



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 340**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)	C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	C07K 16/28 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)	A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)	A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01941978 .7**

86 Fecha de presentación : **06.06.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1292619**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2003**

54 Título: **Ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados con B7 y sus usos para inmunomodulación.**

30 Prioridad: **06.06.2000 US 209811 P**
28.02.2001 US 272107 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Company**
Route 206 & Province Line Road
Princeton, New Jersey 08543-4000, US

72 Inventor/es: **Mikesell, Glen, E.;**
Chang, Han;
Yang, Guchen;
Peach, Robert y
Shen, Henry

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 300 340 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados con B7 y sus usos para inmunomodulación.

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud es una continuación en parte de la Solicitud de Estados Unidos Número de serie 60/209.811, presentada el 6 de junio de 2000, y la Solicitud de Estados Unidos Número de serie 60/272.107, presentada el 28 de febrero de 2001.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos relacionados con B7, denominados BSL2, que modulan las células que son importantes para las respuestas inmunes e inflamatorias, tales como las células T. BSL1 y BSL3 también se describen en el presente documento. También se refiere a vectores de expresión. También se describen en el presente documento construcciones de fusión que comprenden ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos relacionados con B7. La presente invención además se refiere a polipéptidos relacionados con B7 y anticuerpos que son específicamente reactivos con los polipéptidos relacionados con B7. Se describen en el presente documento proteínas de fusión que comprenden polipéptidos relacionados con B7 o porciones de los polipéptidos relacionados con B7. Además la presente invención se refiere a procedimientos de aislamiento y e identificación del (de los) correspondiente(s) receptor(es) de los polipéptidos relacionados con B7, utilizando los polipéptidos relacionados con B7, o proteínas de fusión. En el presente documento se describen procedimientos de inmunomodulación de un sujeto mediante la administración de composiciones de los polipéptidos relacionados con B7, proteínas de fusión, anticuerpos afines o porciones o derivados de los mismos. Además en el presente documento se describen procedimientos de inmunomodulación de sujetos animales o humanos mediante la administración de composiciones de vectores modificados por ingeniería genética que comprenden los de los polipéptidos relacionados con B7 como se describe en el presente documento.

Antecedentes de la invención

La respuesta primaria de las células T, que implican la activación de las células T, expresión y diferenciación es esencial para el inicio de una respuesta inmune a un antígeno foráneo. La activación de las células T por células que presentan antígeno (APC) requiere al menos dos señales separadas requiere al menos dos señales separadas (K.E. Hellstrom *et al.* (1996) Cancer Chemother. Pharmacol. 38: S40-1; N.K. Damle *et al.* (1992) J. Immunol. 148: 1985-92; J.M. Green *et al.* (1994) Eur. J. Immunol. 24: 265-72; E.C. Guinan *et al.* (1994) Blood 84: 3261-82; J.W. Hodge *et al.* (1995) Cancer Res. 55: 3598-603). La primera señal provoca que la célula T entre en el ciclo celular, y está mediada por antígenos foráneos presentados por el complejo de histocompatibilidad principal (MHC). La segunda señal, denominada coestimulación, provoca la producción de citoquinas y proliferación de las células T, pero no es ni específica de antígeno, ni está restringida por MHC (R.H. Schwartz (1990) Science 248: 1349-1356).

La coestimulación se cree que está mediada por una o más moléculas distintas expresadas por la superficie de las células por los APC (M.K. Jenkins *et al.* (1988) J. Immunol. 140: 3324-3330; P.S. Linsley *et al.* (1991) J. Exp. Med. 173: 721-730; C.D. Gimmi, *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6575-6579; J.W. Young *et al.* (1992) J. Clin. Invest. 90: 229-237; L. Koulova *et al.* (1991) J. Exp. Med. 173: 759-762; H. Reiser *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 271-275; G.A. van-Seventer *et al.* (1990) J. Immunol. 144: 4579-4586; J. M. LaSalle *et al.* (1991) J. Immunol. 147: 774-80; M. I. Dustin *et al.* (1989) J. Exp. Med. 169: 503; R.J. Armitage *et al.* (1992) Nature 357: 80-82; Y. Liu *et al.* (1992) J. Exp. Med. 175: 437-445). Una considerable evidencia sugiere que B7, una proteína de la superficie de las células APC, es una de tal molécula coestimuladora (P.S. Linsley *et al.* (1991) J. Exp. Med. 173: 721-730; C.D. Gimmi *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6575-6579; L. Koulova *et al.* (1991) J. Exp. Med. 173: 759-762; H. Reiser *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 271-275; P.S. Linsley *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5031-5035; G.J. Freeman *et al.* (1991) J. Exp. Med. 174: 625-631).

B7 se ha demostrado que se une a dos receptores contrarios (ligandos) expresados sobre las células T, denominados CD28 y CTLA-4. B7 que se une a CD28 induce que las células T proliferen y secreten IL-2 (P.S. Linsley *et al.* (1991) J. Exp. Med. 173, 721-730; C.D. Gimmi *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6575-6579; C.B. Thompson *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1333-1337; C.H. June *et al.* (1990) Immunol. Today 11: 211-6; F.A. Harding *et al.* (1992) Nature 356: 607-609), permitiendo la activación completa de las células. De manera recíproca, B7 que se une a CTLA-4 media la regulación hacia abajo de las células T. La importancia de la ruta coestimuladora B7:CD28/CTLA-4 se ha demostrado *in vitro* y varios sistemas de modelo *in vivo*. El bloqueo de esta ruta da como resultado el desarrollo de tolerancia específica de antígeno en sistemas murinos y humanos (F.A. Harding *et al.* (1992) Nature 356: 607-609; D.J. Lenschow *et al.* (1992) Science 257: 789-792; L.A. Turka *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11102-11105; C.D. Gimmi *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6586-6590). De manera inversa la expresión ectópica de B7 en células tumorales murinas negativas de B7 negativa induce inmunidad específica mediada por las células T acompañada por el rechazo de tumor y protección de larga duración a la exposición a tumor (L. Chen *et al.* (1992) Cell 71: 1093-1102; S.E. Townsend *et al.* (1993) Science 259: 368-370; S. Baskar *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5687-5690). Por lo tanto, la manipulación de la ruta B7:CD28/CTLA-4 ofrece un gran potencial para estimular o suprimir las respuestas inmunes en seres humanos.

Además de la molécula de B7 caracterizada previamente (denominada de aquí en adelante B7-1) se han identificado las moléculas de tipo B7-1 (véase, por ejemplo, M. Azuma *et al.* (1993) *Nature* 366: 76-79; C. Chen *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152: 4929-36; R.H. Reeves *et al.* (1997) *Mamm. Genome* 8:581-582; K. Ishikawa *et al.* (1998) *DNA Res.* 5: 169-176; Patente de Estados Unidos N° 5.942.607 emitida el 24 de Agosto de 1999 a Freeman *et al.*). En particular, PD-L1 y PD-L2 se han identificado como inhibidores de la activación de las células T (G.J. Freeman *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 192: 1027-1034; Y. Latchman *et al.*, (2001) *Nature Immunology* 2: 261-268), mientras que B7-H1, B7-H3, y B7-DC have se han descrito como coestimuladores de la proliferación de las células T-cell (H. Dong *et al.* (1999) *Nature Medicine* 5:1365-1369; A.I. Chapoval (2001) *Nature Immunology* 2:269-274; Tseng *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 193 (7): 839-45).

De este modo, no existe una familia de crecimiento de factores relacionados con B7-1, que modulan la activación de las células T (revisión por J. Henry *et al.* (1999) *Immunol. Today* 20: 285-288). La identificación, aislamiento, y caracterización de factores relacionados con B7 y por lo tanto son importantes objetivos para el entendimiento adicional de la activación de las células T y función tanto en los estados normales como patológicos en animales, particularmente seres humanos. También en el presente documento se describe el descubrimiento y caracterización de tres factores relacionados con B7, denominados BSL1, BSL2, y BSL3. También se describen diversos ensayos y tratamientos que utilizan los factores BSL1, BSL2, y BSL3.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar ácidos nucleicos aislados que codifican los polipéptidos relacionados con B7 que modulan las respuestas inflamatorias e inmunes, incluyendo la activación de las células T. Los polipéptidos relacionados con B7 dentro del alcance de la invención incluyen receptores contrarios sobre la superficie de APC capaces de unirse a CD28 y/o ligando(s) relacionados con CD28. Específicamente, los polipéptidos relacionados con B7, denominados polipéptidos BSL2, y fragmentos solubles o derivados de los mismos. Más específicamente, el ácido nucleico relacionado con B7:

- i) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 ó 13;
- ii) una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1 a 465 de la SEQ ID NO: 7;
- iii) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es 99% idéntica a la SEQ ID NO: 11;
- iv) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 99,5% idéntica a la SEQ ID NO: 13;
- v) una secuencia de nucleótidos que comprende los polinucleótidos que codifican los aminoácidos 1 a 698 de la SEQ ID NO: 9;
- vi) una secuencia de nucleótidos que comprende los polinucleótidos que codifican los aminoácidos 2 a 698 de la SEQ ID NO: 9;
- vii) una secuencia de nucleótidos que comprende los polinucleótidos que codifican los aminoácidos 69 a 698 de la SEQ ID NO: 9;
- viii) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 2094 de la SEQ ID NO: 8;
- ix) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 4 a 2094 de la SEQ ID NO: 8;
- x) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 205 a 2094 de la SEQ ID NO: 8;
- xi) una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6, 10 ó 12;
- xii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el ADN contenido en PTA-1987, PTA-1988 o PTA-1993;
- xiii) una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de (i) a (xi); y
- xiv) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 7, 11 y 13 y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio Fc de inmunoglobulina G.

Además, las sondas de ácido nucleico útiles para ensayar una muestra biológica para la presencia de APC que expresan los factores BSL2 se describen en el presente documento.

ES 2 300 340 T3

Es otro objeto de la presente invención proporcionar vectores (por ejemplo, vectores de expresión), descritos en el presente documento son construcciones de fusión que comprenden ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos relacionados con Los polipéptidos relacionados con B7. Los vectores de expresión dirigen la síntesis de los polipéptidos o péptidos correspondientes en una diversidad de huéspedes, particularmente células eucarióticas, tales como cultivo de células de mamífero e insectos, y células procarióticas, tal como *Escherichia coli*. Los vectores de expresión dentro del alcance de la invención comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos un Polipéptido relacionado con B7 como se describe en el presente documento, y un promotor unido de manera operativa a la secuencia de ácidos nucleicos. En una realización, el vector de expresión comprende una secuencia de ADN que codifica el dominio extracelular de BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13) condensado a una secuencia de ADN que codifica la inmunoglobulina G1 (IgG1) de la región de Fc. Tales vectores de expresión se pueden usar para transformar o transfectar células huéspedes para producir por lo tanto polipéptidos o péptidos, que incluyen proteínas o péptidos de fusión codificados por moléculas de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos relacionados con B7, que incluyen los polipéptidos BSL2. Las porciones o sus derivados se describen en el presente documento. Los polipéptidos relacionados con B7 preferidos comprenden las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o sus porciones. Tales polipéptidos comprenden al menos una porción de de las formas maduras los polipéptidos BSL2, y preferiblemente comprenden las formas solubles de estos polipéptidos.

También abarcados por la presente invención son polipéptidos que comparten homología moderada a sustancial con la secuencia de aminoácidos Establecida en SEQ ID NO: 7, 11, ó 13 que son isoformas de origen natural de los polipéptidos BSL1, BSL2, o BSL3, o polipéptidos recombinantes correspondiente.

Descritas en el presente documento son proteínas de fusión aisladas que comprenden los polipéptidos relacionados con B7, o sus porciones o derivados, como se describe en el presente documento. En un aspecto, la proteína de fusión comprende una porción del dominio extracelular de un polipéptido relacionado con B7 condensado a otro polipéptido que altera la solubilidad, purificación, afinidad de unión, y/o valencia del polipéptido relacionado a B7. Preferiblemente, una molécula de y que dominio extracelular de los polipéptidos BSL2 se pueden unir a ADN que codifica la región de Fc de IgG1 humana para productos de fusión de ADN que codifican proteínas de fusión BSL2-Ig.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar procedimientos de aislamiento e identificación del (de los) receptor(es) contrarios de los polipéptidos relacionados con B7, que utilizan los polipéptidos relacionados con B7, proteínas de fusión, o anticuerpos afines descritos en el presente documento. En una realización, los polipéptidos BSL2, o sus porciones, se pueden incubar con extractos de proteínas obtenidas de células de respuestas inmunes o inflamatorias tales como células T, para formar un complejo BSL/receptor, y después se incuban con anticuerpos anti-BSL para aislar el complejo BSL/receptor. Como alternativa, a la proteína de fusión que comprende el polipéptido BSL2 se puede incubar con extractos de proteína obtenidas de las células de respuestas inmunes o inflamatorias, tales como Células T, y después se incuba con anticuerpos que reaccionan de manera específica con la proteína de fusión. Los receptores que se unen a los polipéptidos relacionados con B7 se esperarían que tuvieran actividad inmunomoduladora significativa.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar procedimientos de diagnóstico y kits que utilizan los factores relacionados con B7 de la presente invención, que incluyen ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, o sus fragmentos funcionales. Tales factores se pueden usar, por ejemplo, en los procedimientos de diagnóstico y kits para medir los niveles de expresión de los factores relacionados con B7, y para seleccionar diversas relacionadas con B7. Además, los ácidos nucleicos relacionados con B7 descritos en el presente documento se pueden usar para identificar anomalías cromosómicas que afectan BSL2 y para identificar variantes alélicas o mutaciones de BSL2 en un individuo o población.

Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos aislados, que incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, que son especialmente reactivos con los polipéptidos relacionados con B7, proteínas de fusión, o sus porciones o derivados, como se ha descrito en el presente documento. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales se preparan para que sean reactivos de manera específica con los polipéptidos BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o sus porciones o derivados.

También se describen en el presente documento procedimientos de inmunomodulación de un sujeto humano o animal mediante la administración de composiciones de los polipéptidos relacionados con B7, proteínas de fusión, o sus porciones o derivados, como se ha descrito en el presente documento. Tales composiciones se esperarían que regulen hacia arriba o hacia abajo las actividades de las células de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T). Por ejemplo, los polipéptidos relacionados con B7 en una composición pueden interactuar con CD28 y por lo tanto regular hacia arriba la actividad celular inmune. Como alternativa, los polipéptidos relacionados con B7 en una composición pueden interactuar con CTLA-4 y por lo tanto regular hacia abajo la actividad celular inmune. En una realización, las composiciones de las proteínas de fusión ISL2-Ig administradas, por ejemplo, mediante inyección, a un sujeto para proporcionar inmunosupresión o inmunomodulación sistémica. Tales composiciones se pueden administrar solas, o en combinación con una o más moléculas inmunomoduladoras.

Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar usos de anticuerpos que son reactivos de manera específica con los polipéptidos relacionados con B7, los polipéptidos como se ha descrito en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para la inmunomodulación de un sujeto humano o animal. Tales composiciones se puede esperar que bloquee las actividades coestimuladoras de los polipéptidos relacionados con B7, y regular hacia abajo las células de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T), de acuerdo con lo anterior. En una realización, las composiciones de los anticuerpos monoclonales que son reactivos de manera específica con los polipéptidos BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o sus fragmentos, se administran, por ejemplo, mediante inyección, a un sujeto para proporcionar inmunosupresión o tolerancia inducida. Tales composiciones se pueden administrar solas, o en combinación con una o más moléculas inmunomoduladoras. Los procedimientos de inducción de tolerancia descritos en el presente documento se pueden usar de manera profiláctica para prevenir respuestas inmunes tales como rechazo de transplante (órgano sólido y médula ósea) e injertos contra enfermedad, especialmente en transplante de médula ósea autólogo. Tales usos también pueden ser útiles de manera terapéutica, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, e injerto establecido contra enfermedad de huésped en un sujeto.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar usos de vectores modificadas por ingeniería genética o células que comprenden módulos de expresión de los polipéptidos relacionados con B7 como se ha descrito en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para la inmunomodulación de un sujeto humano o animal. En una realización preferida, las células son células que presentan antígeno, tales como macrófagos, que se transfectan o transducen para permitir la expresión de uno o más de los polipéptidos relacionados con B7, incluyendo los polipéptidos BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), y después introducirse por ejemplo, mediante transplante, en el receptor. Consistente con la presente invención, los genes que codifican los polipéptidos BSL2 se pueden transfectar o transducir solos o en combinación con genes que codifican otras moléculas inmunomoduladoras.

Los objetos adicionales y ventajas proporcionadas por la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y ejemplificación en el presente documento a continuación.

Descripción de las figuras

Los dibujos anexos de las Figuras se presentan para describir además la invención y para ayudar en su entendimiento mediante la clarificación de sus diversos aspectos. En las figuras de la presente invención las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se representan por sus abreviaturas de una letra.

Las Figuras 1A-1C ilustran la secuencia de nucleótidos y aminoácidos predicha de BSL1. La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos de BSL1 (SEQ ID NO: 1) determinada a partir del clon de longitud completa aislado a partir de una genoteca ADNc preparada a partir de células endoteliales microvasculares humanas tratadas con TNF- α ; los nucleótidos 1-92 contienen la región no traducida 5'; los nucleótidos 93-95 contienen la señal de inicio de la traducción (ATG); los nucleótidos 93-962 codifican la proteína que codifica la región; los nucleótidos 963-965 contienen la señal de terminación de la traducción (TAA); los nucleótidos 963-1576 contienen la región no traducida 3'- y los nucleótidos 1577-1605 contienen la cola poly(A)+ ARN. La Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos predicha de los aminoácidos de BSL1 (SEQ ID NO: 2): 1-240 contienen el dominio extracelular predicho (ECD). La Figura 1C muestra la secuencia de nucleótidos de BSL1 (SEQ ID NO: 3) determinada a partir del clon de longitud completa aislado de una genoteca de ADNc preparada a partir de células de monocitos diferenciadas GM-CSF/IL-4; los nucleótidos 1-92 contienen la región no traducida 5'; los nucleótidos 93-95 contienen la señal de inicio de la traducción (ATG); los nucleótidos 93-962 contienen la secuencia codificadora de las proteínas; los nucleótidos 963-965 contienen la señal de parada de traducción (TAA); y los nucleótidos 963-3621 contienen la región no traducida 3'- (la secuencia única se muestra en letra negra).

Las Figuras 2A-2B ilustran la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de la construcción de fusión BSL1-Ig. La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos de la construcción de fusión BSL1-Ig (SEQ ID NO: 4); los nucleótidos 1-72 codifican la secuencia de señal predicha CD5; los nucleótidos 73-78 contienen el sitio de restricción SpeI; los nucleótidos 78-729 codifican el ECD de BSL1 predicho; los nucleótidos 730-1440 codifican la porción de Fc de IgG1 humana; y los nucleótidos 1441-1443 contienen la señal de parada de la traducción (TGA). Figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos predicha de BSL1-Ig (SEQ ID NO: 5).

Las Figuras 3A-3F ilustran las secuencias de nucleótidos y secuencia predicha de aminoácidos de los clones BSL2. La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos del clon BSL2-4616811 (SEQ ID NO: 6); los nucleótidos 1-12 incluyen la secuencia de vectores; los nucleótidos 121-123 contienen la señal de inicio de la traducción (ATG); entre los nucleótidos 204-205 existe el sitio de escisión de péptidos de señal predicho; los nucleótidos 1516-1587 codifican el dominio de transmembrana predicho; los nucleótidos 1723-1725 contienen la señal de terminación de la traducción (TGA). La Figura 3B muestra la secuencia de aminoácidos predicha del clon BSL2-4616811 (SEQ ID NO: 7); aminoácidos (1-465) contienen el ECD predicho. La Figura 3C muestra la secuencia de nucleótidos del clon BSL2-L165-21 (SEQ ID NO: 10); los nucleótidos 1-3 codifican la señal de inicio de traducción (ATG); entre los nucleótidos 84-85 está el sitio de escisión del péptido señal predicho; los nucleótidos 742-813 codifican el dominio de transmembrana predicho; los nucleótidos 949-951 contienen la señal de terminación predicha (TGA). La Figura 3D muestra la secuencia de aminoácidos predicha del clon BSL2-L165-21 (SEQ ID NO: 11); los aminoácidos 1-247 contienen el EDC predicho. La Figura 3E muestra la secuencia de nucleótidos del clon BSL2-L165-35b (SEQ ID NO: 12); los nucleótidos 1-3 codifican la señal de inicio de la traducción (ATG); entre los nucleótidos 84-85 está el sitio de escisión del péptido señal predicho; los nucleótidos 742-813 codifican el dominio de transmembrana predicho; los nucleótidos

ES 2 300 340 T3

949-951 contienen la señal de terminación de la traducción (TGA). La Figura 3F muestra la secuencia de aminoácidos predicha del clon BSL2-L165-35b (SEQ ID NO: 13); los aminoácidos 1-247 contienen el ECD predicho.

Las Figuras 4A-4B ilustran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos predichas de la construcción de fusión BSL2-4616811-Ig. La Figura 4A muestra la secuencias de nucleótidos del clon BSL2-4616811-Ig (SEQ ID NO: 8); los nucleótidos 1-3 contienen la señal de inicio de la traducción (ATG); los nucleótidos 1-1394 codifican la secuencia nativa BSL2-4616811; el nucleótido 1395 es una mutación silenciosa introducida para facilitar la construcción de la proteína de fusión; los nucleótidos 1396-2097 codifican la porción de Fc de IgG1 humana; los nucleótidos 2095-2097 contienen la señal de terminación de la traducción (TGA).

La Figura 4B muestra la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión BSL2-4616811-Ig (SEQ ID NO: 9); los aminoácidos 1-465 contienen la secuencia nativa de BSL2-4616811; aminoácidos 466-698 contienen el dominio de Fc de la IgG humana.

Las Figuras 5A-5B ilustran la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de BSL3. La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos de BSL3 (SEQ ID NO: 14); los nucleótidos 1-326 contienen la región no traducida 5'; los nucleótidos 327-329 contienen la señal de inicio de la traducción (ATG); los nucleótidos 981-1055 codifican un dominio de transmembrana predicho; los nucleótidos 1146-1148 contienen la señal de terminación de la traducción (TGA) La Figura 5B muestra la secuencia de aminoácidos predicha de BSL3 (aminoácidos 1-273) (SEQ ID NO: 15); aminoácidos 1-219 contienen el EDC predicho ECD.

Las Figuras 6A-6B ilustran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos predicha de la construcción de fusión BSL3-Ig.

La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos de BSL3-Ig (L232-6) (SEQ ID NO: 16); los nucleótidos 1-3 contienen la señal de inicio de la traducción (ATG); los nucleótidos 1-651 codifican la secuencia nativa de BSL3; los nucleótidos 652-654 codifican una secuencia artificial introducida durante la construcción; los nucleótidos 655-1356 codifican el dominio de Fc de la IgG humana.

La Figura 6B muestra la secuencia de aminoácidos predicha de BSL3-Ig (L232-6) (SEQ ID NO: 17); los aminoácidos 1-217 contienen la secuencia nativa BSL3; el aminoácido 218 contiene una secuencia artificial introducida durante la construcción; los aminoácidos 219-451 contienen el dominio de Fc de la IgG humana.

Las Figuras 7A-7H ilustran los reactivos y resultados del análisis de expresión realizado para BSL1, BSL2, y BSL3.

La Figura 7A muestra la secuencia de nucleótidos de la sonda de BSL1 (SEQ ID NO: 18) usada para el análisis de transferencia de Northern.

La Figura 7B muestra la secuencia de nucleótidos de la sonda de BSL2 (SEQ ID NO: 19) usada para el análisis de transferencia de Northern.

La Figura 7C muestra la secuencia de nucleótidos de la sonda de BSL3 (SEQ ID NO: 20). La Figura 7D muestra los niveles de BSL1, BSL3, y ARNm de BSL3 ARNm observados en diversos tipos de células como se determina mediante el análisis de transferencia de Northern; "PBT" indica Células T de sangre periférica; "CD3/CD28" indica la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28; "PMA" indica la estimulación con forbol 12 miristato 13 acetato; "LPS" indica la estimulación con lipopolisacárido; "PBM" indica monocitos de sangre periférica; "PHA" indica la estimulación con fitohemaglutinina; "GM-CSF/IL-4" indica la estimulación con GM-CSF e IL-4; "HMVEC" indica células endoteliales microvasculares humanas; "TNF-alfa" indica la estimulación con TNF-alpha; y "H292" (sin) indica células H292 sin suero. Figura 7E muestra los niveles de expresión de BSL3 en diversos tipos de tejido como se determina mediante análisis de transferencia de Northern transferencias comercialmente disponibles usando la sonda marcada radiactivamente BSL3/KpnI+ XbaI. La Figura 7F muestra los niveles de expresión de BSL3 en diversos tipos de tejido como se determina mediante análisis de hibridación de microdisposiciones comercialmente disponibles usando la sonda marcada radiactivamente BSL3/KpnI+ XbaI. La Figura 7G muestra los niveles de expresión de BSL1 en diversos tipos de tejido como se determina mediante la PCR cuantitativa. La Figura 7H muestra los niveles de expresión de BSL3 en diversos tipos de tejidos como se determina mediante PCR cuantitativa.

