu Leu Ala Phe Leu Asn Asp Ser Thr Cys Thr Gly Ile Ser Ser Gly Asn Lys

TGAACCTCACCATCCAAGGGTTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGG 420
 Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val

AGCTCATGTACCCACCACCCTACTATGCAGGCATGGGCAATGGAACCCAGATTTATGTCA 480
 Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Ala Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val

TCGATCCTGAACCTTGCCCAGATTCTGACTTCCTCCTCTGGATCCTCGCAGCAGTCAGTT 540
 Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser

CAGGATTGTTTTTTTATAGCTTCCTTATCACAGCTGTTTCTTTGAGCAAAATGCTAAAGA 600
 Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Ile Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys

AAAGAAGCCCTCTTACTACAGGGGTCTATGTGAAAATGCCCCAACAGAGCCAGAATGTG 660
 Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys

AAAAGCAATTTTCAGCCTTATTTTATCCCATCAATTGACACACCGTTATGAAGAAGGAAG 720
 Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

AACACTGTCCAATTTCTAAGAGCTGAGGC 749