Las Figuras 8A-8E ilustran los resultados de los análisis de PCR realizados para determinar los niveles relativos de los transcritos BSL2-4616811 o BSL2-L165-35b en diversos tipos de células, con o sin estimulación. Representando los puntos de flecha en la parte superior de las bandas la transcripción de BSL2-4616811; representando los puntos de flecha en la parte inferior el transcrito BSL2-L165-35b. La Figura 8A muestra los resultados para los tipos de células Raji, Ramos, PM-LCL, y PL-LCL, con o sin PMA y estimulación con ionomicina. La Figura 8B muestra los resultados para las células CE-LCL, tipos de células HL60, Thp1, y HUVEC, con o sin estimulación. La Figura 8C muestra los resultados de Células T de sangre periférica con o sin PMA y estimulación con ionomicina. Se muestran los resultados de las células aisladas de dos donantes separados (donante 079 y donante 124). La Figura 8D muestra los resultados para las células CEM y HUT78, con o sin PMA y estimulación con ionomicina. Figura 8E muestra los resultados de una reacción de PCR usando el plásmido BSL2-4616811 como molde. Franja 1: escala de ADN Lambda BstEII; franja 2: producto de PCR. Los puntos de flecha de la parte superior al tamaño del producto de PCR predicho a partir

del transcrito BSL2-4616811. Los puntos de flecha de la parte inferior del producto de PCR predicho para el transcrito de BSL2-L165-35b. Los resultados demuestran que el cebador directo se une de manera preferencial al sitio de unión específico en el primer plegamiento variable en lugar de para el sitio homólogo en el segundo plegamiento variable BSL2-4616811.

5

Las Figuras 9A-9F ilustran los resultados de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) realizando usando anticuerpos monoclonales de BSL1, BSL2, y BSL3. La Figura 9A muestra el análisis de FACS de células de pulmón epiteliales A549 usando anticuerpos monoclonales BSL1. La Columna 1: sin anticuerpos monoclonales; columna 2: control de isótopos; columna 3: sobrenadante de hibridoma BSL1 32. La Figura 9B muestra análisis de FACS de células de pulmón epiteliales A549 usando los anticuerpos monoclonales BSL2-4616811. Columna 1: sin anticuerpos monoclonales; columna 2: control de isótopos; columna 3: BSL2 MAb 1 F7G2; columna 4: BSL2 Mab 2B1007; columna 5: BSL2 Mab 3E6D3; columna 6: BSL2 Mab 4C2C6; columna 7: BSL2 Mab 5D7E2. La Figura 9C muestra análisis de FACS de diversos tipos de células usando anticuerpos monoclonales BSL3. La Figura 9D muestra análisis de FACS de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) con o sin estimulación por TNF-alpha usando anticuerpos monoclonales BSL3. Las Figuras 9E-9F muestran análisis de FACS de monocitos de sangre periférica (Los PBMC) con o sin estimulación por GM-CSF/IL4 o PHA usando anticuerpos monoclonales BSL3. La Figura 9E muestra los resultados de células aisladas a partir del donante 126; La Figura 9F muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 145.

Las Figuras 10A-10E ilustran la coestimulación de Células T se sangre periférica usando BSL2-4616811-Ig (BSL2vcvcIg) y proteínas de fusión BSL3-Ig en la presencia de anticuerpo monoclonal CD3. La proteína de fusión L6-Ig se usa como control negativo. La Figura 10A muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 010. La Figura 10B muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 127. Las Figuras 10C-10D muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 78. Las Figuras 10E-10F muestran los resultados de las células aisladas a partir del donante 124. Las Figuras 10G-10J ilustran el bloqueo de la coestimulación de las Células T de sangre periférica usando los anticuerpos monoclonales BSL2 o BSL3. Las Figuras 10G y 10I muestran los resultados de las células estimuladas con anticuerpos monoclonales CD3 y BSL2-4616811-Ig (BSL2vcvcIg) y bloqueo con anticuerpos monoclonales BSL2. Columna 1: BSL2-1 F7G2 MAb; columna 2: BSL2-2B10D7 MAb; columna 3: BSL2-3E6D3 MAb; columna 4: BSL2-5D7E2 MAb; y columna 5: anticuerpo de control de isótopos. Figura 10G muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 010; Figura 10I muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 127. Las Figuras 10H y 10J muestra los resultados de las células estimuladas con los anticuerpos monoclonales CD3 y proteína de fusión BSL3-Ig y bloqueo con anticuerpos monoclonales BSL3. Columna 1: BSL3-1A4A1 MAb; columna 2: BSL3-2B6H7 MAb; y columna 3: anticuerpo de control de isotopos. La Figura 10H muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 010; La Figura 10J muestra los resultados de las células aisladas a partir del donante 127.

35

Descripción detallada de la invención

Identificación de factores relacionados con B7

40

Se han identificado y caracterizado tres factores relacionados con B7, denominados BSL1, BSL2, y BSL3,. Tales factores relacionados con B7 pueden proporcionar una base molecular para la activación de células de respuesta inmune o inflamatoria, tales como las Células T, en momentos diferentes y en enfermedades y estados patológicos. Además, los factores relacionados con B7 descritos se pueden utilizar en la prevención o tratamiento de ciertas enfermedades mediante la modulación de la actividad celular de respuesta inmune o inflamatoria, tales como las Células T, usando los procedimientos descritos en detalle en el presente documento. Tales procedimientos se usar como profilaxis o tratamientos para cánceres o trastornos relacionados inmunes como se detalla más adelante.

45

Identificación de los genes relacionados con B7 de las genotecas de ADNc: Para identificar los factores relacionados con B7, genotecas de ADNc se pueden construir y analizar usando varias técnicas bien establecidas. Se puede obtener ARN a partir de células que expresan los factores relacionados con B7-1 y/o B7. Por ejemplo, ARNm se puede obtener a partir de células mononucleares de la sangre periférica humana periférica. Como alternativa, se puede obtener ARNm de diversos subconjuntos de células B, incluyendo células tumorales aisladas de pacientes con linfoma de no Hodgkin (L. Chaperot *et al.* (1999) Exp. Hematol. 27:479-88). Tales células se conoce que expresan B7-1 y, de este modo, pueden expresar los factores relacionados con B7, y también pueden servir como una fuente del ARNm para la construcción de la genoteca de ADNc.

55

El ARNm celular total se puede aislar mediante una diversidad de técnicas, por ejemplo, extracción de guanidinio-tiocianato (J.M. Chirgwin *et al.* (1979) Biochemistry 18: 5294-5299; Chomczynski *et al.* (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9). Después del aislamiento, poly (A)+ ARN se puede purificar usando oligo(dT) celulosa. El poly (A)+ ARN se puede usar como un molde para la síntesis de ADNc utilizando la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR; véase C.R. Newton *et al.* (1997) PCR 2nd Ed, Scientific Publishers, Oxford, England). Después de la transcripción inversa, el ADNc se puede convertir en ADN de cadena doble usando técnicas convencionales (véase H. Okayama *et al.* (1982) Mol. Cell. Biol. 2:161; U. Gubler *et al.* (1983) Gene 25: 263).

65

La clonación de los ADNcs de cadena doble se puede llevar a cabo usando las técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase J. Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY; F.M. Ausubel *et al.* (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons,

New York, NY). El uso de adaptadores sintéticos antes de la clonación se prefiere de manera particular, ya que obvia la necesidad de escindir el ADNc con una o más enzimas de restricción (véase, por ejemplo, E.C. Bottger (1989) *Biotechniques* 7: 925-6, 928-90). Usando este procedimiento, se pueden añadir adaptadores no autocomplementarios, de quinasa al ADN antes de la unión con el vector. Virtualmente se puede emplear cualquier adaptador.

Se puede expresar una genoteca de ADNc cuando se coloca en la orientación codificante en un vector que suministra un promotor apropiado. Los vectores también pueden incluir un origen de replicación y diversas secuencias de potenciador, secuencias de aceptor/donante de ajuste, y secuencias de poliadenilación. Los vectores pueden además incluir un marcador que permite la selección de las células que contienen la vector de construcción. Los marcadores pueden ser un gen inducible o no inducible y generalmente permitir la selección positiva bajo inducción, o sin inducción, respectivamente. Los ejemplos de genes marcadores incluyen neomicina, dihidrofolato reductasa, glutamina sintetasa, y similares. Notablemente, se pueden obtener genotecas de ADNc a partir de diversas fuentes comerciales (por ejemplo, Incyte Genomics, Inc., St. Louis, MO; Stratagene, La Jolla, CA).

La genoteca de ADNc se puede usar para clonar factores relacionados con B7 que utilizan técnicas de clonación de expresión (véase B. Seed *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3365-3369; A. Aruffo *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8573-8577). En una realización el y de plásmido se introduce en una línea celular mediante procedimientos conocidos de transfección (por ejemplo, DEAE-Dextran) y se dejan replicar y expresar las inserciones de ADNc. El antígeno B7-1 se agota con las células transfectadas usando un anticuerpo monoclonal anti-B7-1 (por ejemplo, 133 y B1.1) y anti-murino IgG y perlas inmunomagnéticas revestidas con IgM. Los transfectantes que expresan los factores relacionados con B7 se seleccionan de manera positiva mediante incubación con CTLA-4-Ig y CD28-Ig seguido del apelmazamiento con Ig inmunoglobulina antihumana. Después del apelmazamiento, se recupera el ADN episomal se recupera de las células apelmazadas y se transfectan en un huésped bacteriano competente, preferiblemente *Escherichia coli* (*E. coli*). El ADN de plásmido se vuelve a introducir posteriormente en la línea celular y el ciclo de expresión y de apelmazamiento repetido al menos dos veces. Después del ciclo de apelmazamiento final, el ADN de plásmido se prepara a partir de colonias individuales, se transfectan en la línea celular y se analizan para expresión de los polipéptidos relacionados con B7 mediante inmunofluorescencia indirecta con CTLA-4-Ig y CD28-Ig. Después de la clonación, se preparan los plásmidos a partir de los clones reactivos en gran medida con la CTLA-4-Ig, y después se secuencian usando técnicas de secuenciación convencional (revisión en G.W. Slater *et al.* (1998) *Electrophoresis* 19: 1525-41).

Identificación de los genes relacionados con B7 en las bases de datos de la secuencia de proteína: Como alternativa, se pueden identificar los factores relacionados con B7 mediante selección de bases de datos de las secuencias disponibles. La secuencia de polipéptidos codificada mediante un factor de B7 identificado previamente (por ejemplo, B7-1, B7-2, o B7-H1) o un factor relacionado con B7 descrito en el presente documento (por ejemplo, BSL1, BSL2, o BSL3), se puede comparar con la secuencia de polipéptidos presentes en diversas bases de datos de proteínas. Las bases de datos de las secuencias de proteínas disponibles públicamente, por ejemplo, GenBank, GenPept, SWISS-PROT, Banco de Datos de Proteínas (PDB), Recurso de Información de Proteínas (PIR), Human UniGene (National Center for Biotechnology Information), se pueden usar para determinar si están presentes factores relacionados con B7 en especies de mamíferos, preferiblemente un ser humano. Como alternativa, las bases de datos de la secuencia de proteínas de propiedad privada, por ejemplo, las bases de datos de secuencias de Incyte Genomics (Incyte Genomics), se pueden usar para identificar los factores relacionados con B7. Las bases de datos con secuencias relativamente poco redundantes, por ejemplo, bases de datos de PIR o SWISS-PROT, se pueden usar para mejorar la significación estadística de una coincidencia de secuencias. Sin embargo, las bases de datos que son más exhaustivas y actualizadas, por ejemplo, se prefieren bases de datos de GenBank, GenPept, e Incyte Genomics (Incyte Genomics).

Cualquier procedimiento conocido en la técnica se puede usar para alinear y comparar la secuencia del factor de B7 identificada anteriormente con las secuencias presentes en las bases de datos de la secuencia de proteínas. Preferiblemente, se usa el programa BLAST (S.F. Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; S. Karlin *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-68; S. Karlin *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-7). BLAST identifica las alineaciones locales entre la secuencia de la proteína identificada anteriormente y las secuencias de proteína en la base de datos, y predice la probabilidad de la alineación local que se produce por casualidad. Aunque los programas BLAST originales utilizados sin huecos, más recientemente los programas BLAST desarrollados tales como WU-BLAST2/BLAST v2.0 (S. F. Altschul *et al.* (1996) *Methods Enzymol.* 266, 460-480) se han modificado para incorporar alineaciones locales con huecos similares a los programas SSEARCH (T.F. Smith *et al.* (1981) *J. Mol. Biol.* 147: 195-197) y FASTA (W.R. Pearson (1990) *Methods Enzymol.* 183: 63-98). Además, se han desarrollado los programas repetido específico de la posición BLAST (PSI-BLAST) para identificar las similitudes de secuencias débiles pero significativamente relevantes (S.F. Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Además, los programas iniciados por éxitos de patrón BLAST (PHI-BLAST) se han diseñado para identificar patrones específicos o motivos de secuencia compartidos por las proteínas relacionadas de manera distante (Z. Zhang *et al.* (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:3986-3990). Los programas BLAST especializados también están disponibles para realizar investigaciones de secuencias de genoma humano, microbiana, y malaria, así como investigaciones para las secuencias de consenso del vector, de inmunoglobulina, y humana predicha (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD).

Tanto los programas FASTA como BLAST identifican coincidencias de secuencias exactas muy cortas entre la secuencia de duda y las secuencias de las bases de datos, analizan las concordancias de las secuencias cortas ("éxitos") para determinar si los tramos más largos de la secuencia similar están presentes, y después optimizar los mejores éxitos

mediante programación dinámica (S.F. Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410; W.R. Pearson, anterior). Por el contrario, el programa SSEARCH compara la secuencia de la duda con todas las secuencias en la base de datos mediante comparaciones de secuencia de acierto de pares (T.F. Smith *et al.*, anterior). De este modo, el programa SSEARCH se considera más sensible que los programas BLAST y FASTA, pero también es significativamente más lento. Los programas BLAST y FASTA utilizan varias aproximaciones para incrementar su velocidad de investigación, y utilizan parámetros estadísticos (véase más adelante) para incrementar la sensibilidad y selectividad para aproximar el comportamiento del programa SSEARCH. Un programa de alineación de la secuencia particular se puede elegir basándose en los requerimientos de una investigación de secuencia, o preferencias particulares. En algunos casos, puede ser necesario usar más de un programa de alineación de investigación para confirmar los resultados de la alineación de la investigación o resolver los resultados de investigación ambiguos.

De manera típica, el análisis BLAST emplea (i) una matriz de puntuación (tal como, por ejemplo, BLOSSUM 62 o PAM 120) para asignar un valor de homología ponderada a cada residuo y (ii) un(os) programa(s) de filtración (tales como SEG o XNU) que reconoce y elimina las secuencias altamente repetidas a partir del cálculo. Un corte de homología apropiado se determina después mediante la realización de BLAST (usando una matriz de puntuación particular y programa de filtración) entre las secuencias que se sabe que están relacionadas. Se entenderá que se pueden usar otras de puntuación y programas de selección apropiado cuando el corte se calibra como se ha descrito anteriormente. Es decir, el punto de corte particular puede variar cuando se usan los diferentes parámetros convencionales, pero corresponderá a las puntuaciones P(N) mostradas cuando las secuencias altamente relacionadas se comparan usando los parámetros particulares.

Ácidos nucleicos relacionados con B7

Un aspecto de la presente invención pertenece a los ácidos nucleicos que tienen una secuencia de ácidos nucleicos que tienen una secuencia de ácidos nucleicos tal como BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12). Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser ADN o RNA. Un ácido nucleico preferido es un ADN que codifica el BSL2 humano (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13). Los fragmentos o sus equivalentes funcionales descritos en el presente documento son ácidos nucleicos que comprenden al menos 15, 20, 25, 50, 60, 100, 200, 240, 255, 270, 300, 305, 310, 410, 500, 630, 700, ó 1000 nucleótidos contiguos.

El término “aislado” como se usa a lo largo de esta solicitud de refiere a ácido nucleico relacionado con B7, polipéptido, péptido, fusión de proteína, o anticuerpo, que está sustancialmente sin material celular o medio de cultivo. Una molécula de aislada o sustancialmente purificada contiene menos de aproximadamente 50%, Preferiblemente menos de aproximadamente 25%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, de los componentes celulares con los que está asociado.

El término “equivalente funcional” se pretende que incluyan incluyen secuencias de nucleótidos que codifican los factores relacionados con B7 funcionalmente equivalentes. Un equivalente funcional de la proteína relacionada con B7 o variantes que realizan al menos una función característica de la proteína relacionada con B7 (por ejemplo, actividad de unión a ligando, antigénica, intra-, o intercelular). Por ejemplo, polimorfismos de la secuencia de ADN dentro de la secuencia de nucleótidos de un factor relacionado con B7, especialmente aquellos dentro de la tercera base de un codón, pueden dar como resultado mutaciones “silenciosas”, que no afectan a la secuencia de aminoácidos codificada de la proteína debida a la degeneración del código genético.

Las realizaciones preferidas incluyen un ácido nucleico aislado que comparte al menos una identidad de secuencia 99, 99,5, o 100% con una secuencia de polinucleótidos de BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12). Esta secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a la secuencias de nucleótidos de BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12) o pueden incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos cuando se compara con la secuencia de referencia.

“Identidad”, como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencia de polinucleótidos, como se determina mediante comparación de de las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de la secuencia entre la secuencia de polipéptidos o de polinucleótidos, como puede ser el caso, como se determina mediante la coincidencia entre hebras de tales secuencias. “Identidad” y “similitud” se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos, que incluyen pero no se limitan a los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics y Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Secuencia Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Secuencia Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Secuencia Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988).

Para los ácidos nucleicos, la identidad de secuencia se puede determinar mediante comparación de las secuencias de duda con las secuencias de las bases de datos de las secuencias disponibles públicamente (NCBI) usando el algoritmo BLASTN2 (S.F. Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res., 25: 3389-3402). Los parámetros para una investigación típica son: E = 0,05, v = 50, B = 50, en las que E es el corte de puntuación probablemente esperado, V es el número de entradas de la base de datos restituidas en la reseña de los resultados, y B es el número de alineaciones de secuencias restituidas en la reseña de los resultados (S.F. Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410).

En otro planteamiento, la identidad de las secuencias de nucleótidos se pueden calcular usando la siguiente ecuación: % de identidad = (número de nucleótidos idénticos)/(longitud de alineación de los nucleótidos) * 100. Para este cálculo, la longitud de alineación incluye huecos internos pero no huecos terminales. Como alternativa, la identidad de secuencia de nucleótidos se puede determinar de manera experimental usando las condiciones de hibridación específica descritas más adelante.

Las alteraciones de ácidos nucleicos se seleccionan entre el grupo constituido por al menos una supresión, sustitución de nucleótidos, que incluye transición y transversión, inserción, o modificación (por ejemplo, mediante análogos de ARN o ADN, desfosforilación, metilación, o marcaje). Las alteraciones se pueden producir en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte en las posiciones terminales, con espacios intermedios o bien individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia. Las alteraciones de una secuencia de ácidos nucleicos de BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12) pueden crear mutaciones no codificantes, de codificación errónea, o de desplazamiento de fase en la secuencia codificante, y por lo tanto después del polipéptido codificado por el ácido nucleico.

En el presente documento se describen variantes de ajuste derivadas de las secuencias de ácidos nucleicos de BSL1 (SEQ ID NO: 1 y 3), BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12), o BSL3 (SEQ ID NO: 14). Como se usa en el presente documento, el término "variante de ajuste" se refiere a ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados con B7 variantes producidos mediante un procedimiento diferencial del (de los) transcrito(s) de ADN genómico. Una variante de ajuste alternativo puede comprender, por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12) descritas en el presente documento. Las variantes de ajuste alternativas también pueden comprender otras combinaciones de intrones 7 exones de BSL1, BSL2, o BSL3, que se pueden determinar por los expertos en la técnica. Las variantes de ajuste alternativas se pueden determinar de manera experimental, por ejemplo, mediante aislamiento y análisis de los ARN celulares (por ejemplo, transferencia de Southern o PCR), o o mediante selección de genotecas de ADNc usando las sondas o cebadores de ácido nucleico relacionadas con B7 o descritas en el presente documento. En otro planteamiento, se pueden predecir variantes de ajuste alternativas usando diversos procedimientos, programas de ordenador, o o sistemas de ordenador disponibles para los profesionales en el campo.

Se pueden encontrar procedimientos generales para la predicción del sitio de ajuste en Nakata, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 5327-5340. Además, se pueden predecir sitios de ajuste usando, por ejemplo, los sistemas de ordenador GRAIL™ (E.C. Uberbacher y R.J. Mural, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11261-11265; E.C. Uberbacher, 1995, *Trends Biotech.*, 13: 497-500; <http://grail.lsd.ornl.gov/grailexp>); GenView (L. Milanesi *et al.*, 1993, *Proceedings of the Second International Conference on Bioinformatics, Supercomputing, y Complex Genome Analysis*, H.A. Lim *et al.* (eds), World Scientific Publishing, Singapore, páginas 573-588; http://125.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwgene_help.html); SpliceView (<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene>); y HSPL (V.V. Solovyev *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22:5156-5163; V.V. Solovyev *et al.*, 1994, "The Prediction of Human Exons by Oligonucleotide Composition y Discriminant Analysis of Spliceable Open Reading Frames", R. Altman *et al.* (eds), *The Second International conference on Intelligent systems for Molecular Biology*, AAAI Press, Menlo Park, CA, páginas. 354-362; V.V. Solovyev *et al.*, 1993, "Identification Of Human Gene Functional Regions Based On Oligonucleotide Composition", L. Hunter *et al.* (eds), *In Proceedings of First International conference on Intelligent System for Molecular Biology*, Bethesda, páginas. 371-379).

De manera adicional, programas de ordenador tales como GeneParser (E.E. Snyder y G.D. Stormo, 1995, *J. Mol. Biol.* 248: 1-18; E.E. Snyder y G.D. Stormo, 1993, *Nucl. Acids Res.* 21 (3): 607-613; <http://mcdb.cotorado.edu/~eesnyder/GeneParser.html>); MZEF (M.Q. Zhang, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 565-568; <http://argon.cshl.org/genefinder>); MORGAN (S. Salzberg *et al.*, 1998, *J. Comp. Biol.* 5: 667-680; S. Salzberg *et al.* (eds), 1998, *Computational Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science, New York, NY, páginas 187-203); VEIL (J. Henderson *et al.*, 1997, *J. Comp. Biol.* 4: 127-141); GeneScan (S. Tiwari *et al.*, 1997, *CABIOS (BioInformatics)* 13: 263-270); GeneBuilder (L. Milanesi *et al.*, 1999, *Bioinformatics* 15: 612-621); Eukaryotic GeneMark (J. Besemer *et al.*, 1999, *Nucl. Acids Res.* 27: 3911-3920); y FEXH (V.V. Solovyev *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22: 5156-5163). Además, se pueden predecir sitios de ajuste (es decir, sitios de ajuste anteriores o potenciales) en las secuencias de ADNc usando, por ejemplo, los programas RNASPL (V.V. Solovyev *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22: 5156-5163); o INTRON (A. Globek *et al.*, 1991, *INTRON versión 1.1 manual*, Laboratory of Biochemical Genetics, NIMH, Washington, D.C.).

Los polimorfismos de origen natural de BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12) se describen en el presente documento. Como entenderán los expertos en la técnica, los genomas de todos los organismos experimentan mutación espontánea a lo largo de su evolución continua que genera formas variantes de las secuencias de genes (Gusella, 1986, *Ann. Rev. Biochem.* 55: 831-854). Los polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (RFLPs) incluyen variaciones en las secuencias de ADN que alteran la longitud de un fragmento de restricción en la secuencia (Botstein *et al.*, 1980, *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331 (1980). RFLP se han usado ampliamente en análisis genéticos de seres humanos y animales (véase el documento WO 90/13668; el documento WO 90/11369; Donis-Keller, 1987, *Cell* 51: 319-337; Lander *et al.*, 1989, *Genetics* 121: 85-99). Las repeticiones en tándem cortas (STR) incluyen motivos repetidos en tándem de di-, tri- y tetranucleótidos, también, denominados polimorfismos de repetición en tándem de número variable (VNTR). Los VNTR se han usado en análisis de identidad y paternidad (Patente de Estados Unidos N° 5.075.217; Armour *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 307: 113-115; Horn *et al.*, documento WO 91/14003; Jeffreys, documento EP 370,719), Y en un gran número de estudios de mapeo genéticos.

Los polimorfismos de nucleótidos individuales (SNPs) arson hasta ahora más frecuentes que RFLPS, STR, y VN-TR. Los SNP se pueden producir en las secuencias de codificación de proteínas (por ejemplo, exón), o no codificantes (por ejemplo, intrón, 5'UTR, 3'UTR). Los SNP en las regiones codificantes de proteínas pueden comprender mutaciones silenciosas que no alteran la secuencia de aminoácidos secuencia de una proteína. Como alternativa, los SNP en las regiones codificantes de proteínas pueden producir cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, descritas en detalle más adelante. En algunos casos, los SNP pueden dar lugar a la expresión de una proteína defec-
 5 tuosa u otra variante y, potencialmente, una enfermedad genética. Los SNP dentro de las secuencias que codifican las proteínas pueden dar lugar a enfermedades genéticas, por ejemplo, in los genes de β -globina (anemia de células falciformes) y CFTR (fibrosis cística). En las secuencias no codificantes, los SNP también pueden dar como resultado la expresión de proteínas defectuosas (por ejemplo, como resultado de ajuste defectuoso). Otros polimorfismos de
 10 nucleótidos individuales no tienen efectos fenotípicos.

Los polimorfismos de nucleótidos individuales se pueden usar de la misma manera que los RFLP y VNTR, pe-
 15 ro ofrecen varias ventajas. Los polimorfismos de nucleótidos individuales se tienden a producir con una frecuencia mayor y están espaciados de manera típica más uniformemente a través de todo el genoma que otros polimorfis- mos. También, los SNP diferentes son a menudo más fáciles de distinguir que otros tipos de polimorfismos (por ejemplo, mediante el uso de ensayos que emplean sondas o cebadores de hibridación específicos de alelos). En una realización de la presente invención, un ácido nucleico de BSL2 contiene al menos un SNP. Diversas combinacio-
 20 nes de estos SNP también están comprendidas por la invención. En un aspecto preferido, el SNP relacionado con B7 está asociado a un trastorno del sistema inmune, tales como los trastornos descritos en detalle en el presente documento.

Además se describen en el presente documento moléculas de ácidos nucleicos que comportan una homología moderada con las secuencias de ácidos nucleicos de BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, 6 12), y se hibridan a las moléculas de
 25 ácido nucleico de BSL2 en condiciones de hibridación de rigurosidad moderada. Lo más preferido son las moléculas de ácido nucleico que comparten una homología sustancial con las moléculas de ácido nucleico de BSL2 y se hibridan a las moléculas de ácido nucleico de BSL1, BSL2, o BSL3 en condiciones de hibridación de alta rigurosidad. Como se usa en el presente documento, la frase "homología moderada" se refiere a las secuencias que comparten al menos un 60% de identidad de secuencia con una secuencia de referencia (por ejemplo, BSL1, BSL2 o BSL3), mientras que la
 30 frase "homología sustancial" se refiere a las secuencias que comparten al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia de referencia. Sin embargo, se reconoce que los polipéptidos y los ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos contienen menos que el nivel descrito anteriormente de homología que surge como variantes de ajuste, o que se modifican mediante las sustituciones de aminoácidos conservadoras (o sustitución de codones degenerados) se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

La frase "condiciones de hibridación" se usa en el presente documento para referirse a las condiciones bajo las que se forma un híbrido del ácido nucleico de doble cadena a partir de dos cadenas individuales de ácidos nucleicos, y permanece estable. Como conocen los expertos en la técnica, la estabilidad de la secuencia de híbridos se refleja en la temperatura de fusión (T_m) del híbrido (véase F.M. Ausubel *et al.*, Eds, (1995) Current Protocols in Molecular Biology,
 40 John Wiley y Sons, Inc., New York, NY). La T_m disminuye aproximadamente 0,5°C a 1,5°C con cada disminución del 1% en la homología de la secuencia. En general, la estabilidad de una secuencia híbrida es una función de la longitud y contenido de guanina/citosina del híbrido, la concentración del ion sodio, y la temperatura de incubación. De manera típica, la reacción de hibridación se realiza inicialmente en condiciones de baja rigurosidad, seguido de lavados de rigurosidad variable, pero más alta. La referencia a rigurosidad de hibridación se refiere a tales condiciones
 45 de lavados.

Condiciones de "rigurosidad alta" se pueden mejorar, por ejemplo, mediante hibridación en formamida al 50%, 5 X de solución de Denhardt, 5 X de SSPE, y 0,2% de SDS a 42°C., seguido de lavado en 0,1 X de SSPE y 0,1% de SDS a 65°C. Por comparación, "rigurosidad moderada" se puede proporcionar, por ejemplo, mediante hibridación en
 50 50% de formamida, 5 X de solución de Denhardt, 5 X de SSPE, y 0,2% de SDS a 42°C, seguido de lavado en 0,2 X de SSPE y 0,2% de SDS a 65°C. Además, condiciones de "rigurosidad baja" se pueden proporcionar, por ejemplo, mediante hibridación en 10% de formamida, 5 X de solución de Denhardt, 6 X de SSPE, y 0,2% de SDS a 42°C, seguido de lavado en 1 X de SSPE y 0,2% de SDS a 50°C. Se entiende que estas condiciones se pueden varias usando una diversidad de tampones y temperaturas bien conocidas por los expertos en la técnica.

El ácido nucleico que es una molécula de ADN que codifica al menos una porción del factor relacionado con B7 también se describe en el presente documento. Una molécula de ácido nucleico un Factor novedosos relacionado con B7 se puede obtener el ARNm presente en linfocitos B activados. También puede ser posible obtener molé-
 60 culas de ácido nucleico que codifican los factores relacionados con B7 a partir del ADN genómico de células B. De este modo, un ácido nucleico que codifica un factor relacionado con B7 se puede clonar o bien a partir de un ADNc o una librería genómica de acuerdo con los protocolos descritos en detalle en el presente documento. Los áci- dos nucleicos que codifican los factores novedoso relacionados con B7 también se pueden clonar a partir de ADN o ADNc usando las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa establecida (PCR) (véase K. Mullis *et al.* (1986) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 260; K.H. Roux (1995) PCR Methods Appl. 4: S185) de acuerdo
 65 con la información de la secuencia de ácidos nucleicos proporcionada en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico de la invención también se pueden sintetizar químicamente usando técnicas convencionales. Se co- nocen diversos procedimientos de síntesis química de polidesoxi nucleótidos, incluyendo la síntesis en fase sólida que, similar a la síntesis de péptidos, de ha automatizado completamente en los sintetizadores de de ADN dispo-

nibles comercialmente (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 4.598.049 de Itakura *et al.*; Patente de Estados Unidos nº 4.458.066 de Caruthers *et al.*; Patentes de Estados Unidos números 4.401.796 y 4.373.071 de Itakura).

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden existir variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-4% de los nucleótidos) de las moléculas de ácido nucleico que codifican los factores novedosos relacionados con B7 entre individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas las variaciones de nucleótidos y polimorfismos de los aminoácidos resultantes están dentro del alcance de la presente invención. Además, pueden existir una o más isoformas o miembros de la familia de reacción cruzada relacionadas de los factores relacionados con B7 descritos en el presente documento. Tales isoformas o miembros de la familia se definen como polipéptidos que están relacionados en función y la secuencia de aminoácidos con un factor relacionado con B7 (por ejemplo, BSL1, BSL2, o BSL3), pero codificado por los genes en diferentes loci. Además, es posible modificar la secuencia de ADN secuencia de los factores relacionados con B7 usando técnicas genéticas para producir proteínas o péptidos con las secuencias de aminoácidos.

Las mutaciones de las secuencias de ADN se pueden introducir en un ácido nucleico que codifica un factor relacionado con B7 mediante uno cualquiera de numerosos procedimientos, que incluyen aquellos para producir supresiones o inserciones sencillas, supresiones sistémicas, inserciones o sustituciones de grupos de bases o sustituciones de bases individuales, para generar las variantes deseadas. Las mutaciones de la molécula de ácido nucleico relacionada con BT para generar las sustituciones o supresiones de aminoácidos se obtienen preferiblemente mediante mutagénesis dirigida al sitio. Los sistemas de mutagénesis dirigida al sitio se conocen bien en la técnica, y se pueden obtener a partir de fuentes comerciales (véase, por ejemplo, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). La guía en la determinación de qué restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar, o suprimir sin eliminar la actividad biológica o inmunológica se puede encontrar usando programas de ordenador bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Las formas mutantes de las moléculas de ácido nucleico de BSL1, BSL2, o BSL3 se consideran que están dentro del alcance de la presente invención, donde el polipéptido o péptido expresado es capaz de modular la actividad celular inmune o inflamatorias (por ejemplo, células T).

Un fragmento de la molécula de ácido nucleico que codifica un factor novedoso relacionado con B7 se define como una secuencia de nucleótidos que tiene menos nucleótidos que la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos completa del factor relacionado con B7. Los fragmentos de ácido nucleico que codifican los polipéptidos que retienen la capacidad de unirse a su(s) ligando(s) natural(s) sobre células de respuesta inmune o inflamatoria, tales como Células T, y o bien amplifican o bloquean las respuestas inmunes (como se evidencia mediante, por ejemplo, producción de linfoquina y/o proliferación de células T mediante las Células T que han recibido una señal de activación primaria) se consideran que están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los fragmentos de ácido nucleico que codifican los polipéptidos o péptidos de un factor relacionado con B7 que retienen la capacidad de los polipéptidos o péptidos de unirse al (a los) ligando(s) relacionados con CD28 y/o CD28 y administran una señal coestimuladora a las Células T están dentro del alcance de la invención. En general, la molécula de ácido nucleico que codifica un fragmento de un factor relacionado con B7 se seleccionará entre la secuencia que codifica la proteína madura. Sin embargo, en algunos casos puede ser deseable seleccionar toda o parte de un fragmento o fragmentos de la región codificante que incluye la secuencia guía.

Se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico que corresponde a un fragmento de secuencia de ácido nucleico de BSL2 se puede usar como una sonda para ensayar una muestra biológica para la expresión de uno o más factores relacionado con B7s, o como un cebador para la secuenciación de ADN o amplificación por la PCR. Preferiblemente, tales fragmentos son al menos 8 nucleótidos contiguos de longitud, más preferiblemente al menos 12 nucleótidos contiguos de longitud, incluso más preferiblemente al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud, e incluso más preferiblemente al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud. Las moléculas de ácido nucleico dentro del alcance de la invención también pueden contener secuencias de engarce, sitios de endonucleasa de restricción modificados, y otras secuencias útiles para la clonación, expresión o purificación de proteína recombinante o sus fragmentos. Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención también se pueden conjugar con isótopos radiactivos o compuestos quimioluminiscentes, fluorescentes o radioisótopos, u otros de marcaje (por ejemplo, digoxigenina). Además, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden modificar mediante enzimas de modificación de ácido nucleico, por ejemplo, quinasas o fosfatasas. Éstas y otras modificaciones de las moléculas de ácido nucleico se conocen bien en la técnica.

Además, una molécula de ácido nucleico que codifica un factor relacionado con B7, o su fragmento biológicamente biológicamente activo, se pueden ligar a una secuencia heteróloga que codifica una proteína de fusión (también llamada proteína quimérica). Por ejemplo, puede ser útil para construir un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un factor relacionado con B7 y el dominio de Fc de IgG humana como se describe en el presente documento. Las proteínas de fusión BSL1-Ig, BSL2-Ig, y BSL3-Ig resultantes se pueden después expresar en células huésped, y usarse para preparar composiciones farmacéuticas útiles para la inmunomodulación (véase más adelante). Las proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos relacionados con B7 también se pueden usar para el aislamiento y purificación de los polipéptidos o anticuerpos relacionados con B7 (véase más adelante). Además, las proteínas de fusión se pueden usar para identificar ligandos celulares o parejas de unión para BSL1, BSL2, o BSL3 (véase más adelante).

Vectores de expresión de ácido nucleico relacionados con B7

Otro aspecto de la presente invención pertenece a vectores de expresión que comprenden un ácido nucleico que codifica al menos un factor relacionado con B7, como se describe en el presente documento, unido de manera operativa a al menos una secuencia reguladora. “Unido de manera operativa” pretende significar que la secuencia de ácido nucleico está unida a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos. Las secuencias reguladoras se conocen en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión de la proteína deseada en una célula huésped apropiada. De acuerdo con lo anterior, el término secuencia reguladora incluye, promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (véase D.V. Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185: 3-7). Se debe entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transferir y/o el tipo de polipéptido deseado expresar.

Las células huésped apropiadas para uso con la presente invención incluyen células de bacterias, hongos, levaduras, plantas, insectos, y animales, especialmente células de mamíferos y seres humanos. Los sistemas de replicación y herencia preferidos y incluyen M13, ColE1, SV40, baculovirus, lambda, adenovirus, CEN ARS, 2Pm ARS y similares. Se han aislado varios elementos reguladores (por ejemplo, promotores) y se muestra que son eficaces en la transcripción y traducción de proteínas heterólogas en los diversos huéspedes. Tales regiones reguladoras, procedimientos de aislamiento, manera de manipulación, etc. Se conocen en la técnica. Los ejemplos no limitantes de promotores bacterianos incluyen el promotor de la β -lactamasa (penicilinas), promotor de la lactosa; promotor del triptófano (trp); Promotor del operón araBAD (arabinosa); promotor P1 derivado de lambda y sitio de unión al ribosoma del gen N; y el promotor tac híbrido derivado de las secuencias de los promotores trp y lac UV5 promotores. Los ejemplos no limitantes de promotores de levaduras incluyen el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el promotor de la galactocinasa (GAL1), el promotor de la galactopiruvato, y el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1). Los promotores adecuados para las células de mamíferos incluyen, sin limitación, promotores virales, tales como los del Virus 40 de simio (SV40), virus del sarcoma de Rous (RSV), adenovirus (ADV), y virus de papiloma bovino (BPV).

Las células eucarióticas también pueden requerir secuencias de terminadores, secuencias de poliadenilación, y secuencias de potenciador que modulan la expresión génica. Las secuencias que provocan amplificación del gen también pueden ser deseables. Estas secuencias se conocen bien en la técnica. Además, también se pueden incluir las secuencias que facilitan la secreción del producto recombinante a partir de las células, que incluyen, pero no se limitan a células de bacterias, de levadura, y de animales, tales como secuencias de señal secretoras y/o secuencias de preproteínas y proproteínas. Tales secuencias se describen bien en la técnica.

Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a los plásmidos pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen, Inc., Madison, WI), y pREP (Invitrogen). Los vectores pueden contener uno o más sistemas de replicación y herencia para la clonación y expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos y uno o más módulos de expresión. Las secuencias codificantes insertadas se pueden codificar mediante procedimientos convencionales, aislarse a partir de Fuentes naturales, o prepararse como híbridos. La ligación de las secuencias codificantes a los elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores, y/o aisladores) y/o a otras secuencias que codifican los aminoácidos se puede llevar a cabo usando procedimientos establecidos.

En una realización, el vector de expresión comprende un ácido nucleico que codifica al menos una parte del polipéptido BSL2. En otra realización, el vector de expresión comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o péptido heterólogo. Tales vectores de expresión para transfectar células huésped para producir por lo tanto polipéptidos o péptidos, incluyendo proteínas de fusión o o péptidos codificados por moléculas de ácido nucleico como se describe más adelante.

Aislamiento de polipéptidos relacionados con B7

Los procedimientos de aislamiento de los polipéptidos relacionados con B7 y péptidos relacionados se describen en el presente documento. Como se usa en el presente documento, los términos “proteína” y “polipéptido” son sinónimos. Péptidos se definen como fragmentos o partes de proteínas o polipéptidos, preferiblemente fragmentos o porciones que tienen la misma función o equivalente o actividad que la proteína completa. Tanto las formas de origen natural como recombinantes de los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 se pueden usar en ensayos y tratamientos de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos para aislar y purificar directamente los polipéptidos o péptidos a partir de fuentes naturales tales como lisados celulares o extracelulares se conocen bien en la técnica (véase E.L.V. Harris y S. Angal, Eds. (1989) *Protein Purification Methods: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Inglaterra). Tales procedimientos incluyen, sin limitación, electroforesis preparativa en gel de disco, localización isoelectrónica, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), HPLC de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y de partición, y distribución en contracorriente, y las combinaciones de los mismos. Los polipéptidos de origen natural se pueden purificar a partir de muchas posibles causas, por ejemplo, plasma, células del cuerpo y tejidos, o fluidos corporales.

Para producir los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 recombinantes, las secuencias de que codifican los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 se clonan en un vector de expresión adecuado en los sistemas de

traducción de las células huésped intactas o sin células (véase J. Sambrook *et al.*, anteriormente). Se pueden emplear vectores procarióticos y eucarióticos y células huésped. La elección particular de un vector, célula huésped o sistema de traducción no es crítica para la práctica de la invención. Las secuencias de ADN se pueden optimizar, si se desea, para una expresión más eficaz en un organismo huésped dado. Por ejemplo, los codones se pueden alterar para conformar el uso del codón preferido en un sistema de traducción de célula huésped o sin células dado usando las técnicas practicadas de manera rutinaria en la técnica.

Para algunos propósitos, puede ser preferible producir péptidos o polipéptidos en un sistema recombinante. Llevan etiquetas de secuencia adicional para facilitar la purificación. Tales marcadores incluyen etiquetas de epítopes y etiquetas de proteínas. Los ejemplos no limitantes de etiquetas de epítopes incluyen las etiquetas de epítopes c-myc, hemaglutinina (HA), polihistidina (6X-HIS), GLU-GLU, y DYKDDDDK (FLAG®). Las etiquetas de epítopes se pueden añadir a los péptidos mediante un número de procedimientos establecidos. Las secuencias de ADN de las etiquetas de epítopes se pueden insertar en las secuencias que codifican los péptidos como oligonucleótidos o mediante los cebadores usados en la amplificación por la PCR. Como alternativa, las secuencias que codifican los péptidos se pueden clonar en vectores específicos que crean fusiones con etiquetas de epítopes; por ejemplo, vectores pRSET (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Los ejemplos no limitantes de etiquetas de proteínas incluyen glutatión-S-transferasa (GST), proteína fluorescente verde (GFP), y proteína de unión a maltosa (MBP). Las etiquetas de proteínas están unidas a péptidos o polipéptidos mediante varios procedimientos bien conocidos. En un planteamiento, la secuencia codificante de un polipéptido o péptido se puede clonar en un vector que crea una fusión entre el polipéptido o péptido y una etiqueta de proteína de interés. Los vectores adecuados incluyen, sin limitación, los plásmidos ejemplares, pGEX (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), pEGFP (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), y pMAL™ (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA). Después de la expresión, el epítipo o proteína etiquetado polipéptido o péptido se puede purificar a partir de un lisado bruto del sistema de traducción o célula huésped mediante cromatografía sobre una matriz de fase sólida apropiada. En algunos casos, puede ser preferible retirar la etiqueta del epítipo o proteína (es decir, mediante escisión de la proteasa) después de la purificación.

Los sistemas de expresión sin células adecuados para uso de acuerdo con la presente invención incluyen lisado de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo, membranas de microsomas pancreáticos caninos, extracto de *E. coli* S30, y sistemas de transcripción/traducción acoplados (Promega Corp., Madison, WI). Estos sistemas permiten la expresión de polipéptidos o péptidos recombinantes tras la adición de vectores de clonación fragmentos de ADN, o secuencias de ARN que contienen las regiones codificantes y los elementos promotores adecuados.

Las células huésped para los vectores de clonación recombinantes incluyen células bacterianas, arqueobacterianas, de hongos, de plantas, de insectos y de animales, especialmente células de mamíferos. De particular interés son células de *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *N. crassa*, SF9, C129, 293, NIH 3T3, CHO, COS, y HeLa. Tales células se pueden transformar, transfectar, o transducir, según sea apropiado mediante cualquier procedimiento que incluye electroporación, CaCl_2 -, LiCl -, LiAc/PEG -, uso de esferoplastos-, Ca -fosfato, DEAE-dextrano, captación de ADN mediada por liposomas, inyección, microinyección, bombardeo de microproyectiles, o u otros procedimientos establecidos.

Con el fin de identificar las células huésped que contienen el vector de expresión, un gen que contiene un marcador que se puede seleccionar se introduce de manera general en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores que se pueden seleccionar preferibles incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina, metotrexato, o ampicilina. Los marcadores que se pueden seleccionar se pueden introducir en el mismo plásmido que el gen de interés. Las células huésped que contienen el gen de interés se identifican mediante selección de fármaco, ya que las células que llevan el marcador de resistencia a fármacos sobreviven en el medio de crecimiento que contiene el fármaco correspondiente.

Las células supervivientes se pueden seleccionar para la producción de polipéptidos relacionados con B7, o péptidos o sus fusiones. En una realización, los polipéptidos recombinantes se secretan a la superficie de la célula, y se puede identificar mediante tinción de la superficie celular con ligandos a los antígenos de las células B (por ejemplo, CD28-Ig). En otra realización, los polipéptidos recombinantes se retienen en el citoplasma de las células huésped, y se pueden identificar en los extractos de células usando anticuerpos de polipéptidos relacionados con anti B7. En todavía otra realización los polipéptidos recombinantes solubles se secretan en el medio de crecimiento, y se puede identificar mediante selección del medio crecimiento con anticuerpos relacionados con anti B7. Un polipéptido de B7 recombinante secretado incluye el dominio extracelular del polipéptido, o cualquier fragmento del mismo, que no incluye las regiones citoplásmicas y/o transmembrana. Los polipéptidos relacionados con B7 recombinantes de la superficie celular y citoplásmicos se pueden aislar siguiendo la lisis celular y extracción de las proteínas celulares, mientras que los polipéptidos relacionados con B7 recombinantes secretados se pueden aislar a partir de medio de crecimiento de células mediante técnicas convencionales (véase I.M. Rosenberg, Ed. (1996) Protein Analysis y Purification: Benchtop Techniques, Birkhauser, Boston, Cambridge, MA).

Los procedimientos basados en anticuerpos se pueden usar para purificar los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 producidos naturales o recombinantes. Los anticuerpos que reconocen estos polipéptidos, o péptidos derivados de los mismos, se pueden producir y aislar usando los procedimientos conocidos y platicados en la técnica (véase más adelante). Los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 se pueden después purificar a partir de un lisado bruto mediante cromatografía sobre las matrices de fase sólida conjugadas a anticuerpo (véase E. Harlow y D. Lane,

1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). También se pueden emplear otros procedimientos de purificación conocidos y usados en la técnica.

Se ha de observar las células huésped transfectadas que expresan los factores relacionados con B7 (por ejemplo, BSL1, BSL2, y/o BSL3,) o sus porciones sobre la superficie de la célula están dentro de del alcance de esta invención. Por ejemplo, una célula tumoral tal como un sarcoma, melanoma, leucemia, linfoma, carcinoma, o neuroblastoma se puede transfectar con un vector de expresión que dirige la expresión de al menos un factor relacionado con B7 sobre la superficie de la célula tumoral. Tales células tumorales transfectadas se pueden usar para tratar inmunidad a tumores como se describe en el presente documento en detalle.

Polipéptidos reaccionados con B7

Un aspecto adicional de la presente invención pertenece a los polipéptidos relacionados con B7. La presente invención abarca los polipéptidos BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13). Además se describen en el presente documento fragmentos y equivalentes funcionales, por ejemplo, polipéptidos que pueden comprender al menos 5, 12, 20, 30 50, 100, 170, 200, 210, 300, ó 500 restos de aminoácidos contiguos. Se prefieren polipéptidos que comparten homología moderada con los polipéptidos de BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13). Se prefieren más polipéptidos que comparten homología sustancial con -BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13).

El término "equivalente funcional" se pretende que incluyan proteínas que difieren en la secuencia de aminoácidos a partir de un polipéptido relacionado con B7 dado, tal como la secuencia del polipéptido de BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15), pero donde tales referencias dan como resultado una proteína modificada que realiza al menos una función característica del polipéptido relacionado con B7 (por ejemplo, actividad unida a ligando, intra- o intercelular). Por ejemplo, un equivalente funcional de un polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3 puede tener una modificación tal como una sustitución, adición o supresión de un resto de aminoácido resto que no está implicado directamente en la función de este polipéptido (es decir, la capacidad de estos polipéptidos para coestimular la proliferación de las células T). Además, los análogos de origen natural de los polipéptidos relacionados con B7 capaces de unirse a ligando(s) relacionado(s) con CD28 y/o CD28 se consideran equivalentes funcionales. Diversas modificaciones de los polipéptidos relacionados con B7 para producir equivalentes funcionales de estos polipéptidos se describen en detalle en el presente documento.

También es posible modificar la estructura de un polipéptido relacionado con B7 para tales propósitos como incremento de la solubilidad, potenciación de la eficacia terapéutica o profiláctica (reactividad), o estabilidad (por ejemplo, vida útil *ex vivo* y resistencia a degradación proteolítica *in vivo*). Tales proteínas modificadas se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos relacionados con B7 como se define en el presente documento. Preferiblemente, los polipéptidos relacionados con B7 se modifican de manera que retengan la capacidad de coestimular la proliferación de las células T. Esos residuos muestran que son esenciales para interactuar con los ligandos relacionados con CD28 o CD28 sobre las Células T se pueden modificar reemplazando el aminoácido esencial con otro, preferiblemente similar al resto de aminoácidos (una sustitución conservadora) cuya presencia se muestra que potencia, disminuye, pero no elimina, o no efectúa la interacción del receptor. Además esos restos de aminoácidos que no son esenciales para la interacción del receptor se puede modificar siendo reemplazado por otro aminoácido cuya incorporación puede potenciar, disminuir, o efectuar reactividad. Por ejemplo, un polipéptido relacionado con B7 se puede modificar mediante sustitución de restos cisteína con otros aminoácidos, tales como alanina, serina, treonina, leucina, o ácido glutámico, para evitar la dimerización mediante enlaces disulfuros. Además, las cadenas laterales de aminoácidos de un polipéptido relacionado con B7 de la invenciones puede modificar químicamente. También, el polipéptido relacionado con B7 se puede modificar mediante ciclación de la secuencia de aminoácidos.

Con el fin de potenciar la estabilidad y/o reactividad, los polipéptidos relacionados con B7 se pueden alterar para incorporar uno o más polimorfismos en la secuencia de aminoácidos secuencia. De manera adicional, los D-aminoácidos, aminoácidos no naturales, o análogos no aminoácidos se pueden sustituir o añadir para producir un polipéptido modificado. Además, los polipéptidos relacionados con B7 descritos en el presente documento se pueden modificar usando polietilen glicol (PEG) de acuerdo con procedimientos conocidos (Wie *et al.*, *supra*) para producir una proteína conjugada con PEG. Además, PEG se puede añadir durante la síntesis química de la proteína. Otras posibles modificaciones incluyen reducción/alquilación (Tarr (1986) Methods of Protein Microcharacterization, J. E. Silver, Ed., Humana Press, Clifton, NJ, páginas. 155-194); acilación (Tarr, anterior); acoplamiento químico a un vehículo apropiado (Mishell and Shiigi, Eds. (1980) Selected Methods in Cellular Immunology, W H Freeman, San Francisco, CA; Patente de Estados Unidos N° 4.939.239; o tratamiento suave con formalina (Marsh (1971) Int. Arch. of Allergy y Appl. Immunol. 41: 199-215) del polipéptido relacionado con B7.

Los polipéptidos modificados pueden tener cambios conservadores, en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, reemplazo de leucina con isoleucina. De manera más infrecuente, un polipéptido modificado puede tener cambios no conservadores, por ejemplo, sustitución de una glicina con un triptófano. La guía en la determinación de qué restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar, o suprimir sin eliminar la actividad biológica o inmunológica se puede encontrar usando programas de ordenador bien conocidos en la técnica, por ejemplo, software DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI).

ES 2 300 340 T3

Como ejemplos no limitantes, se pueden realizar sustituciones conservadoras en la secuencia de aminoácidos relacionados B7 de acuerdo con la siguiente tabla:

5	Resto original	Sustitución (es) conservadora 8s)
	Ala	Ser
	Arg	Lys
10	Asn	Gln, Lys
	Asp	Glu
15	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
20	Gli	Pro
	His	Asn, Gin
	Ile	Leu, Val
25	Leu	Ile, Val
	Lys	Arg, Gin, Glu
30	Met	Leu, Ile
	Phe	Met, Leu, Tyr
	Ser	Thr
35	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp, Phe
40	Val	Ile, Leu

Se pueden realizar cambios sustanciales en función o inmunogenicidad mediante la selección de sustituciones que son menos no conservadoras que las mostradas en la tabla anterior. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones no conservadoras que afectan de manera más significativa a la estructura del polipéptido en el área de la alteración, por ejemplo, la estructura de hélice alfa o de hoja beta; el cargo o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o el volumen de de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que 1) un resto hidrófilo, por ejemplo, seril o treonil, está sustituido por (o por) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucil, isoleucil, fenilalanil, valil, o alanil; 2) una cisteína o prolina está sustituida por (o por) cualquier otro resto; 3) un resto que tiene una cadena lateral electropositivo, por ejemplo, lisil, arginil, o histidil, está sustituido por (o por) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamil o aspartil; o 4) un resto que tiene cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, está sustituido por (o por) un resto que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Las realizaciones de polipéptidos preferidas incluyen además un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 90, 95, 97, 98, 99, 99.5 ó 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos de BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13). Esta secuencia de polipéptidos secuencia puede ser idéntica a la secuencia de BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13) o pueden incluir hasta un cierto número entero de las alteraciones de aminoácidos cuando se compara con la secuencia de referencia.

El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular usando programas de ordenador o comparación de secuencia directa. Los procedimientos de programa de ordenador preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG, FASTA, BLASTP, y TBLASTN (véase, por ejemplo, D.W. Mount, 2001, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nlr7. Los programas BLASTP y TBLASTN están disponibles para el público a partir de NCBI y otras fuentes. El algoritmo bien conocido Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

ES 2 300 340 T3

Los parámetros ejemplares para la comparación de secuencias de aminoácidos incluyen los siguientes: 1) el algoritmo de Needleman y Wunsch, 1970, J Mol. Biol. 48: 443-453; 2) matriz de comparación de BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919; 3) penalización de hueco = 12; y 4) penalización de longitud de hueco = 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible para el público como el programa "hueco" (Genetics Computer Group, Madison, WI). Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros por defecto para la comparación de polipéptidos (sin penalización para los huecos finales).

Como alternativa, la identidad de secuencias de polipéptidos se puede calcular usando la siguiente ecuación: % de identidad = (el número de restos idénticos)/(longitud de alineación en los restos de aminoácido) * 100. Para este cálculo, la longitud de alineación incluye huecos internos pero no incluye huecos terminales.

Las secuencias de polipéptidos descritas en el presente documento pueden ser idénticas a la secuencia de BSL2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 7, 11, ó 13) o pueden incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos. Las alteraciones de polipéptidos se seleccionan entre el grupo constituido por al menos una supresión, substitución, incluyendo substitución o inserción conservadora y no. Se pueden producir alteraciones en las posiciones amino- o carboxi-terminal de la secuencia de polipéptidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, con espacios intermedios o bien individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Se pueden codificar variantes de polipéptidos mediante los ácidos nucleicos de BSL1, BSL2, o BSL3 que comprenden polimorfismos de nucleótidos y/o variantes de ajuste alternativos. También se pueden modificar polipéptidos, por ejemplo, fosforilación, sulfación, o acilación. También se pueden modificar con una etiqueta capaz de proporcionar una señal detectable, o bien directa o indirectamente, que incluye, pero no se limita a, isótopos radiactivos y compuestos fluorescentes.

En el presente documento se describen partes recombinantes o fragmentos aislados, sintetizados y/o recombinantes de una proteína o polipéptido de BSL2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 7, 11, ó 13) como se describe en el presente documento. Los fragmentos de polipéptidos (es decir, péptidos) se pueden preparar para que tengan una función total o parcial por sí mismos, o que cuando se mezclan conjuntamente (aunque completamente, parcialmente, o no funcional solo) de manera espontánea se juntan con uno o más polipéptidos diferentes para reconstituir una proteína funcional que tiene al menos una característica funcional de una proteína de BSL1, BSL2, o BSL3 de esta invención. Además, los fragmentos de polipéptido relacionado con B7 pueden comprender, por ejemplo, uno o más dominios del polipéptido (por ejemplo, el dominio transmembrana o extracelular) descritos en el presente documento.

Los polipéptidos en el presente documento incluyen variantes conservadoras de función, se pueden aislar a partir de células de tipo salvaje o mutantes (por ejemplo, células humanas o líneas celulares), a partir de organismos o células heterólogos (por ejemplo, células de bacterias, levaduras, insectos, plantas, y de mamíferos), o a partir de sistemas de traducción sin células (por ejemplo, extractos de germen de trigo, membrana microsomal, o de bacterias) en los que una secuencia que codifica proteínas se ha introducido y expresado. Además, los polipéptidos pueden ser parte de proteínas de fusión recombinantes. Los polipéptidos también se pueden preparar de manera ventajosa mediante química de síntesis. Los polipéptidos se pueden sintetizar químicamente mediante procedimientos automáticos comercialmente disponibles, que incluyen, pero no se limitan a, síntesis de fase sólida exclusiva, procedimientos de fase sólida, condensación de fragmento o síntesis en solución clásica. Tanto las formas de origen natural como recombinantes de los polipéptidos de la invención se pueden usar de manera ventajosa para seleccionar compuestos para determinar la actividad de unión. Los polipéptidos de la invención también encuentran uso como agentes terapéuticos así como componentes antígenicos para preparar los anticuerpos como se ha descrito en detalle en el presente documento.

Anticuerpos para los polipéptidos relacionados con B7

Otro aspecto de la presente invención abarca anticuerpos que de manera específica reconocen los polipéptidos o péptidos relacionados con B7. Es decir, los polipéptidos BSL2, o fragmentos derivados de los mismos. Como se usa en el presente documento, "anticuerpos" se refiere a moléculas intactas. Así como sus fragmentos, tales como Fab, F(ab)2, y Fv, que son capaces de unirse a un determinante epitópico. Los anticuerpos que se unen a un polipéptido relacionado a, preferiblemente el polipéptido BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15), se pueden preparar usando los fragmentos de polipéptido o de péptido relacionados con B7 como el inmunógeno o antígeno de inmunización mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase I. Lefkovits, Ed., (1996) Immunology Methods Manual Academic Press, Inc., San Diego, CA). Como se apreciará por los expertos expertos en la técnica, el inmunógeno se puede conjugar a una proteína vehículo, si se desea, para incrementar la inmunogenicidad, particularmente, si se usa un péptido pequeño. Los vehículos usados comúnmente que se usan de manera rutinaria acoplados químicamente a péptidos incluyen albúminas de suero, (por ejemplo, ratón, rata, oveja, cabra, o conejo).

El término "determinante antígeno" se refiere a un fragmento de una molécula (es decir, un epítipo) que hace contacto con un anticuerpo particular. Cuando el fragmento de polipéptido o péptido se usa se una para inmunizar un animal huésped, numerosos fragmentos del polipéptido o péptido pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen de manera específica a una región dada o estructura de tres dimensiones sobre el polipéptido o péptido. Tales regiones o estructuras se refiere a determinantes antígenicos o epítopes. Un determinante antígeno puede competir con el antígeno intacto (es decir, el inmunógeno usado para provocar la respuesta inmune) para unión a un anticuerpo. Los determinantes antígenicos preferidos son aquellos que son específicos para el polipéptido o péptido de BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15). Se pueden obtener inmunógenos

derivados de polipéptidos relacionados con B7 usando las técnicas como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, fragmentos de polipéptido o péptido relacionados con B7 se pueden aislar a partir de fuentes naturales o recombinantes y purificarse mediante escisión de los fragmentos de polipéptidos o péptidos a partir de geles, particularmente geles de SDS-PAGE.

Los anticuerpos específicos de BSL2 incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales. Los anticuerpos pueden inducir en un huésped animal mediante inmunización con componentes inmunogénicos derivados de polipéptidos relacionados con B7 o se puede formar mediante inmunización *in vitro* (sensibilización) de células inmunes. Los componentes inmunógenos usados como inmunógenos para inducir la producción de anticuerpos se pueden a partir de plasma, producido de manera recombinante, o sintetizarse químicamente. Los anticuerpos también se pueden producir en sistemas recombinantes programados con ADN que codifica anticuerpo apropiado. Como alternativa, los anticuerpos se pueden construir mediante reconstitución bioquímica de cadenas pesadas y ligeras pesadas. Los anticuerpos incluyen anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.585.089 de C.J. Queen *et al.*) y anticuerpos univalentes. También se incluyen fragmentos de Fab, Fab' y F(ab)₂ de anticuerpos. De manera notable, se pueden aislar los anticuerpos que reconocen de manera específica o bien la forma secretada, de superficie celular, o la forma citoplásmica, solubles de un factor relacionado con B7.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra los componentes inmunogénicos de la invención se pueden producir mediante técnicas bien conocidas. Los hibridomas se pueden producir mediante la fusión de una línea celular inmortalizada con un linfocito B que produce el anticuerpo deseado. Como alternativa, las técnicas de no fusión para generar líneas celulares que producen anticuerpos inmortales son posibles, y están dentro del alcance de la presente invención (véase Casali *et al.* (1986) Science 234: 476). Las líneas celulares inmortalizadas son de manera típica células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, de bovino, y humano. Lo más frecuentemente, líneas celulares de mieloma de rata o ratón se emplean como materia de conveniencia y disponibilidad. Se pueden usar procedimientos convencionales para seleccionar hibridomas, tal como selección de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina). Los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales deseados se pueden seleccionar mediante ensayo de medio de cultivo de las células mediante inmunoensayos convencionales, tal como inmunotransferencia. ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas; E. Engvall *et al.* (1971) Immunochemistry, 8: 871-4; y D.J. Reen (1994) Methods Mol. Biol. 32:461-6), RIA (radioimmunoassay), o ensayos comparables. Los anticuerpos se pueden recuperar a partir del medio usando técnicas de purificación de proteínas convencionales (véase Tijssen (1985) Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier, Amsterdam).

En una realización, los anticuerpos que reaccionan con un fragmento de polipéptido o péptido relacionado con B7 o se usan para identificar o aislar un fragmento de polipéptido o péptido relacionado con B7 en una muestra biológica. Para aislar un polipéptido relacionado con B7 a partir de una muestra, los anticuerpos que reconocen específicamente y se unen a un fragmento de polipéptido o péptido relacionado con B7 se conjugan a un soporte sólido, el soporte sólido conjugado al anticuerpo se incuba con la muestra o una alícuota de la muestra, y el polipéptido o péptido que se une a los anticuerpos se eluye del soporte sólido. Para detectar un fragmento de polipéptido o péptido relacionado con B7 en una muestra, la muestra se incuba con los anticuerpos que reconocen específicamente y se unen a un fragmento de polipéptido o péptido relacionado con B7 en condiciones que permiten que los anticuerpos se unan al fragmento de polipéptido o péptido, y se determina la unión de los anticuerpos al fragmento de polipéptido o péptido relacionado con B7.

Ensayos que utilizan ácidos nucleicos o polipéptidos relacionados con B7

Análisis de expresión relacionados con B7: Se pueden usar varias técnicas bien establecidas para determinar los niveles de expresión, patrones, y especificidad de tipo celular de los factores relacionados con B7. Por ejemplo, los niveles de ARNm se pueden determinar utilizando análisis de transferencia de Northern (J.C. Alwine *et al.* (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5350-5354; I.M. Bird (1998) Methods Mol. Biol. 105: 325-36.), mediante los cuales poly(A)+ ARN se aísla a partir de las células, se separan mediante electroforesis de gel, transferencia en una superficie de soporte (por ejemplo, nitrocelulosa o Immobilon-Ny+ (Millipore Corp., Bedford, MA)), y se incuban con una sonda de oligonucleótidos marcada (por ejemplo, marcada fluorescentemente o marcada radiactivamente) que es capaz de hibridarse con el ARNm de interés. Como alternativa, los niveles de ARNm se pueden determinar mediante análisis de Rt-PCR cuantitativo (para revisión, véase W.M. Freeman *et al.* (1999) Biotechniques 26: 112-122) o semicuantitativo (Ren *et al.* Mol. Brain Res. 59: 256-63). De acuerdo con esta técnica, se aísla poly(A)+ ARN a partir de las células, se usa para la síntesis de ADNc, y el ADNc resultante se incuba con cebadores de PCR que son capaces de hibridarse con el molde y amplificar la secuencia del molde para producir los niveles del producto de PCR que son proporcionales a los niveles celulares del ARNm de interés. Otra técnica, de hibridación *in situ*, también se puede usar para determinar los niveles de ARNm (revisión por A.K. Raap (1998) Mutat. Res. 400: 287-298). Las técnicas de hibridación *in situ* permiten la detección visual del ARNm en una célula mediante la incubación de la célula con una sonda de oligonucleótido marcada (por ejemplo, marcada fluorescentemente o marcada con digoxigenina) que se hibrida al ARNm de interés, y después examinando la célula por microscopía.

Mapeo cromosómico de los genes relacionados con B7: Se puede usar la localización cromosómica de los genes relacionados con B7 se pueden determinar mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, bandeado cromosómico de alta resolución (revisión por M. Ronne (1990) *In Vivo* 4: 337-65). Las técnicas de bandeado de alta resolución utilizan cromosomas alargados a partir de las células en las fases de mitosis tempranas, que se han sincronizado usando inhibidores de la síntesis de ADN (por ejemplo, metotrexato o timidina) o agentes de unión a ADN (por

ejemplo, bromuro de etidio). Sin embargo, estas técnicas se pueden usar solamente para mapear un gen en una región relativamente grande de un cromosoma (~ 3 Mb). Para un mapeo del gen más preciso, se pueden usar técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (A. Palotie *et al.* (1996) Ann. Med. 28: 101-106) utilizan cromatina libre, fibras de ADN, o cromosomas fragmentados mecánicamente para mapear las secuencias de genes que varían entre varias kilobases y 300 kb de tamaño. Como alternativa, la localización cromosómica de un gen se puede determinar a partir de la base de datos de genoma apropiada, por ejemplo, la base de datos del genoma de *Homo sapiens* disponible de la página web Entrez Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov: 80/entrez/query.fcgi?db=Genome>; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)

Identificación de ligandos de las células T: Los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 descritos en el presente documento se pueden usar para identificar sus ligandos afines o células de respuesta inmunes o inflamatorias, tales como las células T (es decir, ligandos relacionados con CD28- o CTLA-4). Los ligandos candidatos, o fragmentos derivados de los mismos, se pueden identificar y analizar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica (véase T.E. Creighton, Ed., 1997, Proteins Structure: A Practical Approach, IRL Press at Oxford Press, Oxford, Inglaterra). Por ejemplo, los ligandos de células T se unen a los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 se pueden identificar a partir de extractos o lisados obtenidos de células de respuesta inmune o inflamatoria de animal, preferiblemente ser humano, (por ejemplo, Células T). la proteína obtenida a partir de estas fuentes se pueden separar en bandas usando electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDSPAGE) y transferirse mediante electrotransferencia, por ejemplo, en un soporte o membrana de fase sólida adecuada (por ejemplo, nitrocelulosa o fluoruro de polivinilo (PVDF)). El soporte o membrana de fase sólida se puede después incubar con una forma marcada de un polipéptido o péptido relacionado con B7, por ejemplo, proteínas de BSL1, BSL2, o BSL3 que corresponden a las bandas que muestran la unión específica con el polipéptido o péptido relacionado con B7 se pueden después identificar, aislar, purificar, y analizar mediante análisis de aminoácidos y/o degradación de Edman para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos derivados de los mismos.

Como un planteamiento alternativo, una proteína de fusión que comprende un polipéptido relacionado con B7 se puede unir a un soporte sólido e incubarse con los extractos obtenidos a partir de las células, tales como células CHO o COS, que se transfectan con una genoteca de ADNc adecuada. Por ejemplo, una genoteca de ADNc se pueden construir a partir de líneas celulares inmortales en reposo o activadas, tales como líneas celulares CEM, HUT78, o Jurkat, o a partir de Células T humanas en reposo o activadas derivadas de sangre periférica, amígdalas, bazo, timo u otros tejido especializado linfóide. Tales células se pueden activar mediante la adición de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28, fitohemaglutinina (PHA), o forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) con ionomicina. La construcción de la genoteca de ADNc pueden contener una etiqueta de epítopo que se puede retirar (véase anteriormente) que es diferente de la proteína de fusión, y facilitará la purificación del (de los) producto(s) de expresión de la genoteca que está(n) asociado(s) a la proteína de fusión. El (los) producto(s) de expresión de la genoteca se puede(n) después aislar y caracterizar. Además, una proteína de fusión que comprende un polipéptido relacionado con B7 se puede unir a un soporte sólido (por ejemplo, una columna que comprende perlas que se unen específicamente a la proteína de fusión) e incubarse con los lisados obtenidos a partir de las células, tales como las Células T, que se enriquecen para las proteínas de membrana. Las proteínas celulares que se asocian con la proteína de fusión se pueden aislar y después caracterizarse usando análisis de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Analysis; revisión por Yates JR 3^a. (1998) J. Mass Spectrom. 33: 1-19; P. Chaurand *et al.* (1999) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10: 91-103). Las proteínas de fusión pueden incluir, por ejemplo, FLAG[®] (B.L. Brizzard *et al.* (1994) Biotechniques 16: 730-735), 6X-HIS, y GST-tagged fusión proteins (véase anteriormente), que se pueden unir a soportes sólidos que se conjugan con anticuerpos anti-FLAG[®], níquel, o moléculas de glutatión, respectivamente. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para producir y purificar tales proteínas de fusión.

Otro ensayo de unión a ligandos adecuado es el sistema de dos híbridos de levaduras (Fields *et al.* (1989) Nature 340: 245-246; Patente de Estados Unidos N° 5.283.173). El sistema de dos híbridos se libera tras la reconstitución de la actividad de activación de la transcripción mediante la asociación de los dominios de activación de la unión a ADN y de transcripción de un activador de transcripción a través de la interacción proteína-proteína. El activador de la transcripción de levadura GAL4 se puede usar de esta manera, aunque se han usado otros factores de transcripción y se conocen bien en la técnica. Para llevar a cabo el ensayo de dos híbridos, el dominio de unión a ADN GAL4 y el dominio de activación de la transcripción GAL4 se expresan de manera separada, como fusión es a polipéptidos de interacción potencial. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender un polipéptido relacionado con B7 condensado al dominio de unión de ADN GAL4. La otra proteína de fusión puede comprender, por ejemplo, una librería de ADNc de células T que codifica un polipéptido condensado al dominio de activación de la transcripción GAL4. Si las dos proteínas de fusión coexpresadas interactúan en el núcleo de una célula huésped, un gen reportero (por ejemplo LacZ) se activa para producir el fenotipo detectable. Las células huésped que muestran interacciones híbrido-híbrido se pueden usar para aislar los plásmidos que las secuencias de la genoteca de ADNc. Estos plásmidos se pueden analizar para determinar la secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de polipéptidos predicha del ligando candidato de las células T se pueden analizar para determinar la secuencia de ácidos nucleicos y secuencia de polipéptidos predicha del ligando de células T candidato.

Los procedimientos relacionados, *in vivo*, tales como los sistemas de tres híbridos (Licitra *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12817-12821), y de dos híbridos inverso (Vidal *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10315-10320) pueden servir como planteamientos alternativos. También se pueden usar los sistemas de dos híbridos comercialmente disponibles tales como los sistemas y protocolos CLONTECH Matchmaker[™] (CLONTECH, Palo Alto, CA). (Véase también, A.R. Mendelsohn *et al.* (1994) Curr. Op. Biotech. 5: 482; E.M. Phizicky *et al.* (1995)

Microbiological Rev. 59: 94; M. Yang *et al.* (1995) Nucleic acids Res. 23: 1152; S. Fields *et al.* (1994) Trends Genet. 10: 286; y Patente de Estados Unidos N° 6.283.173 y 5.468.614).

La(s) secuencia(s) de ligando obtenidas a partir del (de los) ensayo(s) se puede(n) comparar con las secuencias sujeto en las bases de datos disponibles tales como, sin limitación, las bases de datos GenPept, SWISS-PROT, y Incyte Genomics (Incyte Genomics). Estas bases de datos, que contienen secuencias previamente identificadas y anotadas, se pueden investigar para la secuencia de polipéptidos y genes de longitud completa usando, por ejemplo, análisis BLAST (véase anteriormente). En los casos en los que las secuencias de longitud completa de los ligando no están disponibles, los clones extendidos o de superposición parcial se pueden obtener mediante las técnicas conocidas de manera convencional y se practican en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales técnicas incluyen hibridación a genotecas de plásmidos o fagos de ADN o ADNc genómico; PCR de las mismas genotecas que usan pares de cebadores del factor relacionado con B7; o hibridación o PCR directamente a ADN o ADNc genómico. Estos clones se pueden después secuenciar y ensamblar en los genes de longitud completa usando el programa de alineación de secuencia de fragmentos (PHRAP; Nickerson *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2745-2751).

Ensayos para determinar la actividad del factor relacionado con B7: Se pueden llevar a cabo la selección de los fragmentos, mutantes o variantes para aquellos para los que se mantienen la actividad de polipéptido relacionado con B7 como se describe en el presente documento usando uno o más de varios ensayos diferentes. Por ejemplo, se pueden transfectar células apropiadas, tales como células CHO, con las variantes clonadas y después se analizan para el fenotipo de la superficie celular mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. La expresión de la expresión de superficie de las células transfectadas se evalúa usando un anticuerpo monoclonal reactivo de manera específica con una forma de la superficie celular de un factor relacionado con B7 (véase anteriormente). La producción de las formas secretadas de los factores relacionados con B7 se pueden evaluar mediante inmunoprecipitación usando un anticuerpo monoclonal reactivo de manera específica con un factor relacionado con B7.

Otros ensayos, más preferidos se aprovechan de las características funcionales de los factores relacionados con B7. Como se ha establecido anteriormente, la unión de los factores relacionados con B7 al (a los) ligando(s) de células T provoca que las células produzcan un incremento en los niveles de linfoquinas, particularmente de interleuquina-2. De este modo, la función del factor relacionado con B7 se puede ensayar para medir la síntesis de linfoquinas, tales como interleuquina-2 u otras citoquinas y todavía indefinidas novedosas, y/o ensayando para evaluar la proliferación de células T mediante las células CD28+ T que han recibido una señal de activación primaria. Se puede emplear uno cualquiera de varios ensayos convencionales para interleuquina-2 (véase C.B. Thompson (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1333).

También se pueden usar los mismos ensayos funcionales básicos para seleccionar los polipéptidos relacionados con B7, péptidos, proteínas de fusión, o anticuerpos que bloquean la activación de las células T. la capacidad de tales proteínas para bloquear la señal coestimuladora normal e inducir un estado de anergia se puede determinar usando intentos posteriores a la estimulación de las células T con células que presentan antígeno que expresan el antígeno B7 de activación de las células B de la superficie celular y presentan antígeno. Si las células T no son sensibles a los intentos de activación, como se determina mediante la síntesis de IL-2 y proliferación de células T, se ha inducido un estado de anergia y se puede determinar mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase R.H. Schwartz (1990) Science 248: 1349-1356).

Moduladores de los factores relacionados con B7

Los polipéptidos, polinucleótidos, variantes, o sus fragmentos de BSL1, BSL2, y BSL3, se pueden seleccionar para seleccionar agentes de ensayo (por ejemplo, agonistas, antagonistas, o inhibidores) que modulan los niveles de actividad del polipéptido relacionado con B7 correspondiente. Además, las moléculas relacionadas con B7 se pueden usar para identificar moduladores endógenos que se unen a los polipéptidos o polinucleótidos BSL1, BSL2, o BSL3 en la célula. En un aspecto de la presente invención, el polipéptido de longitud completa de BSL1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), BSL2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) se usa para identificar moduladores. Como alternativa, se usan las variantes o fragmentos de un polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3. Tales fragmentos pueden comprender, por ejemplo, uno o más dominios del polipéptido relacionado con B7 (por ejemplo, los dominios extracelulares y de transmembrana) descritos en el presente documento. De particular interés son los ensayos de selección que identifican agentes que tienen niveles relativamente bajos de toxicidad en células humanas. Se puede usar una amplia diversidad de ensayos para este propósito, incluyendo ensayos de unión *in vitro* de proteína-proteína, ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética, inmunoensayos, y similares.

El término “modulador” como se usa en el presente documento describe cualquier agente de ensayo, molécula, proteína, péptido, o compuesto con la capacidad de alterar directa o indirectamente la función fisiológica, estabilidad, o niveles del polipéptido de BSL1, BSL2, y BSL3. Los moduladores que se unen a los polipéptidos o polinucleótidos relacionados con B7 de la invención son potencialmente útiles en las solicitudes de diagnóstico y/o composiciones farmacéuticas, como se describe en detalle en el presente documento. Los agentes de ensayo útiles como moduladores pueden abarcar numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferiblemente pequeños compuestos orgánicos que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Tales moléculas pueden comprender grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con las proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos una amina, grupo carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes de ensayo que se pueden usar como

moduladores a menudo comprenden estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o heteroaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos anteriores. Los agentes de ensayo también pueden comprender biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales, o las combinaciones de los mismos.

5 Los agentes de ensayo que encuentran uso como moduladores pueden incluir, por ejemplo, 1) péptidos tales como péptidos solubles, que incluyen péptidos de fusión de cola Ig y miembros de genotecas de péptidos al azar (véase, por ejemplo, Lam *et al.* (1991) *Nature* 354: 82-84; Houghten *et al.* (1991) *Nature* 354: 84-86) y genotecas moleculares derivadas de la química combinatorial hechas de aminoácidos de configuración D- y/o L; 2) fosfopéptidos (por ejemplo, miembros de genotecas de fosfopéptidos dirigidas al azar y parcialmente degeneradas, véase, por ejemplo, Songyang *et al.*, (1993) *Cell* 72: 767-778); 3) anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, antiidiotípicos, quiméricos y de una sola cadena así como fragmentos de la genoteca de expresión de Fab, F(ab')₂, Fab, y fragmentos que se unen a epítopes de anticuerpos); y 4) pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas.

15 Los agentes de ensayo y moduladores se pueden obtener a partir de una amplia diversidad de fuentes que incluyen genotecas de compuestos sintéticos o naturales. Las genotecas de compuestos sintéticos están comercialmente disponibles a partir de, por ejemplo, Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), y Microsource (New Milford, CT). Una genoteca rara química está disponible a partir de Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI). Las genotecas de compuestos naturales que comprenden extractos de bacterias, de hongos, de plantas o de animales están disponibles a partir de, por ejemplo, Pan Laboratories (Bothell, WA). Además, están disponibles para la síntesis al azar y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos aleatorios.

25 Como alternativa, las genotecas de los compuestos naturales en la forma de extractos de bacterias, de hongos, de plantas o de animales se pueden producir fácilmente. Los procedimientos para la síntesis de las genotecas moleculares están disponibles fácilmente (véase, por ejemplo, DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261: 1303; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y in Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233). Además, se pueden modificar fácilmente las genotecas de los compuestos naturales o sintéticas y los compuestos mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales (véase, por ejemplo, Blondelle *et al.* (1996) *Trends in Biotech.* 14: 60), y se pueden usar para producir genotecas combinatorias. En otro planteamiento, los agentes farmacológicos identificados previamente se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o al azar tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, y los análogos se pueden seleccionar para la actividad de modulación de BSL1-, BSL2-, y BSL3-.

35 Numerosos procedimientos para producir genotecas combinatorias se conocen en la técnica, incluyendo los que implican genotecas biológicas; genotecas de fase sólida o fase en solución que se pueden dirigir de manera espacial; procedimientos de genoteca sintética que requieren desconvolución; el procedimiento de genoteca de un compuesto de una perla; y procedimientos de genoteca sintética que usan la selección de cromatografía de afinidad. El planteamiento de genoteca biológico está limitado a genotecas de polipéptidos, mientras que los otros cuatro planteamientos son aplicables a polipéptidos, oligómeros de no péptidos, o pequeñas genotecas de moléculas de los compuestos (K. S. Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12: 145).

45 Se pueden seleccionar genotecas en solución (por ejemplo, Houghten, (1992) *Biotechniques* 13: 412-421), o sobre perlas (Lam, (1991) *Nature* 354: 82-84), pedacitos (Fodor, (1993) *Nature* 364: 555-556), bacterias o esporas (Ladner Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869), o sobre fago (Scott y Smith, (1990) *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990, *Science* 249: 404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6378-6382; Felici, (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; Ladner, anterior).

50 Cuando el ensayo de selección es un ensayo de unión, un polipéptido, polinucleótido, análogo de BSL1, BSL2, y BSL3 o su fragmento, se puede unir a una etiqueta, cuando la etiqueta puede directa o indirectamente proporcionar una señal detectable. Diversas etiquetas incluyen isótopos radiactivos, compuestos fluorescentes, compuestos quimio-luminiscentes, enzimas, moléculas de unión específica, partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, y similares. Las moléculas de unión específica incluyen pares, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. 55 Para los miembros de unión específica, el miembro complementarios se marcaría normalmente con una molécula que proporciona la detección, de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Se puede incluir una diversidad de reactivos diferentes en el ensayo de selección. Éstos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo, albúmina, detergentes, etc., que se usan para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. Se pueden usar los reactivos que mejoran la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos, etc. Se añaden los componentes en cualquier orden que produzca la unión requerida. Las incubaciones se realizan a cualquier temperatura que facilite la actividad óptima, típicamente entre 4° y 40°C. Los períodos de incubación se pueden seleccionar para la actividad óptima, pero también se pueden optimizar para facilitar la selección de alto rendimiento. Normalmente, 60 entre 0,1 y 1 hr (hora) será suficiente. En general, se llevan a cabo una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agentes para obtener una respuesta diferencial a las concentraciones. De manera típica, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a concentración cero o inferior al nivel de detección.

Para realizar ensayos de selección sin células, puede ser deseable inmovilizar o bien el polipéptido, polinucleótido de BSL1, BSL2, o BSL3, o fragmenta a una superficie para facilitar la identificación de moduladores que se unen a estas moléculas, así como para acomodar la automatización del ensayo. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3 y una etiqueta de afinidad se puede producir como se describe en detalle en el presente documento. En una realización, una proteína de fusión GST que comprende un polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3 se adsorbe sobre las perlas de sefarsa de glutatión (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microvaloración derivatizadas de glutatión. Se añaden lisados de células (por ejemplo, que contienen polipéptidos marcados con ³⁵S) a las perlas revestidas con polipéptidos en condiciones que permitan la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas revestidas de polipéptido se lavan para retirar cualesquiera polipéptidos no unidos, y se determina la cantidad de marca radiactiva inmovilizada. Como alternativa, se disocia el complejo y se determina la etiqueta radiactiva presente en el sobrenadante. En otro planteamiento, las perlas se analizan mediante SDS-PAGE para identificar los polipéptidos unidos a BSL1-, BSL2-, o BSL3-.

Se pueden usar diversos ensayos de unión para identificar agonista o antagonistas que alteran la función o niveles del polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3. tales ensayos se diseñan para detectar la interacción de los agentes de ensayo con polipéptidos, polinucleótidos equivalentes funcionales de BSL1, BSL2, o BSL3, o sus fragmentos. Las interacciones se pueden detectar mediante medición directa de la unión. Como alternativa, se pueden detectar las interacciones mediante indicaciones indirectas de unión, tales como estabilización/desestabilización de la estructura de la proteína, o activación/inhibición de la función biológica. Los ejemplos no limitantes de los ensayos de unión útiles se detallan más adelante.

Los moduladores que se unen a polipéptidos, polinucleótidos equivalentes funcionales de BSL1, BSL2, o BSL3, o sus fragmentos, se pueden identificar usando el análisis de Interacción Bimolecular (BIA; Sjolander *et al.* (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345; Szabo *et al.* (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705; por ejemplo, BIAcore™; LKB Pharmacia, Sweden). Los moduladores también se pueden identificar mediante ensayos de proximidad de centelleo (SPA, descrito en la Patente de Estados Unidos N° 4.568.649). También se pueden emplear los ensayos de unión que usan señales de etiquetado de mitocondrias (Hurt *et al.* (1985) EMBO J. 4: 2061-2068; Eilers y Schatz, (1986) Nature 322: 228-231) una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido (Fodor *et al.* (1991) Science 251: 767-773).

Se pueden usar sistemas de dos híbridos para identificar los moduladores (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.283.317; Zervos *et al.* (1993) Cell 72: 223-232; Madura *et al.* (1993) J. Biol Chem. 268: 12046-2054; Bartel *et al.* (1993) Biotechniques 14: 920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) Oncogene 8: 1693-1696; y Brent WO 94/10300). Como alternativa, se pueden usar sistemas de tres híbridos (Licitra *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12817-12821), y de dos híbridos inversos (Vidal *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10315-10320). También son útiles los sistemas de dos híbridos comercialmente disponibles tales como CLONTECH Matchmaker™ y los protocolos (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) (véase también, A.R. Mendelsohn *et al.* (1994) Curr. Op. Biotech. 5: 482; E.M. Phizicky *et al.* (1995) Microbiological Rev. 59: 94; M. Yang *et al.* (1995) Nucleic Acids Res. 23: 1152; S. Fields *et al.* (1994) Trends Genet. 10: 286; y la patente de estados Unidos N° 6.283.173 y 5.468.614).

Se han desarrollado varios procedimientos de ensayos automáticos en los años recientes de manera que permita la selección de decenas o miles de agentes de ensayo en un corto período de tiempo. Los procedimientos de selección de alto rendimiento se prefieren particularmente para uso con la presente invención. Los ensayos de unión descritos en el presente documento se pueden adaptar para los tamices de alto rendimiento, o se pueden emplear tamices alternativos. Por ejemplo, tamices de alto rendimiento (CF-HTS) que usan al menos una o más matrices porosas permite que el investigador ensaye grandes números de agentes de ensayo para un amplio intervalo de actividad biológica o bioquímica (véase la patente de Estados Unidos N° 5.976.813 de Beutel *et al.*). Además, CF-HTS se puede usar para realizar ensayos de múltiples etapas.

Diagnósticos

De acuerdo con otra realización de la presente invención los polinucleótidos relacionados con B7, o sus fragmentos, se pueden usar para propósitos de diagnósticos. Los polinucleótidos relacionados con B7 que se pueden usar incluyen las secuencias de oligonucleótidos, moléculas de ARN y ADN complementarias y PNA. Los polinucleótidos se pueden usar para detectar y cuantificar los niveles de BSL1, BSL2, y BSL3 ARNm en muestras biológicas en las que la expresión (o bajo- o sobreexpresión) de polinucleótido de BSL1, BSL2, y BSL3 se puede correlacionar con la enfermedad. El ensayo diagnóstico se puede usar para distinguir entre la ausencia, presencia, incremento, y disminución de la expresión de BSL1, BSL2, y BSL3, y para controlar la regulación de los niveles de polinucleótidos de BSL1, BSL2, y BSL3 durante el tratamiento o intervención terapéutico.

En un aspecto, las sondas de PCR se pueden usar para detectar las secuencias de polinucleótidos relacionadas con Bt, que incluyen las secuencias de ADN genómico de BSL1, BSL2, y BSL3 y secuencias de ácido nucleico relacionadas con BSL1-, BSL2-, y BSL3-. La especificidad de la sonda, si se realiza a partir de una región altamente específica, por ejemplo, al menos 8 a 10 o 12 o 15 nucleótidos contiguos en la región reguladora 5', o una región menos específica, por ejemplo, especialmente en la región codificante 3', y la rigurosidad de la hibridación o amplificación (máxima, alta, intermedia, o baja) determinará si la sonda identifica solamente secuencias de origen natural que codifican el polipéptido relacionado con B7, sus alelos, o secuencias relacionadas.

ES 2 300 340 T3

También se puede usar sondas para la detección de las secuencias relacionadas con BSL1-, BSL2-, y BSL3-, y deben preferiblemente contener al menos 60%, preferiblemente mayor que 90%, identidad al polinucleótido de BSL1, BSL2, y BSL3, o una secuencia complementaria, o sus fragmentos. Las sondas de esta invención pueden ser ADN o ARN, las sondas pueden comprender toda o un fragmento de la secuencia de nucleótidos de BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15), o una secuencia complementaria, y pueden incluir promotor, potenciador elementos, e intrones del polinucleótido de BSL1, BSL2, o BSL3 de origen natural.

Los procedimientos para producir sondas específicas de polinucleótidos relacionados con B7 incluyen la clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15), o su fragmento, en vectores para la producción de las sondas de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles, y se pueden usar para sintetizar las sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de las polimerasas de ARN apropiadas y los nucleótidos, marcados apropiados. Las sondas de hibridación se pueden etiquetar mediante una diversidad de grupos de detector/indicador, por ejemplo, los nucleótidos radiactivos tales como ³²P o ³⁵S, o las etiquetas enzimáticas, tal como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento avidina/biotina, y similares.

Se conocen una amplia diversidad de etiquetas y técnicas de conjugación y son empleadas por los expertos en la técnica y se pueden usar en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir sondas de hibridación o de PCR etiquetadas para detectar las secuencias relacionadas con polinucleótidos que codifican el péptido de BSL1, BSL2, o BSL3 incluyen etiquetado oligo, desplazamiento de mella, etiquetado final, o amplificación de la PCR usando un nucleótido etiquetado. Como alternativa, las secuencias de polinucleótidos de BSL1, BSL2, o BSL3, o cualquiera de sus porciones o fragmentos, se pueden clonar en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles, y se pueden usar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante la adición de una ARN polimerasa, tales como T7, T3, o SP(6) y los nucleótidos etiquetados. Estos productores se pueden llevar a cabo usando una diversidad de kits comercialmente disponibles (por ejemplo, de Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; Promega Corp., Madison WI; y U.S. Biochemical Corp., U.S. Biochemical Amersham, Cleveland, OH). Las moléculas o etiquetas indicadoras adecuadas que se pueden usar incluyen los nucleótidos radiactivos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

Las secuencias de polinucleótidos relacionadas con B7, o fragmentos, o sus secuencias complementarias, se pueden usar en análisis de Southern o Northern, transferencia por puntos, u otras tecnologías basadas en membrana; en tecnologías de la PCR; o en sonda de nivel, alfiler, ELISA o ensayos de bioprocador utilizando fluidos o tejidos a partir de biopsias de pacientes para detectar el estado de por ejemplo, niveles o sobreexpresión de BSL1, BSL2, o BSL3, o para detectar la expresión alterada de BSL1, BSL2, o BSL3. Tales procedimientos cualitativos y cuantitativos se conocen bien en la técnica (G.H. Keller y M.M. Manak, 1993, ADN Probes, 2ª Ed, Macmillan Publishers Ltd., England; D.W. Dieffenbach y G. S. Dveksler, 1995, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY; B.D. Hames y S.J. Higgins, 1985, Gene Probes 1, 2, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Inglaterra).

Los oligonucleótidos de BSL1, BSL2, y BSL3 se pueden sintetizar químicamente, generarse enzimáticamente, o producido a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros preferiblemente comprenderán dos secuencias de nucleótidos, una con una orientación codificante (5' → 3') y otra con una orientación no codificante (3' → 5'), se emplearán en condiciones optimizadas para la identificación de un gen o condición específico. Los mismos dos oligómeros, conjuntos encajados, de oligómeros, o incluso una combinación degenerada de oligómeros se pueden emplear en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de ADN o ARN estrechamente relacionadas.

Los procedimientos adecuados para cuantificar la expresión de los factores relacionados con B7 incluyen marcaje radiactivo de nucleótidos biotinilados, coamplificación de un ácido nucleico control, y curvas patrones en los que los resultados experimentales se interpolan (P.C. Melby *et al.* (1993) J. Immunol. Methods 159: 235-244; y C. Duplaa *et al.* (1993) Anal. Biochem. 229-236). La velocidad de cuantificar muestras múltiples se pueden acelerar desarrollando el ensayo en un formato ELISA donde el oligómero de interés se presenta en diversas diluciones y una respuesta espectrofotométrica o colorimétrica proporciona una rápida cuantificación.

En un aspecto particular, una secuencia de ácido nucleico complementaria al polinucleótido relacionado con B7, o su fragmento, puede ser útil en ensayos que detectan enfermedades relacionadas con respuestas inmunes aberrantes, particularmente las descritas en el presente documento. Un polinucleótido de BSL1, BSL2, y/o BSL3 se puede etiquetar mediante procedimientos convencionales, y añadirse a una muestra biológica de un sujeto en las condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un período de incubación adecuado, la muestra se puede lavar y se cuantifica la señal y se compara con un valor estándar. Si la cantidad de señal en la muestra de ensayo esta alterada de manera significativa a partir de la de una muestra de control negativo comparable (normal), los niveles alterados de la secuencia de nucleótidos de BSL1, BSL2, y/o BSL3 se puede correlacionar con la presencia de la enfermedad asociada. Tales ensayos se pueden usar para evaluar la eficacia de un régimen profiláctico o terapéutico particular en estudios de animales en ensayos clínicos, o para un paciente individual.

Para proporcionar una base para la diagnosis de una enfermedad asociada a la expresión alterada de uno o más factores relacionados con B7, se establece un perfil normal o estándar para la expresión. Esto se puede llevar a cabo

incubando muestras biológicas tomadas a partir de sujetos normales, o bien animal o ser humano, con una secuencia complementaria a un polinucleótido de BSL1, BSL2, BSL3, o su fragmento, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación estándar se puede cuantificar comparando los valores obtenidos a partir de sujetos normales con los de un experimento donde se usa una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Los valores convencionales obtenidos a partir de muestras normales se pueden comparar con valores obtenidos a partir de muestras de pacientes que son sintomáticos para la enfermedad. La desviación entre valores convencionales y de sujetos (pacientes) se usa para establecer la presencia de la condición.

Una vez que la enfermedad se diagnostica y se inicia un protocolo de tratamiento, los ensayos de hibridación se pueden repetir en una base regular para evaluar si el nivel de expresión en el paciente comienza a aproximarse a la que se observa en un individuo normal. Los resultados obtenidos a partir de ensayos sucesivos se pueden usar para mostrar la eficacia de tratamiento durante un período que varía entre varios días y meses.

Con respecto a las enfermedades que implican una respuesta inmune hiperactiva o hipoactiva, la presencia de niveles anormales (disminuidos o incrementados) de un transcrito relacionado con B7 en una muestra biológica (por ejemplo, fluido corporal, células, tejidos; o extractos de células o de tejido) a partir de un individuo pueden indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad, o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de los síntomas clínicos reales. Una diagnosis más definitiva de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud emplear medidas preventivas o tratamiento agresivo anterior, por lo tanto la prevención del desarrollo o progresión adicional de la enfermedad.

En un aspecto particular, los oligonucleótidos BSL2 se pueden usar para el diagnóstico basado en la PCR. Por ejemplo, la PCR se puede usar para realizar Análisis de Fragmentos Genéticos (GBA) de BSL1, BSL2, y/o BSL3 de acuerdo con los procedimientos publicados (T.T. Nikiforov *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 (20): 4167-75; T.T. Nikiforov *et al.* (1994) *PCR Methods Appl.* 3 (5): 285-91). En el GBA basado en la PCR, se amplifican primero fragmentos específicos de ADN genómico que contiene el (los) sitio(s) polimórfico(s) mediante la PCR usando un cebador no modificado y uno modificado por fosforotioato. El producto de la PCR de doble cadena se vuelve de una sola cadena y después se hibridan para inmovilizar el cebador de oligonucleótido en los pocillos de una placa de pocillos múltiples. De manera notable, los cebadores se diseñan para hibridarse inmediatamente adyacentes a sitio polimórfico de interés. El extremo 3' del cebador se extiende usando una mezcla de didesoxinucleósido trifosfatos marcados individualmente. Después se determina la etiqueta sobre la base extendida. Preferiblemente, el GBA se realiza usando ELISA semiautomático o formantos de bioprocesadores (véase, por ejemplo, S.R. Head *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (24): 5065-71; T.T. Nikiforov *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22 (20): 4167-75).

Los oligonucleótidos, o fragmentos más largos derivados de al menos una secuencia de polinucleótidos relacionada con al menos una secuencia de polinucleótidos relacionada con B7 descrita en el presente documento se pueden usar como dianas en un sistema de microdisposición (por ejemplo, bioprocesador). El microdisposición se puede usar para controlar el nivel de expresión de un gran número de genes de manera simultánea (para producir una imagen de transcrito), y para identificar variantes genéticas, mutaciones, y polimorfismos. Esta información se pueden usar para determinar la función del gen, para entender la base genética de una enfermedad, para diagnosticar la enfermedad, y para desarrollar y controlar las actividades de agentes terapéuticos y profilácticos. La preparación y uso de microdisposiciones se han descrito en el documento WO 95/11995 de Chee *et al.*; D.J. Lockhart *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 1675-1680; M. Schena *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10614-10619; Patente de Estados Unidos N°. 6.015.702 de P. Lal *et al.*; J. Worley *et al.* (2000) *Microarray Bioprocesador Technology*, M. Schena, ed., *Biotechniques Book*, Natick, MA, pp. 65-86; Y.H. Rogers *et al.* (1999) *Anal. Biochem.* 266 (1): 23-30; S.R. Head *et al.* (1999) *Mol. Cell. Probes.* 13 (2): 81-7; S.J. Watson *et al.* (2000) *Biol. Psychiatry* 48 (12): 1147-56.

Las microdisposiciones que contienen disposiciones de las secuencias de polinucleótido relacionadas con B7 se pueden usar para medir los niveles de expresión de los factores relacionados con B7 en un individuo. En particular, para diagnosticar un individuo con una afección o enfermedad correlacionada con los niveles de expresión de BSL1, BSL2, y/o BSL3, una muestra de un animal o ser humano (que contiene, por ejemplo, ARNm) se puede usar como una sonda sobre un bioprocesador que contiene una disposición de los polinucleótidos de BSL1, BSL2, y/o BSL3 (por ejemplo, ADN) en concentraciones decrecientes (por ejemplo, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, etc.). La muestra de ensayo se puede comparar con las muestras de muestras de enfermos y normales. Los bioprocesadores también se pueden usar para identificar mutaciones o polimorfismo de BSL1, BSL2, y BSL3 en una población, que incluye pero no se limita a, supresiones, inserciones, y falta de coincidencias. Por ejemplo, se pueden identificar mutaciones mediante:

(i) colocar de polinucleótidos relacionados con B7 de esta invención en un bioprocesador; (ii) tomar una muestra de ensayo (que contiene, por ejemplo, ARNm) y añadir a muestra al bioprocesador; (iii) determinar en las muestras de ensayo si las muestras de ensayo se hibridan a los polinucleótidos relacionados con B7 unidos al procesador en diversas condiciones de hibridación (véase, por ejemplo, V.R. Chechetkin *et al.* (2000) *J. Biomol. Struct. Dyn.* 18 (1): 83-101). Como alternativa se puede realizar la secuenciación de las microdisposiciones (véase, por ejemplo, E.P. Diamandis (2000) *Clin. Chem.* 46 (10): 1523-5).

Una secuencia de ácido nucleico relacionada con B7, o una secuencia complementar, o su fragmento, se puede usar como sondas que son útiles para mapear la secuencia genómica de origen natural. Las secuencias se pueden mapear a un cromosoma particular, a una región específica de un cromosoma, o a construcciones cromosómicas específicas (HACs), cromosomas artificiales de levaduras (YACs), cromosomas artificiales bacterianos (BACs), construcciones

ES 2 300 340 T3

bacterianas de PI, o genotecas de ADNc de un único cromosoma (véase C.M. Price (1993) *Blood Rev.*, 7: 127-134 y por B.J. Trask (1991) *Trends Genet.* 7: 149-154).

Los anticuerpos que se unen de manera específica al polipéptido de BSL2 se pueden usar para la diagnosis de condiciones o enfermedades caracterizadas por la inferior expresión o sobreexpresión del polinucleótido o polipéptido de BSL2, o en ensayos para controlar a los pacientes tratados con un polipéptido o péptido de BSL2, o un agonista, antagonista, o inhibidor de BSL2. Los anticuerpos útiles para propósitos de diagnóstico se pueden preparar de la misma manera que aquellos para uso en los procedimientos terapéuticos, descritos en el presente documento. Los ensayos de diagnóstico para un polipéptido de BSL2 incluyen procedimientos que utilizan el anticuerpo y una etiqueta para detectar la proteína en muestras biológicas (por ejemplo, fluidos corporales humanos, células, tejidos, o extractos de células o tejidos). Los anticuerpos se pueden usar con o sin modificación, y se pueden etiquetar uniéndolos, o bien de manera covalente o no covalente, con una molécula indicadora. Se pueden usar una amplia diversidad de moléculas indicadoras que se conocen. En la técnica, varias de las cuales se describen en el presente documento.

Se conocen un número de materiales fluorescentes y se pueden utilizar para etiquetar un polipéptido relacionado con B7 o anticuerpos que se unen de manera específica a ellos. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Texas Red, azul AMCA y amarillo Lucifer. Un material de detección particular es anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugados con fluoresceína mediante un isotiocianato. Los polipéptidos relacionados con B7 o anticuerpos de ellos también se pueden marcar con un elemento radiactivo con o sin enzima. La etiqueta radiactiva se puede detectar mediante cualquiera de los procedimientos de conteo actualmente disponibles. Los isótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , y ^{186}Re . Las etiquetas de enzima son del mismo modo útiles, y se pueden detectar mediante cualquiera de las técnicas actualmente utilizadas calorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas, o gasométricas. La enzima se puede conjugar mediante reacción con moléculas de formación de puentes tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído, y similares. Muchas enzimas, que se pueden usar en estos procedimientos, se conocen y se pueden usar. Se prefieren peroxidasa, β -glucuronidasa, β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa, y fosfatasa alcalina (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 3.654.090; 3.850.752; y 4.016.043).

Los diagnósticos basados en anticuerpos y su aplicación son familiares para los expertos en la técnica y se pueden usar de acuerdo con la presente invención. Como ejemplos no limitantes, se pueden usar ensayos "competitivos" (patentes de Estados Unidos números 3.654.090 y 3.850.752), "sándwich" (Patente de Estados Unidos N° 4.016.043), y de "doble anticuerpo", o de "DASP". Varios procedimientos incluyendo ELISA, RIA, y FACS para medición del polipéptido relacionado con los niveles de B7 se muestran en la técnica y proporcionan una base para diagnosticar niveles alterados o anormales de la expresión del polipéptido relacionado con B7. Los valores normales o convencionales para la expresión del polipéptido relacionado con B7 se establecen mediante incubación de las muestras biológicas tomadas para los sujetos normales, preferiblemente seres humanos, con anticuerpos para el polipéptido relacionado con B7 en condiciones adecuadas para la la formación de complejos. La cantidad de formación de complejo estándar se puede cuantificar mediante diversos procedimientos; se prefieren medios fotométricos. Los niveles del polipéptido relacionado con B7 expresados en la muestra sujeto, muestra de control negativo (normal), y muestra de control positivo (enferma) se comparan con los valores convencionales. La desviación entre los valores convencionales y del sujeto establece los parámetros para el diagnóstico de la enfermedad.

En otro de sus aspectos, esta invención se refiere a kits de diagnóstico para detectar polinucleótido(s) o polipéptido(s) relacionado(s) con B7 ya que se refiere a kits de diagnóstico una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad, particularmente a una enfermedad, particularmente los trastornos del sistema inmune descritos en el presente documento. Tales kits comprenden uno o más de los siguientes:

(a) un polinucleótido relacionado con B7 como se define en las reivindicaciones anexas, preferiblemente la secuencia de nucleótidos de BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12) o su fragmento; o

(b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a); o

(c) un polipéptido relacionado con B7, preferiblemente el polipéptido de BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13) o su fragmento; o

(d) un anticuerpo para el polipéptido relacionado con B7 como se define en las reivindicaciones anexas, preferiblemente para el polipéptido de BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13) o un anticuerpo que se puede unir a su fragmento. Se apreciará que cualesquiera de tales kits, (a), (b), (c), o (d) puede comprender un componente sustancial y que se pueden incluir las instrucciones para uso. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como tampones, estabilizantes, etc.

La presente invención también incluye un kit de ensayo para la selección genética que se puede utilizar para identificar mutaciones en los factores relacionado con B7. Mediante la identificación de pacientes con AND mutado de BSL2 y mediante la comparación de la mutación con una base de datos que contiene mutaciones conocidas en BSL2 y una afección o enfermedad particular, se puede realizar la identificación y/o de una afección o enfermedad particular. De acuerdo con lo anterior, tal kit comprendería un ensayo basado en PCR que implicaría la transcripción del ARNm de los pacientes con un cebador específico, y amplificación del ADNc resultante usando otro conjunto de cebadores. El producto amplificado sería detectable mediante electroforesis en gel y se podría comparar

con patrones conocidos para BSL2. Preferiblemente, este kit utilizaría una muestra de la sangre, suero, o saliva de un paciente, y el ADN se extraería usando técnicas convencionales. Los cebadores que flanquean una mutación conocida se usarían después para amplificar un fragmento de BSL2. La parte amplificada se amplificaría después para determinar la presencia de una mutación.

Agentes terapéuticos

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones descritas en el presente documento comprenden un ácido nucleico, polipéptido, anticuerpo, ligando, modulador relacionado con B7 (por ejemplo, agonista, antagonista, o inhibidor), o fragmentos o sus variantes funcionales, y un vehículo, excipiente, o diluyente fisiológicamente aceptable como se describe en detalle en el presente documento. La presente invención además contempla composiciones farmacéuticas útiles en la práctica de los procedimientos terapéuticos de esta invención. Preferiblemente, una composición farmacéutica incluye, en mezcla, un excipiente (vehículo) farmacéuticamente aceptable y uno o más de un polipéptido, ácido nucleico, ligando, modulador, anticuerpo o fragmento o su equivalente funcional relacionado con B7, como se describe en el presente documento, como un ingrediente activo. Debido a que los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 son componentes celulares de origen natural, se pueden administrar a un sistema circulatorios del individuo con un riesgo mínimo de complicaciones inmunológicas no deseadas.

La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen reactivos biológicos como ingredientes activos se entiende bien en la técnica. De manera típica, tales composiciones se preparan como inyectables, o bien como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también se pueden preparar las formas sólidas adecuados para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. El ingrediente terapéutico activo a menudo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y sus combinaciones. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponación de pH, que potencian la eficacia del ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas se pueden producir y emplear en los protocolos de tratamiento de acuerdo con los procedimientos establecidos dependiendo del trastorno o enfermedad a tratar (véase, por ejemplo. P.D. Mayne (1996) *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*, 6ª ed., Oxford University Press, Oxford, England; Gilman *et al.*, Eds. (1990) *Goodman y Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª ed., Pergamon Press; Avis *et al.*, Eds. (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Dekker, New York, NY; y Lieberman *et al.*, Eds. (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, New York, NY).

Las composiciones farmacéuticas se pueden producir como formas neutras y de sal. Las sales se pueden formar con muchos ácidos, que incluyen, pero no se limitan a, ácidos clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico y succínico. Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, supositorios, comprimidos, píldoras, cápsulas, compuestos de liberación sostenida, o polvos. Tales formulaciones pueden contener 10%-95% (p/p) del ingrediente activo, Preferiblemente 25%-70% (p/p). Si el compuesto activo se administra mediante inyección, por ejemplo, se pueden administrar aproximadamente 1 µg-3 mg y preferiblemente entre aproximadamente 20 µg-500 µg de compuesto activo (por ejemplo, polipéptido relacionado con B7) por unidad de dosificación. Las preparaciones y composiciones farmacéuticas también pueden contener uno o más vehículo(s), excipiente(s), diluyente(s), disgregante(s), lubricante(s), plastificante(s), carga(s), colorante(s), vehículo(s) de dosificación, potenciador(es) de absorción, estabilizante(s), o bactericida(s). La producción y formulación de tales composiciones y preparaciones se llevan a cabo mediante procedimientos conocidos y puestas en práctica en la técnica.

Las formulaciones ejemplares se proporcionan a continuación:

Formulación I intravenosa:

Ingrediente	mg/ml
BSL1, BSL2, o BSL3 MAb	5,0
Dextrosa USP	45,0
Bisulfito de sodio USP	3,2
Edetato disódico USP	0,1
Agua para inyección cantidad suficiente para	1,0 ml

ES 2 300 340 T3

Formulación II intravenosa:

Ingrediente	mg/ml
BSL1, BSL2, o BSL3 MAb	5,0
Bisulfito de sodio USP	3,2
Edetato disódico USP	0,1
Agua para inyección cantidad suficiente para	1,0 ml

Formulación III intravenosa:

Ingrediente	mg/ml
Proteína de BSL1, BSL2, o BSL3, proteína de fusión de Ig, o agonista	10,0
Bisulfito de sodio USP	3,2
Edetato disódico USP	0,1
Agua para inyección cantidad suficiente para	1,0 ml

Formulación IV intravenosa:

Ingrediente	mg/ml
Proteína de BSL1, BSL2, o BSL3, proteína de fusión de Ig, o agonista	10,0
Dextrosa USP	45,0
Bisulfito de sodio USP	3,2
Edetato disódico USP	0,1
Agua para inyección cantidad suficiente para	1,0 ml

Como se usa en el presente documento, “pg” significa picogramo, “ng” significa nanogramo, “μg” significa microgramo, “mg” significa miligramo, “μl” significa microliter, “ml” significa mililitro, y “l” significa litro.

Después de la preparación de las composiciones farmacéuticas, se pueden colocar en recipientes adecuados y etiquetarse para el tratamiento de las afecciones indicadas. Tal etiquetado puede incluir cantidad, frecuencia, y procedimiento de administración. Las preparaciones se pueden administrar sistémica mediante vías oral o parenteral. Las vías parenterales no limitantes de administración incluyen subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, transdérmica, inhalación, intranasal, intraarterial, intratecal, entérica, sublingual, o rectal.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene uno o más polipéptidos, proteínas de fusión, fragmentos de péptido, o anticuerpos relacionados con B7 que reaccionan de manera específica con estos componentes en una cantidad suficiente para reducir, mejorar, o eliminar una enfermedad o trastorno relacionado con los niveles de activación alterados de células de respuestas inmunes o inflamatorias, tales como Células T. Se puede introducir una cantidad eficaz en una administración o sobre la administración repetida a un individuo que se

está tratando. A la administración terapéutica puede seguir la administración profiláctica, después del tratamiento de la enfermedad. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad eficaz para prevenir una enfermedad y dependerá de la enfermedad y sujeto específico. La dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente, por ejemplo, o bien en ensayos de cultivos de células o en modelos animales, usualmente ratones, ratas, conejos, perros, ovejas, cabras, cerdos, o primates no humanos. El modelo animal también se puede usar para determinar la dosis tolerada máxima y vía apropiada de administración. Tal información se puede usar después para determinar las dosis útiles para la administración a seres humanos.

La administración de las composiciones terapéuticas a un sujeto se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, a dosificaciones y durante períodos de tiempo eficaces para lograr el resultado eficaz. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptidos, proteínas de fusión, péptidos, o anticuerpos relacionados con B7, que reaccionan con estos componentes pueden variar de acuerdo con los factores tales como la edad, sexo, y peso del individuo, y de la capacidad de tratamiento de inducir una respuesta deseada en el individuo. Las dosificaciones se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis secuenciales se pueden administrar diariamente o la dosis de puede reducir de manera proporcional como se indica en las exigencias de la situación terapéutica.

Terapia de transferencia génica: Además, las células huésped que están modificadas por ingeniería genética para llevar a cabo el gen que codifica un polipéptido, proteína de fusión o fragmento de péptido de la secuencia de polipéptidos relacionados con B7 de la secuencia de polipéptidos de BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15), se pueden introducir en un individuo en necesidad de la inmunomodulación. Después de la expresión y producción del polipéptido o péptido relacionado con B7 por la célula huésped, el polipéptido, proteína de fusión, o péptido relacionado con B7 así producida pueden actuar para unirse a CD28 y/o ligando(s) relacionado(s) con para modular la activación de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T) en el receptor. Las células huésped se pueden modificar por ingeniería genética mediante una diversidad de técnicas moleculares y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, transfección, infección, o transducción. Transducción como se usa en el presente documento se refiere comúnmente a las células que se han modificado por ingeniería genética para que contengan un gen foráneo o heterólogo mediante la introducción de un vector viral o no viral en las células. La transfección de manera más común se refiere a las células que se han modificado por ingeniería genética para que contengan un gen foráneo o albergado en un plásmido, o vector no viral. Las células huésped se pueden transfectar o transducir mediante diferentes vectores y de esta manera pueden servir como vehículos de distribución de genes para transferir los productos expresados en el músculo.

Aunque los vectores virales se prefieren para las terapias de transferencia génica, las células se pueden modificar por ingeniería genética para que contengan las secuencias de ácido nucleico que codifican el (los) producto(s) génico(s) deseado(s) mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden modificar por ingeniería genética mediante fusión, transfección, lipofección mediada por el uso de liposomas, electroporación, precipitación con DEAE-Dextrano o fosfato de calcio, bombardeo de partículas (biolística) con partículas revestidas con ácido nucleico (por ejemplo, partículas de oro), microinyección, o microorganismos modificados por ingeniería genética (K. Yazawa *et al.* (2000) Cancer Gene Ther. 7: 269-274). Los vectores para la introducción de ácido nucleico heterólogo (es decir, foráneo) (ADN o ARN) en las células musculares para la expresión de productos bioactivos activos se conocen bien en la técnica. Tales vectores poseen una secuencia promotora, preferiblemente un promotor que es específica de las células y se coloca cadena arriba de la secuencia a expresar. Los vectores también pueden contener, opcionalmente, uno o más genes marcadores que se pueden expresar para la expresión como una indicación de la transfección exitosa y expresión de las secuencias de ácidos nucleicos contenidos en el vector. Además, los vectores se pueden optimizar para minimizar la inmunogenicidad no deseada y maximizar la expresión a largo plazo del (de los) producto(s) génico(s) deseado(s) (véase Nabel (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 324-326). Además, los vectores se pueden elegir basándose en el tipo de células que se dirige para tratamiento. Por ejemplo, se han descrito los vectores para el tratamiento de células tumorales o cancerosas (P.L. Hallenbeck *et al.* (1999) Hum. Gene Ther. 10: 1721-1733; T. Shibata *et al.* (2000) Gene Ther. 7: 493-498; M. Puhlmann *et al.* (2000) Cancer Gene Ther. 7: 66-73; N. Krauzewicz *et al.* (2000) Adv. Exp. Med. Biol. 465: 73-82).

Los ejemplos ilustrativos de los vehículos o construcciones de vector para la transfección o infección de las células huésped incluyen vectores virales defectuosos en replicación, vectores de virus de ADN, o de virus de ARN (retrovirus), tales como adenovirus, virus herpes simplex y vectores virales asociados a adeno. Los vectores virales asociados a adeno son de una sola cadena y permiten la distribución eficaz de de copias múltiples de ácido nucleico al núcleo de la célula. Se prefieren los vectores de adenovirus. Los vectores normalmente estarán de manera sustancial libres de cualquier ADN procariótico y pueden comprender un número de secuencias de ácido nucleico funcionales. Un ejemplo de tales secuencias funcionales puede ser una región de ADN que comprende secuencias reguladoras del inicio de la traducción y terminación, que incluyen promotores (por ejemplo, promotores fuertes, promotores inducibles, y similares) y potenciadores que son activos en las células huésped. También se incluyen como parte de de las secuencias de función una fase de lectura abierta (secuencia de polinucleótidos) que codifica una proteína de interés. Las secuencias flanqueantes también se pueden incluir para la integración dirigida al sitio. En algunas situaciones, la secuencia que flanquea 5' permitirá la recombinación homóloga, cambiando de este modo la naturaleza de la región de inicio de la transcripción, para proporcionar de esta manera la transcripción inducible o no inducible e incrementar o disminuir el nivel de la transcripción, como ejemplo.

En general, el factor relacionado con B7 codificado y especificado puede ser intracelular, es decir, retenida en el citoplasma, núcleo, o un orgánulo de una célula, o se puede secretar por la célula. Para la secreción, la secuencia señal natural presente en el gen estructural relacionado con B7 se puede retener. Cuando el polipéptido o péptido es un fragmento de un factor relacionado con B7 que es mayor, se puede proporcionar una secuencia de señal de manera que, tras la secreción y procesamiento en el sitio de procesamiento, la proteína deseada tendrá la secuencia natural. Los ejemplos específicos de secuencias codificantes de interés para uso de acuerdo con la presente invención incluyen las secuencias que codifican el polipéptido de BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13). Como se ha indicado previamente, un marcador puede estar presente para la selección de células que contienen la construcción del vector. El marcador puede ser un gen inducible o no inducible y en general permitirá la selección positiva bajo inducción, o sin inducción, respectivamente. Los ejemplos de genes marcadores incluyen neomicina, dihidrofolato reductasa, glutamina sintasa, y similares.

El vector empleado en general también incluyen un origen de replicación y otros genes que son necesarios para la replicación en las células huésped, como se emplea de manera rutinaria por los expertos en la técnica. Como un ejemplo, el sistema de replicación que comprende el origen de la replicación y cualesquiera proteínas asociadas a la replicación codificada por un virus particular se puede incluir como parte de la construcción. El sistema de replicación se debe seleccionar de manera que los genes que codifican los productos necesarios para la replicación no transforman por último las células. Tales sistemas de replicación se representan por los adenovirus defectuosos en replicación (véase G. Acsadi *et al.* (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 579-584) y por el virus Epstein-Barr. Los ejemplos de los vectores de defectuosos en la replicación, particularmente, vectores retrovirales que son defectuosos en la replicación son BAG, (véase Price *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 156; Sanes *et al.* (1986) EMBO J., 5: 3133). Se entenderá que la construcción del gen final puede contener uno o más genes de interés, por ejemplo, un gen que codifica una molécula metabólica bioactiva. Además, se puede emplear el ADNc, ADN producido de manera sintética o ADN de cromosomas utilizando los procedimientos y protocolos conocidos y practicados por los expertos en la técnica.

De acuerdo con un planteamiento para la terapia génica, se inyecta directamente un vector que codifica el factor relacionado con B7 en las células receptoras (terapia génica *in vivo*). Como alternativa, las células de los receptores propuestos se explantan, se modifican genéticamente para que codifiquen un factor relacionado con B7, y se vuelven a implantar en el donante (terapia génica *ex vivo*). Un planteamiento *ex vivo* proporciona la ventaja de transferencia génica viral eficaz, que es superior a los planteamientos de transferencia génica *in vivo*. De acuerdo con la terapia génica *ex vivo*, las células huésped se infectan primero con los vectores virales modificados por ingeniería genética que contienen al menos un gen relacionado con B7 que codifica un producto génico relacionado con B7, se suspende en un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable tales como solución salina o solución salina tamponada con fosfato, y similares, y después se administra al huésped. El producto génico deseado se expresa mediante las células inyectadas, que de este modo introducen el producto génico en el huésped. Los productos génicos introducidos se pueden por lo tanto introducir para tratar o mejorar un trastorno que se relaciona con los niveles alterados de la activación de células de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T).

Procedimientos de inmunomodulación

Las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de BSL2 se pueden usar en el desarrollo de reactivos terapéuticos que tienen la capacidad para o bien regular hacia arriba (amplificar) o regular hacia abajo (suprimir) respuestas inmunes (por ejemplo, activación de células T). En particular, los polipéptidos relacionados con B7 pueden interactuar con CD28 y por lo tanto regular hacia arriba la actividad celular inmune. Como alternativa, los polipéptidos relacionados con B7 pueden interactuar con CTLA-4 y por lo tanto regular hacia abajo la actividad celular inmune. Por ejemplo, las formas solubles, dimericas de los polipéptidos relacionados con B7 que se unen a CD28 y/o al (a los) ligando(s) relacionados con CD28 pero no proporcionan una señal coestimuladora a las Células T, se pueden usar para bloquear la activación de las células T, y por lo tanto proporcionar un medio específico por el que se induce tolerancia en un sujeto. De manera similar, los anticuerpos dirigidos contra uno o más factores relacionados con B7 se pueden usar para bloquear la interacción entre los factores relacionados con B7 y su (sus) ligando(s) afín(es), previniendo por lo tanto la activación la activación de las células de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T). Además, las proteínas de fusión que comprenden al menos un fragmento de un factor relacionado con B7 condensado a al menos el dominio de Fc de una molécula de IgG se puede usar para regular hacia arriba o hacia abajo las células que expresan el (los) ligando(s) afín(es) del factor relacionado con B7 (por ejemplo, Células T). Además, los oligonucleótidos, no codificantes o tríplex que se unen a la secuencia de nucleótidos de uno o más factores relacionados con B7 se pueden usar para disminuir la expresión de estos factores. Por el contrario las formas de la superficie celular, multivalentes de los factores relacionados con B7 que se unen a CD28 y/o ligando(s) relacionado(s) con CD28 proporcionan una señal coestimuladora para las células de respuestas inmunes o inflamatorias, tales como Células T, se pueden usar para incrementar la activación de estas células. También es posible utilizar más de un factor, proteína de fusión, anticuerpo o sus fragmentos terapéuticamente activos relacionados con B7, con el fin de regular hacia arriba o hacia abajo la actividad celular inmune o inflamatorias (por ejemplo, células T) en un sujeto animal o ser humano.

Más específicamente, dada la estructura y función de los factores relacionados con B7 descritos en el presente documento, es posible regular hacia arriba o regular hacia abajo la función de un factor relacionado con B7- de numerosas formas. La regulación hacia abajo o prevención de una o más funciones de los factores relacionados con B7 (es decir, prevención de la síntesis de linfoquinas de alto nivel mediante las células T activadas) debe ser útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoides, esclerosis múltiple, Lupus eritematoso, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, diabetes mellitus

insulina dependiente, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, pénfigo, enfermedad de Crohn, oftalmia simpática, uveitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, polimiositis y enfermedad mixta del tejido conectivo. Los factores relacionados con B7 también pueden regular hacia abajo el tratamiento de la inflamación relacionada con psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, y aterosclerosis. Además, los factores relacionados con B7 pueden regular hacia abajo el tratamiento de tejido, médula ósea, y trasplante de órganos, e injerto contra enfermedad de huésped. Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células T debe dar como resultado la destrucción de tejido reducida en el trasplante de tejidos. De manera típica, en los trasplantes de tejidos el rechazo del trasplante se inicia mediante su reconocimiento como material foráneo, seguido de una reacción inmune que destruye el trasplante. Las moléculas relacionadas con B7 de la presente invención también se puede usar para tratar o prevenir cánceres como se describe en detalle más adelante.

Las moléculas de ácido nucleico relacionadas con B7 se pueden usar para diseñar agentes terapéuticos para bloquear la función de uno o más factores relacionados con B7. En particular, los oligonucleótidos no codificantes o tríplex se pueden administrar para prevenirla expresión de los factores de BSL1, BSL2, y/o BSL3. Por ejemplo, un oligonucleótido (por ejemplo, oligonucleótido de ADN) que se hibrida al ARNm de BSL1, BSL2, y/o BSL3 se pueden usar para dirigir el ARNm para la digestión por la ARNasaH. Como alternativa, un oligonucleótido que se hibrida al sitio de inicio de la traducción del ARNm de BSL1 (SEQ ID NO: 1 o 3), BSL2 (SEQ ID NO: 6, 10, ó 12), o BSL3 (SEQ ID NO: 14) se puede usar para evitar la traducción de ARNm. En otro planteamiento, se pueden administrar los oligonucleótidos que se unen al ADN de cadena doble del (de los) gen(es) de BSL1, BSL2, y/o BSL3. Tales oligonucleótidos pueden formar una construcción tríplex y prevenir el desenrollado y transcripción del ADN que codifica el factor relacionado con B7 dirigido. En todos los casos, el oligonucleótido apropiado se puede sintetizar, formular como una composición farmacéutica, y administrarse a un sujeto. La síntesis y utilización de los oligonucleótidos no codificantes y tríplex se han descrito previamente (por ejemplo, H. Simon *et al.* (1999) Antisense Ácido nucleico Drug Dev. 9: 527-31; F.X. Barre *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3084-3088; R. Elez *et al.* (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 269: 352-6; E.R. Sauter *et al.* (2000) Clin. Cancer Res. 6: 654-60).

Los oligonucleótidos no codificantes son especies de oligonucleótidos de origen natural o especies sintéticas formadas a partir de las subunidades de origen natural o sus homólogos cercanos. Los oligonucleótidos no codificantes también pueden incluir restos que funcionan de manera similar a los oligonucleótidos, pero que tienen partes de origen no natural. De este modo, los oligonucleótidos no codificantes pueden tener restos de azúcar alterados o enlaces entre azúcar. Los ejemplos entre éstos son fosfotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica.

En las realizaciones preferidas, al menos uno de los enlaces fosfodiéster del oligonucleótido no codificante se ha sustituido con una estructura que funciona para potenciar la capacidad de los compuestos de penetrar en la región de las células donde se localiza el ARN cuya actividad se va a modular. Se prefiere que tales sustituciones comprendan enlaces fosfotioato, enlaces metil fosfonato, o estructuras de alquilo o cialoalquilo de cadena corta. De acuerdo con otras realizaciones preferidas, los enlaces fosfodiéster están sustituidas con estructuras que son a la vez, sustancialmente no iónicos y no quirales, o con estructuras que son quirales y enantioméricamente específicos. Las personas expertas en la técnica serán capaces de seleccionar otros enlaces para uso en la práctica de la invención.

Los oligonucleótidos no codificantes también pueden incluir las especies que incluyen al menos alguna forma de base modificada. De este modo, las purinas y pirimidinas distintas de las encontradas normalmente en la naturaleza se pueden emplear también. De manera similar, las modificaciones sobre las partes furanósilas de las subunidades de nucleótidos también se pueden efectuar, siempre que los principios de esta invención se mantengan. Los ejemplos de tales modificaciones son los nucleótidos 2'-O-alquil- y 2'-halógeno- sustituidos. Algunos ejemplos no limitantes de las modificaciones en la posición 2' de restos azúcar que son útiles en la presente invención incluyen OH, SH, SCH₃, F, OCH₃, OCN, O(CH₂)_n NH₂ y O(CH₂)_n CH₃, en la que n está entre 1 y aproximadamente 10. Tales oligonucleótidos no codificantes se pueden intercambiar de manera funcional con los oligonucleótidos naturales u oligonucleótidos sintetizados, que tienen una o más diferencias de la estructura natural. Estos análogos están comprendidos por esta invención mientras que funciones de manera eficaz para hibridizarse con el ADN o ARN de BSL1, BSL2, o BSL3 para inhibir su función.

Para los agentes terapéuticos no codificantes, los oligonucleótidos preferiblemente comprenden entre aproximadamente 3 y aproximadamente 50 subunidades. Se prefiere más que estos oligonucleótidos y análogos comprendan entre aproximadamente 8 y aproximadamente 25 subunidades y todavía se prefiere más entre aproximadamente 12 y aproximadamente 20 subunidades. Como se define en el presente documento, una "subunidad" es una combinación de base y azúcar unida de manera adecuada a subunidades adyacentes mediante enlaces fosfodiéster u otros enlaces.

Los oligonucleótidos no codificantes se pueden producir mediante técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Shewmaker *et al.*, Patente de Estados Unidos n° 5.107.065). Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta invención se pueden preparar de manera conveniente y rutinaria mediante la técnica bien conocida de la síntesis de fase sólida. El equipo para tal síntesis está disponible a partir de diversos vendedores, que incluyen PE Applied Biosystems (Foster City, CA). También se puede emplear cualquier otro medio para tal síntesis, sin embargo, la síntesis real de los oligonucleótidos está dentro de las capacidades del facultativo. También se conoce bien la preparación de otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados.

Los oligonucleótidos se diseñan para que se puedan hibridar con el ARN de BSL2 (por ejemplo, ARNm) o DNA. Por ejemplo, un oligonucleótido (por ejemplo, oligonucleótido de ADN) que se hibrida al ARNm relacionado con B7 se puede usar para dirigir el ARNm para la digestión con ARNasaH. Como alternativa, un oligonucleótido que se hibrida con el sitio de inicio de la traducción del ARNm relacionado con B7 se puede usar para prevenir la traducción del ARNm. En otro planteamiento, se pueden administrar los oligonucleótidos que se unen al ADN de cadena doble de BSL2. Tales oligonucleótidos pueden formar una construcción tríplex e inhibir la transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de BSL2. El apareamiento de hélice triple evita que la hélice doble se abra lo suficiente para permitir la unión de las polimerasas, factores de transcripción, o moléculas reguladoras. Se han descrito los avances terapéuticos recientes que usan el ADN tríplex (véase, por ejemplo, J.E. Gee *et al.* (1994) *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY).

Como ejemplos no limitantes, los oligonucleótidos no codificantes se pueden dirigir para hibridarse a las siguientes regiones: región de caperuza de ARNm; sitio de inicio de la traducción; sitio de la terminación de la transcripción; señal de poliadenilación; región no traducida en 3'; región no traducida en 5'; región codificante en 5'; región codificante media; y región codificante en 3'. Preferiblemente, el oligonucleótido complementario se diseña para hibridarse a la secuencia más única en 5' en BSL1, BSL2, o BSL3, incluyendo cualquiera de los aproximadamente 15-35 nucleótidos que se extienden sobre la secuencia codificante en 5'. Los oligonucleótidos apropiados se pueden diseñar usando el software OLIGO (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO; <http://www.olygo.net>).

Se puede sintetizar el oligonucleótido no codificante, formularse como una composición farmacéutica, y administrarse a un sujeto. La síntesis y utilización de los oligonucleótidos no codificante y tríplex se han descrito previamente (por ejemplo, H. Simon *et al.* (1999) *Antisense Nucleic acid Drug Dev.* 9: 527-31; F.X. Barre *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3084-3088; R. Elez *et al.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:352-6; E.R. Sauter *et al.* (2000) *Clin. Cancer Res.* 6: 654-60). Como alternativa, los vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, virus herpes o vaccinia, o a partir de diversos plásmidos bacterianos se pueden usar para distribuir las secuencias de nucleótidos al órgano, tejido o población de células diana. Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores recombinantes que expresarán la secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3. Estas técnicas se describen ambas en Sambrook *et al.* (1989) y en Ausubel *et al.* (1992). Por ejemplo, la expresión de BSL1, BSL2, o BSL3 se pueden inhibir mediante la transformación de una célula o tejido con un vector de expresión que exprese.

Altos niveles de secuencias que no se pueden traducir secuencias codificantes o no codificantes. Incluso en la ausencia de integración en el ADN, tales vectores pueden continuar transcribiendo moléculas de ARN hasta que se desactivan mediante nucleasas endógenas. La expresión transitoria puede continuar durante un mes o más con un vector no replicante, e incluso más si los elementos de replicación apropiado incluidos en el sistema de vector.

Se pueden usar diversos ensayos para ensayar la capacidad de oligonucleótidos no codificantes específicos para inhibir la expresión de BSL1, BSL2, o BSL3. Por ejemplo, los niveles de ARNm se pueden determinar mediante análisis de transferencia de Northern (Sambrook *et al.* (1989); Ausubel *et al.* (1992); J.C. Alwine *et al.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354; I.M. Bird (1998) *Methods Mol. Biol.* 105: 325-36), análisis de RT-PCR cuantitativo o semicuantitativo (véase, por ejemplo, W.M. Freeman *et al.* (1999) *Biotechniques* 26: 112-122; Ren *et al.* (1998) *Mol. Brain Res.* 59: 256-63; J.M. Cale *et al.* (1998), *Methods Mol. Biol.* 105: 351-71), o hibridación *in situ* (revisión por A.K. Raap (1998) *Mutat. Res.* 400: 287-298). Como alternativa, los oligonucleótidos no codificantes se pueden determinar mediante medición de los niveles del polipéptido BSL1, BSL2, o BSL3, por ejemplo, mediante análisis de transferencia de Western, técnicas de inmunofluorescencia, inmunoprecipitación indirectas (véase, por ejemplo, J.M. Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM*, Humana Press, Totowa, NJ).

El polipéptido relacionado con las secuencias de B7 también pueden ser útiles en el diseño de agentes terapéuticos para bloquear o potenciar la actividad de células de respuestas inmunes (por ejemplo, Células T). Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende la parte soluble de un polipéptido relacionado con B7 conjugado con el dominio de Fc de IgG humana se puede construir mediante técnicas recombinantes convencionales descritas anteriormente. Las proteínas de fusión BSL1-Ig, BSL2-Ig, y/o BSL3-Ig, se pueden preparar en forma de una composición farmacéutica y administrarse a un sujeto. Las proteínas de fusión de BSL1-Ig, BSL2-Ig, y/o BSL3-Ig se pueden usar para dirigir las Células T específicas para destrucción, reduciendo por lo tanto la activación global de las células T. Tales procedimientos de tratamiento se pueden modelar sobre experimentos de animales, que utilizan CTLA-4-Ig para evitar el rechazo de trasplante homólogo cardíaco (Turka *et al.*, *supra*). Los expertos en la técnica entenderán que tales procedimientos se pueden adaptar para uso en seres humanos, y para uso con otras condiciones alternativas, incluyendo diversos trasplantes y enfermedades autoinmunes. Como alternativa, las proteínas de fusión de BSL1-Ig, BSL2-Ig, y/o BSL3-Ig se pueden usar para potenciar la activación de las células T. Por ejemplo, las proteínas de fusión de BSL2-Ig y BSL3-Ig se pueden usar como moléculas coestimuladoras como se describe en detalle en el presente documento.

Como un planteamiento alternativo, los anticuerpos que específicamente reaccionan con los polipéptidos o péptidos relacionados con B7 se pueden usar para bloquear la actividad de las células de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T). Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos relacionados que se unen a péptidos o polipéptidos que comprenden las secuencias de BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15) se pueden formular en forma de composiciones farmacéuticas y administrarse solas o en combinación a un

sujeto. Tales anticuerpos después pueden inhibir la interacción de los polipéptidos relacionados con B7 con CD28 y/o ligandos relacionados con CD28, y por lo tanto evitan la activación de las células T. Los tratamientos que utilizan anticuerpos dirigidos contra los factores relacionados con B7 se pueden modelar sobre experimentos de animales, que usan anticuerpos contra CD28, B7-1, o B7-2 (D.J. Lenschow *et al.* (1995) *Transplantation* 60: 1171-1178; Y. Seko *et al.* (1998) *Circ. Res.* 83: 463-469; A. Haczku *et al.* (1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 1638-1643). Los expertos en la técnica pueden adaptar tales procedimientos para uso en seres humanos, y para uso con diversas condiciones que implican inflamación o trasplante.

Se ha de observar que los agentes terapéuticos basados en anticuerpo producidos a partir de fuentes no humanas pueden provocar una respuesta inmune no deseada en sujetos humanos. Para minimizar estos problemas, se pueden producir los derivados de anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos combinan una región variable de animal no humano con una región constante humana. Los anticuerpos quiméricos se pueden construir de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (véase Morrison *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851; Takeda *et al.* (1985) *Nature* 314: 452; Patente de Estados Unidos N°. 4.816.567 de Cabilly *et al.*; Patente de Estados Unidos N°. 4.816.397 de Boss *et al.*; Publicación de Patente Europea EP 171496; EP 0173494; Patente de Reino Unido GB 2177096B). Además, los anticuerpos se pueden además “humanizar” mediante cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica, (por ejemplo, Teng *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7308-7312; Kozbor *et al.* (1983) *Immunology Today* 4: 7279; Olsson *et al.* (1982) *Meth. Enzymol.* 92: 3-16; Solicitud de Patente Internacional N° WO 92/06193; documento EP 0239400). Los anticuerpos humanizados también se pueden obtener a partir de fuentes comerciales (por ejemplo, Scotgen Limited, Middlesex, Gran Bretaña). La inmunoterapia con un anticuerpo humanizado puede dar como resultado el incremento a largo plazo de la eficacia para el tratamiento de las situaciones de enfermedad crónica o situaciones que requieren tratamientos de anticuerpos repetidos.

En todavía otro planteamiento, un ligando aislado de un factor relacionado con B7 se puede usar para regular hacia abajo la actividad de las células de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T). Por ejemplo, una proteína de fusión soluble que comprende un ligando del factor relacionado con B7 se puede producir, aislar, y usar para producir una composición farmacéutica de acuerdo con los procedimientos descritos en detalle en el presente documento. Esta composición farmacéutica se puede después administrar a un sujeto para unirse a uno o más factor(es) relacionado(s) con B7 endógeno(s) y bloquear la activación de las células de respuestas inmunes o inflamatorias (por ejemplo, Células T) como se ha descrito anteriormente.

La regulación hacia arriba de una función del factor relacionado con B7 también puede ser útil en terapia. Debido a que las infecciones virales se eliminan principalmente por las células T citotóxicas, un incremento en la actividad citotóxica sería terapéuticamente útil en situaciones en las que una más rápida o concienzuda eliminación de un agente viral infeccioso sería beneficioso para un sujeto animal o animal. De manera notable, B7-1 actúa para incrementar la citotoxicidad de las células T mediante interacciones con su(s) ligando(s) afín(es). De este modo, las formas activas solubles de los polipéptidos relacionados con B7 se pueden administrar para el tratamiento de infecciones virales locales o sistémicas, tal como infecciones virales de inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH), papiloma (por ejemplo, VPH), herpes (por ejemplo, VSH), encefalitis, gripe (por ejemplo, virus de gripe humano A), y resfriado común (por ejemplo, rinovirus humano). Por ejemplo, formulaciones farmacéuticas los factores relacionados con B7 multivalentes activos se pueden administrar de manera tópica para tratar enfermedades cutáneas virales tales como lesiones por herpes o herpes zoster, o verrugas genitales. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de factores relacionados con B7 activos, multivalentes se pueden administrar de manera sistémica para tratar enfermedades virales sistémicas tales como SIDA, gripe, el enfriamiento común, o encefalitis.

Además, la modulación de la función del factor relacionado con B7 puede ser útil en la inducción de inmunidad de tumores. Por ejemplo, células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, o células de carcinoma) se pueden modificar por ingeniería genética para llevar un ácido nucleico que codifica al menos un fragmento de al menos un factor relacionado con B7, tales como BSL1 (SEQ ID NO: 2), BSL2 (SEQ ID NO: 7, 11, ó 13), o BSL3 (SEQ ID NO: 15), y después administrarse a un sujeto para atravesar la tolerancia específica de tumor en el sujeto. De manera notable, la expresión ectópica de B7-1 en las células tumorales de tipo murino negativas de B7 se ha mostrado que inducen la inmunidad específica mediada por las células T acompañado del rechazo tumoral y proyección prolongada a la exposición de tumores en ratones (L. Chen *et al.*, *supra*; S. Townsend *et al.*, *supra*; S. Baskar *et al.*, *supra*). Los tratamientos de terapia génica de células tumorales o cancerosas que utilizan los factores relacionados con B7 se pueden modelar sobre experimentos animales (véase K. Dunussi-Joannopoulos *et al.* (1997) *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 19: 356-340; K. Hiroishi *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6: 1988-1994; B.K. Martin *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:6663-6670; M. Kuiper *et al.* (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* 465: 381-390), o experimentos de los ensayos de fase I humanos (H.L. Kaufman *et al.* (2000) *Hum. Gene Ther.* 11: 1065-1082), que usa B7-1 o B7-2 para la terapia por transferencia génica. Se entenderá que tales procedimientos se pueden adaptar para uso con diversas células tumorales o cancerosas. De manera adicional, la inmunidad tumoral se puede lograr mediante la administración de una proteína de fusión relacionada con B7 que estimula directamente las células inmunes (véase por ejemplo, Solicitud de Patente Internacional N° WO 01/21796 de V. Ling *et al.*).

Farmacogenética: Los polipéptidos y polinucleótidos relacionados con B7 son también útiles en el análisis farmacogenético, es decir, el estudio de la relación entre un genotipo individual y la de la respuesta del individuo a una composición terapéutica o fármaco. Véase, por ejemplo, Eichelbaum, M. (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23 (10-11): 983-985, y Linder, M. W. (1997) *Clin. Chem.* 43 (2): 254-266. El genotipo del individuo puede determinar

la forma en la que actúa un agente terapéutico sobre el cuerpo o la forma en la que el cuerpo metaboliza el agente terapéutico. Además, la actividad de las enzimas que metabolizan el fármaco afecta tanto como a la intensidad como a la duración de la actividad terapéutica. Las diferencias en la actividad o metabolismo de agentes terapéuticos pueden conducir a una toxicidad grave de fallo terapéutico. De acuerdo con lo anterior, un médico o clínico puede considerar la aplicación de conocimiento obtenido en los estudios farmacocinéticos relevantes en la determinación de si se administra un polipéptido, polinucleótido, equivalente funcional, fragmento, o modulador, así como la confección de la dosificación y/o régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico con un polipéptido, polinucleótido, equivalente funcional, fragmento, o modulador.

En general, se pueden diferenciar dos tipos de condiciones farmacogenéticas. Las condiciones genéticas se pueden deber a un factor individual que altera la forma en la que el fármaco actúa sobre el cuerpo (acción alterada del fármaco), o un factor que altera la forma en la que el cuerpo metaboliza el fármaco (metabolismo alterado del fármaco). Estas condiciones se pueden producir o bien como defectos genéticos raros o como polimorfismos de origen natural. Por ejemplo, deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía común heredada que da como resultado hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (anti-malaria, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y consumo de habas.

El descubrimiento de los polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan fármacos (por ejemplo, enzimas N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y citocromo P450 CYP2D6 y CYP2C 19) ha proporcionado una explicación a las que algunos pacientes no obtienen los efectos esperados del fármaco o muestran una respuesta exagerada del fármaco y una toxicidad importante después de tomar la dosis estándar y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizante extensivo (EM) y metabolizante pobre (PM). La frecuencia de PM es diferente entre poblaciones diferentes. El gen que codifica CYP2D6 es altamente polimórfico y se han identificado varias mutaciones en PM, todas las cuales conducen a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizantes pobres completamente y frecuentemente experimentan respuesta exagerada al fármaco y efectos laterales cuando reciben dosis convencionales. Si un metabolito es el resto terapéutico activo, PM no muestra ninguna respuesta terapéutica. Esto se ha demostrado para el efecto analgésico de la codeína mediada por su metabolito de morfina formado de CYP2D6. En el otro extremo, los metabolizantes ultra rápidos no responden a las dosis convencionales. Estudios recientes han determinado que el metabolismo ultra rápido se puede atribuir a la amplificación del gen CYP2D6.

Por analogía, el polimorfismo o mutación genético puede conducir a variantes alélicas de BSL1, BSL2, y/o BSL3 en la población que tienen diferentes niveles de actividad. Los polipéptidos o polinucleótidos de BSL1, BSL2, y/o BSL3 por lo tanto permiten a un clínico determinar una predisposición genética que puede afectar a la modalidad de tratamiento. De este modo, en un tratamiento basado en BSL, el polimorfismo o mutación puede dar lugar a individuos que son más o menos sensibles a tratamiento. De acuerdo con lo anterior, la dosificación se modificaría necesariamente para maximizar el efecto terapéutico dentro de una población dada que contiene el polimorfismo. Como una alternativa a la identificación del genotipo, se pueden identificar polipéptidos o polinucleótidos polimórficos específicos.

Para identificar los genes que predicen la respuesta del fármaco, se pueden usar varios procedimientos farmacéuticos. Un planteamiento farmacogenético, "asociación amplia a genoma", depende principalmente del mapa de resolución de alta resolución del genoma humano. Este mapa de alta resolución muestra marcadores relacionados con el gen identificado anteriormente (por ejemplo, un papa marcador del gen "bi-alélico" que consta de 60.000-100.000 sitios polimórficos o variables en el genoma humano, cada uno de los cuales tiene dos variantes). Un mapa genético de alta resolución se puede comparar después con un mapa del genoma de cada uno de un número estadísticamente significativo de pacientes que toman parte en el ensayo de fármaco de Fase II/III para identificar marcadores asociados a una respuesta de fármaco observada particular o efecto secundario. Como alternativa, se puede generar un mapa de alta resolución a partir de una combinación a partir de una combinación de unos 10 millones de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP) conocidos en el genoma humano. Como se usa en el presente documento, un "SNP" es una alteración común que se produce en una sola base de nucleótido en un tramo de ADN. Por ejemplo, un SNP se puede producir por cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede estar implicado en un proceso patológico, sin embargo, la gran mayoría puede no estar asociado a enfermedad. Dado un mapa genético basado en la aparición de tales SNP, los individuos se pueden agrupar en categorías genéticas dependiendo de un patrón particular de los SNP en su genoma individual. De esta forma, los regímenes de tratamiento se pueden confeccionar para los grupos de individuos genéticamente similares, teniendo en cuenta los rasgos que pueden ser comunes entre tales individuos genéticamente similares. Véase, por ejemplo, D.R. Pfost *et al.* (2000) Trends Biotechnol. 18 (8): 334-8.

Como otro ejemplo, se puede usar el "planteamiento del gen apropiado". De acuerdo con este procedimiento, si se conoce un gen que codifica una diana de fármaco, todas las variantes comunes de ese gen se pueden identificar de una manera razonablemente fácil en la población y se puede determinar si la tenencia de una versión del gen frente a otra está asociada a una respuesta del fármaco particular.

Como todavía otro ejemplo, se puede usar un "planteamiento de perfil de expresión génica". Este procedimiento implica el ensayo de la expresión génica de un animal tratado con un fármaco (por ejemplo, un polipéptido, polinucleótido, equivalente funcional, o modulador relacionado con B7.) para determinar si las rutas del gen relacionadas con la toxicidad se han puesto en marcha.

La información obtenida de uno de los planteamientos farmacogenéticos descritos en el presente documento se pueden usar para determinar la dosificación apropiada y regímenes de tratamiento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de un fármaco, puede evitar las reacciones adversas de fallo terapéutico y de esta manera potenciar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con un polipéptido, polinucleótido, equivalente funcional, o modulador.

Los polipéptidos o polinucleótidos relacionados con B7 son también útiles para controlar los efectos terapéuticos durante los ensayos clínicos y otro tratamiento. De este modo, la efectividad terapéutica de un agente que se diseña para incrementar o disminuir la expresión génica, niveles de polipéptidos, o actividad se puede controlar durante el curso del tratamiento usando los polipéptidos o polinucleótidos relacionados con B7. Por ejemplo, el control se puede realizar mediante: (i) obtener una muestra de preadministración a partir de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión o actividad del polipéptido en la muestra de preadministración; (iii) obtener uno o más muestras de administración a partir del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión o actividad del polipéptido en las muestras después de la administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad de los polipéptidos en la administración previa con el polipéptido en la muestra o muestras después de la administración; y (vi) incrementar o disminuir la administración del agente al sujeto de acuerdo con lo anterior.

Modelos animales

Los polinucleótidos relacionados con B7 se pueden usar para generar líneas celulares de animales no humanos o de seres humanos alteradas. Se puede usar cualquier animal no humano; sin embargo los animales típicos son roedores, tales como ratones, ratas, o cobayas. Los animales o líneas celulares modificados por ingeniería genética pueden llevar un gen que se ha alterado para que contenga las supresiones, sustituciones, inserciones, o modificaciones de la secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, secuencia de exones). Tales alteraciones pueden hacer el gen monofuncional, (es decir, una mutación nula) produciendo un animal o línea celular “de resistencia”. Además, los animales modificados por ingeniería genética, pueden llevar uno o más genes exógenos o de origen no natural, por ejemplo, “transgenes” u “ortólogos”, que se derivan de diferentes organismos (por ejemplo, seres humanos), o producidos mediante procedimientos sintéticos o recombinantes. Los animales o líneas celulares alterados genéticamente se pueden usar para estudiar la función de BSL1, BSL2, o BSL3, regulación, y para desarrollar tratamientos para enfermedades relacionadas con BSL1-, BSL2-, o BSL3-. En particular, animales y líneas celulares de resistencia y se pueden usar para establecer modelos animales y modelos *in vitro* para análisis de enfermedades relacionadas con BSL1-, BSL2-, o BSL3-. Además, los animales transgénicos que expresan BSL1, BSL2, o BSL3 se pueden usar en esfuerzos de descubrimiento de fármacos.

Un “animal transgénico” es cualquier animal que contiene una o más células que llevan la información genética alterada o recibida, directa o indirectamente, mediante la manipulación genética a un nivel subcelular, tal como mediante recombinación dirigida o microinyección o infección con virus recombinantes. El término “animal transgénico” no se pretende que abarque la mejora genética por cruce clásica o fertilización *in vitro*, pero en su lugar significa que que abarca animales en los que una o más células están alteradas por, o reciben, una molécula de ADN recombinante. Esta molécula de ADN recombinante se puede dirigir de manera específica a un locus genético, se puede integrar al azar dentro de un cromosoma, o puede ser ADN de replicación extracromosómica.

Como se usa en el presente documento, el término “ortólogo” significa un gen o polipéptido obtenido a partir de una especie que tiene homología con un gen o polipéptido análogo de una especie diferente. Por ejemplo, los polipéptidos BSL3 (SEQ ID NO: 15) humano y AF142780 de ratón son ortólogos.

Los animales transgénicos se pueden seleccionar después de tratamiento de líneas germinales o cigotos. Por ejemplo, la expresión de un gen exógeno de BSL1, BSL2, o BSL3 o una variante se puede lograr mediante la unión de manera operativa del gen a un promotor y opcionalmente un potenciador, y después la microinyección de la construcción en un cigoto (véase, por ejemplo, Hogan *et al.* (1994) *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Tales tratamientos incluyen la inserción del gen exógeno y los genes homólogos rotos. Como alternativa, el (los) gen(es) se puede(n) romper mediante la inserción o supersión de otras alteraciones genéticas usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo Capecchi, (1989) *Science*, 244: 1288; Valancuis *et al.* (1991) *Mol. Cell Biol.*, 11: 1402; Hasty *et al.* (1991) *Nature*, 350: 243; Shinkai *et al.* (1992) *Cell*, 68: 855; Mombaerts *et al.* (1992) *Cell*, 68: 869; Philpott *et al.* (1992) *Science*, 256: 1448; Snouwaert *et al.* (1992) *Science*, 257: 1083; Donehower *et al.* (1992) *Nature*, 356: 215).

En un aspecto de la invención, los ratones de resistencia a BSL1, BSL2, o BSL3 se pueden producir de acuerdo con los procedimientos bien conocidos (véase, por ejemplo, M.R. Capecchi, (1989) *Science*, 244: 1288-1292; P. Li *et al.* (1995) *Cell* 80: 401-411; L.A. Galli-Taliadoros *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 181 (1): 1-15; C.H. Westphal *et al.* (1997) *Curr. Biol.* 7 (7): 530-3; S.S. Cheah *et al.* (2000) *Methods Mol. Biol.* 136: 455-63). Los clones humanos BSL1, BSL2, y BSL3 se pueden usar para aislar homólogos murinos. Después un homólogo murino se puede usar para preparar una construcción de dirección de BSL1, BSL2, o BSL3 de tipo murino que pueden romper BSL1, BSL2, o BSL3 en el ratón mediante recombinación en el locus cromosómico correspondiente. La construcción de dirección puede comprender una secuencia de BSL1, BSL2, o BSL3 de tipo murino rota o suprimida que se inserta en lugar del fragmento de funcionamiento del gen de ratón nativo. Por ejemplo, la construcción puede contener una inserción en la región codificadora de la proteína BSL1, BSL2, o BSL3 de tipo murino.

Preferiblemente, la construcción de dirección contiene marcadores para tanto la selección positiva como negativa. El marcador de selección positiva permite la eliminación selectiva de células que carecen del marcador, mientras que el marcador de selección negativa permite la eliminación de las células que llevan el marcador. En particular, el marcador que se puede seleccionar positivo puede ser un gen de resistencia a antibiótico, tal como el gen de resistencia a neomicina, que se puede colocar dentro de la región de codificación de BSL1, BSL2, o BSL3 de tipo murino para hacerlo no funcional, mientras que al mismo tiempo hará la construcción seleccionable. El gen de la timidina quinasa del virus herpes simples (HSV tk) es un ejemplo de un marcador seleccionable negativo que se puede usar como un segundo marcador para eliminar las células que lo llevan. Las células con el gen HSV tk se destruyen de manera selectiva en la presencia de gangcyclovir. Como un ejemplo, un marcador de selección positiva se puede posicionar sobre una construcción de dirección dentro de la región de la construcción que se integra en el de BSL1, BSL2, o BSL3. El marcador de selección negativa se puede posicionar sobre la construcción de dirección fuera de la región que se integra en el locus de BSL1, BSL2, o BSL3. De este modo, si la construcción entera está presente en la célula, tanto los marcadores de selección positiva como negativa están presentes. Si la construcción tiene integrada en el genoma, el marcador de selección positiva, solamente se perderá el marcador de selección negativa.

La construcción de dirección se puede emplear. Por ejemplo, en las células del tronco embrionario (ES). Las células ES se pueden obtener a partir de la implantación previa de los embriones cultivados *in vitro* (M.J. Evans *et al.* (1981) *Nature* 292: 154-156; M.O. Bradley *et al.* (1984) *Nature* 309: 255-258; Gossler *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9065-9069; Robertson *et al.* (1986) *Nature* 322: 445-448; S. A. Wood *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4582-4584). Las construcciones de dirección se pueden introducir de manera eficaz en las células del ES mediante técnicas convencionales tales como la transfección de ADN o mediante la transducción mediada por retrovirus. Después de esto, las células de ES transformadas se pueden combinar con los blastocitos de un animal humano. Las células de ES introducidas colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante (R. Jaenisch, (1988) *Science* 240: 1468-1474). El uso de las células de ES dirigidas por el gen en la generación de ratones transgénicos dirigidas por el gen se ha descrito previamente (Thomas *et al.* (1987) *Cell* 51: 503-512) y se revisa en otra parte (Frohman *et al.* (1989) *Cell* 56: 145-147; Capecchi, 1989, *Trends in Genet.* 5: 70-76; Baribault *et al.* (1989) *Mol. Biol. Med.* 6: 481-492; Wagner, (1990) *EMBO J.* 9: 3025-3032; Bradley *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10: 534-539).

Se pueden usar varios procedimientos para seleccionar células de ES de tipo murino recombinados de manera homóloga. Un procedimiento emplea la PCR para seleccionar combinaciones de células transformantes para la inserción homóloga, seguido de la selección de los clones individuales (Kim *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 8887-8903; Kim *et al.* (1991) *Gene* 103: 227-233). Otro procedimiento emplea un gen marcador se construye de manera que solamente será activo si se produce la inserción homóloga, permitiendo que estos recombinantes se seleccionen de manera directa (Sedivy *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 227-231). Por ejemplo, el procedimiento de selección positiva-negativa (PNS) se puede usar como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Mansour *et al.* (1988) *Nature* 336: 348-352; Capecchi, 1989, *Science* 244: 1288-1292; Capecchi, (1989) *Trends in Genet.* 5: 70-76). En particular, el procedimiento PNS es útil para los genes de dirección que se expresan a bajos niveles.

La ausencia de BSL1, BSL2, o BSL3 funcionales en los ratones de resistencia se pueden confirmar, por ejemplo, mediante análisis de ARN, análisis de expresión de proteína, y estudios funcionales. Para el análisis de ARN, se preparan muestras de ARN a partir de diferentes órganos de los ratones de resistencia y el transcrito de BSL1, BSL2, o BSL3 se detecta en transferencias de Northern usando sondas de oligonucleótidos específicas para el transcrito. Para la detección de la expresión de proteínas, se usan los anticuerpos que son específicos para el polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3, por ejemplo, en análisis de citometría de flujo, tinción inmunohistoquímica, y ensayos de actividad. Como alternativa, los ensayos funcionales se realizan usando preparaciones de diferentes tipos recogidos de los ratones de resistencia.

Se pueden usar varios planteamientos para producir ratones transgénicos. En un planteamiento, un vector de dirección se integra en la célula de ES mediante recombinación homóloga, un episodio de recombinación intracromosómica se usa para eliminar los marcadores que se pueden seleccionar, y solamente el transgen se queda detrás (A.L. Joyner *et al.* (1989) *Nature* 338 (6211): 153-6; P. Hasty *et al.* (1991) *Nature* 350 (6315): 243-6; V. Valancius y O. Smithies, (1991) *Mol. Cell Biol.* 11 (3): 1402-8; S. Fiering *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (18): 8469-73). En un planteamiento alternativo, se crean dos o más cepa; una cepa contiene el gen inactivado mediante recombinación homóloga, mientras que una o más cepas, contienen transgenes. La cepa de resistencia se cruza con la cepa transgénica para producir una nueva línea de animales en la que el alelo de tipo salvaje original se ha reemplazado (aunque no en el mismo sitio) con un transgen. De manera notable, los animales de resistencia y transgénicos se pueden producir mediante instalaciones comerciales (por ejemplo, El Instituto de Investigación Lerner, Cleveland, OH; B&K Universal, Inc., Fremont, CA; DNX Transgenic Sciences, Cranbury, NJ; Incyte Genomics, Inc., St. Louis, MO).

Los animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica BSL1, BSL2, o BSL3 humanos, se pueden usar en modelos *in vivo* para estudiar los efectos de la expresión alterada de BSL1, BSL2, o BSL3. Tales animales también se pueden usar en la evaluación de fármacos y descubrir esfuerzos para encontrar los compuestos que inhiben o modulan la actividad de BSL1, BSL2, o BSL3, tal como por ejemplo los compuestos para tratar trastornos, enfermedades o afecciones del sistema inmune. Los expertos en la técnica pueden usar técnicas convencionales para producir animales transgénicos que producen polipéptidos BSL1, BSL2, o BSL3 humanos, y usar los animales en la evolución de fármacos y descubrir proyectos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.873.191 de Wagner; Patente de Estados Unidos N° 4.736.866 de Leder).

ES 2 300 340 T3

El animal transgénico descrito en el presente documento puede comprender un vector de expresión recombinante en el que la secuencia de nucleótidos que codifica BSL1, BSL2, o BSL3 humanos está unido de manera operativa a un promotor específico de tejidos por el que la secuencia de codificación se expresa solamente en ese tejido específico. Por ejemplo, el promotor específico de tejidos puede ser un promotor específico de la célula de mamíferos y la proteína recombinante así expresada se recupera de la leche del animal.

Una “eliminación” de BSL1, BSL2, o BSL3 se puede producir mediante la administración al animal anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que reconocen específicamente un polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3. Los anticuerpos pueden actuar para romper la función del polipéptido de BSL1, BSL2, o BSL3 de tipo murino, y por lo tanto producir un fenotipo nulo. En un ejemplo específico, un polipéptido o péptido BSL1, BSL2, o BSL3 de tipo murino se puede usar para generar anticuerpos. Estos anticuerpos se puede después proporcionar a un ratón para eliminar la función de de la proteína de ratón correspondiente.

Además, los organismos no mamíferos se pueden usar para estudiar BSL1, BSL2, o BSL3, y sus enfermedades relacionadas. Por ejemplo, se pueden usar organismos modelo tales como *C. elegans*, *D. melanogaster*, y *S. cerevisiae*. Los homólogos de BSL1, BSL2, o BSL3 se pueden identificar en estos organismos modelo, y mutarse o suprimirse para producir una cepa deficiente en BSL1-, BSL2-, o BSL3-. BSL1, BSL2, o BSL3 humano se puede después ensayar para evaluar la capacidad de “complementar” la cepa deficiente. Las cepas deficientes en BSL1-, BSL2-, o BSL3- también se pueden usar para la selección del fármaco. El estudio de los homólogos de BSL1, BSL2, o BSL3 pueden facilitar el entendimiento de la función biológica que corresponde al gen humano, y ayudar en la identificación de las proteínas de unión (por ejemplo, agonistas y antagonistas).

Ejemplos

Los ejemplos como se establece en el presente documento significa que ejemplifican los diversos aspectos de la presente invención y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Identificación de BSL2

Investigaciones de bases de datos: BSL2 se identificó mediante análisis BLAST y FASTA de la bases de datos de la secuencia Incyte Genomics (Incyte Genomics) utilizando las secuencias de aminoácidos B7-1 o B7-2 como secuencias de duda. Para el análisis de BLAST, se usó la matriz de puntuación BLOSSUM-62 (S. Henikoff *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919), y se establecieron los parámetros restantes para las designaciones por defecto. Para el análisis de FASTA, se establecieron todos los parámetros para las designaciones por defecto (W.R. Pearson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448). Las investigaciones de las bases de datos de las secuencias identificaron dos “moldes” de Incyte Genomics: 252899.6 y la variante de ajuste potencial 252899.8 (Incyte Genomics) los moldes son secuencias de consenso de EST que se consideran que representan los transcritos ARNm).

Análisis de secuencias del clon BSL2: el molde de Incyte Genomics 252899.8 se usó para identificar el clon de Incyte Genomics 4616811. El clon 4616811 de Incyte Genomics pertenece la genoteca de Incyte Genomics N° de ID BRAYDIT01, que se construyó originalmente usando poly(A)+ ARN del tejido de hipotálamo enfermo. El clon 4616811 de Incyte Genomics se obtuvo de Incyte Genomics y se usó para el análisis de secuencia (secuenciador de ciclos ABI, PE Biosystems) con los cebadores mostrados en la Tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Clon	Cebador	Secuencia	SEQ ID NO
4616811	392.423	GGTGCACAGCTTTGCTGA	34
4616811	392.415	GCTGTGCACCAGCTGTTT	35
4616811	392.439	GCTATGAAAGGTCCAGAG	36
4616811	392.499	GAATCTGGTGGTGTCCAA	37
4616811	392.1716	CTCTGTCACCATCACAGG	38
4616811	392.852	CTCTGTCACCATCACACC	39
4616811	392.523	GAAATCCCGGATGCTCAC	40
4616811	392.766A	ACCACACGTGTTCCAGCA	41
4616811	392.766B	TGCTGGAACACGTGTGGT	42
4616811	392.383	GGCCCTCAGCAAAGCTGT	43
4616811	392.1448	AGCTGTAGGTGCCATTCCG	44
4616811	392.892	AGGGACCTGGACCTCCAC	45
4616811	392.1528	TGGGGGGAATGTCATAGG	46
4616811	392.1215	AGCAGGCAGGATGACTTA	47
4616811	392.1242	AACAGACCACCCACAACC	48
6487516	314.570	GCAAATGGCACCTACAGC	49
6487516	314.634	TCTGGGGTGTGATGGTGA	50
6487516	314.450	ATGAAAGGTCCAGAGGGC	51
6487516	314.584	ACCCATAATTCTTACCCA	52
6487516	314.824	CACAGCTCTGTTTGATCT	53
6487516	314.644	CTCCTACCCTCTGGCTGC	54

De manera notable, la secuencia de aminoácidos predicha del clon 4616811 de Incyte Genomics contenía 2 conjuntos de plegamientos V/C (dominio variable/constante), mientras que las secuencias de aminoácidos típicas relacionadas con B7 contienen solamente 1 conjunto de plegamientos de V/C. El análisis de Seqweb Gap (Genetics Computer Group) indicaba que la secuencia de BSL2-4616811 compartía menos de 50% de identidad de secuencias con las secuencias de nucleótidos de B7-1, B7-2, BSL1/B7-H1, mientras que la secuencia de aminoácidos de BSL2-4616811 compartía menos de 35% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos B7-1, B7-2, y BSL1/B7-H1. Una secuencia similar a BSL2-4616811 se ha identificado como una proteasa precursora de amiloides en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 00/68266 de G.W. Becker *et al.*

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos predichas del clon 4616811 de Incyte Genomics (BSL2-4616811) se muestran en las figuras 3A y 3B. El plásmido que lleva el ADN que codifica BSL2-4616811 (pINCY: BSL2-4616811) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), bajo el N° de designación de la ATCC PTA-1993, el 6 de junio de 2000.

Clonación de longitud completa: Para verificar la secuencia del clon 4616811 de Incyte Genomics, se diseñaron cebadores de PCR para amplificar la secuencia de nucleótidos del codón de partida de traducción predicha al codón de parada de traducción predicho del clon: cebador directo BSL2-7 (5'-ATGCTGCGTCGGCG-3') (SEQ ID NO: 55); cebador inverso BSL2-8 (5'-TCAGGCTATTTCTTGTCATCATC-3') (SEQ ID NO: 56).

Una genoteca de HMVEC se construyó utilizando el kit de amplificación SMARTTM RACE ADNc (CLONTECH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando poly(A)+ ARN obtenida a partir de las células endoteliales microvasculares humanas tratadas con el TNF-alfa durante 1 hr como el molde de reacción RACE. La mezcla de PCR

ES 2 300 340 T3

incluía 1 μ l de genoteca de HMVEC dispuesta para la PCR, 5 μ l de tampón de PCR (GibcoBRL), 1,5 μ l de 50 mM $MgCl_2$, 1 μ l 10 mM dNTPs (Boehringer Mannheim Biochemicals/Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 25 pMol de cebador de BSL2-7, 25 pMol de cebador de BSL2-8, y 1 μ l de mezcla de Enzima CLONTECH Advantage en un volumen total de 50 μ l. La PCR se realizó en un cicladador PE Biosystems Thermal modelo 9700. la mezcla de PCR se incubó a 94°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos de incubación a 94°C durante 30 seg, 60°C durante 30 seg, y 72°C durante 45 seg, seguido de la incubación a 72°C durante 10 min.

Una microtitulación de la mezcla de PCR se ligó en pCR2.1 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó la mitad de la ligación para transferir células de *E. coli* Max-Efficiency DH5 alfa *E. coli* transfectadas (GibcoBRL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se sembraron en placas de agar con 100 μ g/ml de ampicilina y 30 μ g/ml de X-gal t se incubaron a 37°C durante toda una noche. Se aislaron las colonias de color blanco y se desarrollaron durante toda una noche a 37°C en 5 ml de caldo de LB que contiene 100 μ g/ml de ampicilina.

El ADN de plásmido se aisló a partir del cultivo bacteriano usando el kit Spin Miniprep (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se digirió con EcoRI para liberar la inserción clonada, y la mezcla de digestión se analizó mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de inserción mayores que 700 pares de bases se secuenciaron usando los cebadores de secuenciación M13 (5'-GTTTTCCTCCAGTCAACGAC-3') (SEQ ID NO: 57) específica del vector y M13 inverso (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (SEQ ID NO: 58) (secuenciador de ciclo ABI, PE Applied Biosystems).

El análisis de secuencias indicó que dos variantes de ajuste de BSL2 se habían clonado: BSL2-L165-21 y BSL2-L165-35b. Las variantes de ajuste BSL2-L165-21 y BSL2-L165-35b codificaban las secuencias de aminoácidos cada una de ellas contenía un plegamiento de V/C y eran ~ 95% idénticas a otra. El análisis de Seqweb Gap (Genetics Computer Group) también indicó que las secuencias de nucleótidos de BSL2-L 165-21 y BSL2-L 165-35b compartían menos un 50% de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos de B7-1, B7-2. y BSL1/B7-H1, mientras que las secuencias de aminoácidos de BSL2-L165-21 y BSL2-L165-35b compartían menos del 35% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de B7-1, B7-2. y BSL1/B7-H1.

El análisis de secuencias además indicó que la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de BSL2-L165-21 compartían menos de 99% identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de PRO352, respectivamente, reseñada en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 99/46281 de K.P. Baker *et al.* Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de BSL2-L165-35b compartía menos de 99,5% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de PRO352, respectivamente.

Las alineaciones de las secuencia de aminoácidos que usan el programa GCG Gap (GCG, Madison, WI) indicaban que el tramo más largo de los restos de aminoácidos idénticos compartido por BSL2-L165-21 y PRO352 era de 88 aminoácidos contiguos de longitud. El tramo más largo de restos de aminoácidos idénticos compartido por BSL2-L165-35b y PRO352 era de 168 aminoácidos contiguos de longitud. El tramo más largo de aminoácidos idénticos compartido por BSL2-4616811 y PRO352 era de 206 contiguos de longitud.

Las alineaciones de secuencias de nucleótidos indicaban que el tramo más largo de las bases idénticas compartido por s BSL2-L165-21 y PRO352 era de 254 nucleótidos contiguos de longitud. El tramo más larga de bases idénticas compartidas por BSL2-L165-35b y PRO352 era de 305 nucleótidos contiguos de longitud. El tramo más largo de bases idénticas compartidas BSL2-4616811 y PRO352 era de 302 nucleótidos contiguos de longitud. De manera notable, BSL2-L165-35b también se había identificado como B7-H3, una molécula coestimuladora para la activación de células T (A.I. Chapoval *et al.* (2001) Nature Immunology 2: 269-274).

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos predichas de las variantes de ajuste de BSL2-L165-21 se muestran en las Figuras 3C y 3D, mientras que las secuencias de nucleótidos y aminoácidos predichas de BSL2-L165-35b se muestran en las Figuras 3E y 3F. El plásmido que lleva ADN que codifica BSL2-L165-21 (pCR2.1: BSL2-L165-21) se depositó con la Colección De Cultivo de Tipo Americana (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), bajo el N° de designación de la ATCC PTA-1987, el 6 de junio de 2000. Además, El plásmido que lleva ADN que codifica BSL2-L165-35b (pCR2.1: BSL2-L165-35b) se depositó con la colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), bajo el N° de designación de la ATCC PTA-1988, el 6 de junio de 2000.

Ejemplo 2

60 Caracterización de BSL2

Análisis de expresión de BSL2: los patrones de expresión de BSL2 se determinaron mediante análisis de transferencia de Northern de diversos tipos de tejidos y células, usando la sonda derivada de BSL2-4616811 mostrada en la Figura 6B, y el procedimiento descrito como sigue.

Los patrones de expresión de BSL2 se determinaron mediante análisis de transferencia de Northern de diversos tipos, incluyendo Células T de sangre periférica en reposo, las Células T de sangre periférica estimuladas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, Células T de sangre periférica estimuladas con forbol 12 miristato 13 acetatoe (PMA),

Células T de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina (PHA), monocitos de THP1 en reposo, THP1 estimulados con lipopolisacárido (LPS), monocitos de sangre periférica en reposo, monocitos de sangre periférica en reposo estimulados con PHA, monocitos de sangre periférica en reposo estimulados con GM-CSF y células IL-4, RAJI B, RAMOS B, células endoteliales microvasculares humanas en reposo (HMVEC), HMVEC estimuladas con TNF α , y células epiteliales de pulmón humanas H292 desprovistas de suero.

Condiciones de cultivo de células: Células T de sangre periférica se desarrollaron en RPMI 1640 (Hyclone) con suero humano al 10% a 37°C y CO₂ al 5% durante 48 hr. Células T de sangre periférica estimulada con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 se desarrollaron en RPMI 1640 con suero humano al 10% a 37°C y CO₂ al 5% durante 24-72 hr en la presencia de 1 μ g/ml de anticuerpos anti-CD3 monoclonales (P.S. Linsley *et al.* (1993) Ann. Rev. Immunol. 11: 191-212) y 1 μ g/ml de anticuerpos anti-CD28 monoclonales (Linsley *et al.*, anteriormente). Células T de sangre periférica estimuladas con PMA y ionomicina se desarrollaron en RPMI 1640 (Hyclone) con suero humano al 10% a 37°C y CO₂ al 5% durante 48 hr en la presencia de 30 ng/ml de PMA con 1 μ M ionomicina. Células T de sangre periférica estimuladas con PHA se desarrollaron en RPMI 1640 (Hyclone) con suero humano al 10% a 37°C y CO₂ al 5% durante 48 hr en la presencia de 3 μ g/ml de PHA. Las células THP1 obtenidas de una línea celular monocítica humana inmortal se desarrollaron en RPMI 1640 (Hyclone) con suero fetal bovino al 10% a 37°C y CO₂ al 5% con o sin 100 ng/ml LPS durante 2 hr. Se desarrollaron monocitos de sangre periférica en RPMI 1640 (Hyclone) con suero fetal bovino al 25% en placas de teflón a 37°C y 5% de CO₂ con o sin 1 μ g/ml de PHA o 15 ng/ml GM-CSF con 75 ng/ml IL-4 durante 7 días. Células RAJI y RAMOS obtenidas a partir de líneas celulares B humanas inmortales se desarrollaron en RPMI 1640 (Hyclone) con suero fetal bovino al 10% a 37°C y CO₂ al 5%. HMVEC se desarrollaron en DMEM con suero fetal bovino al 10% a 37°C y CO₂ al 5% con o sin 10 ng/ml de TNF- α durante 1-24 hr. Las células H292 obtenidas a partir de una línea celular epitelial de pulmón humano se desarrollaron en RPMI 1640 (Hyclone) con suero fetal bovino al 10% a 37°C y CO₂ al 5%, y después desarrollarlas en medio sin suero durante 16 horas antes de la recogida.

Análisis de transferencia de Northern: para el análisis de transferencia de Northern, 0,5 μ g de poly(A)+ ARN total obtenido de cada tipo de células se separó sobre un gel de agarosa al 1,2% que contenía formaldehído al 3%, y se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham) durante toda una noche usando 20 X SSC como tampón de transferencia. Después la membrana se autoreticuló, se lavó con 4 X SSPE, y se dejó secar al aire. Después la membrana se hibridó previamente a 65°C en solución que expresa Hyb (CLONTECH) durante 1 hora, y después se hibridó con una sonda de ADNc BSL1 cebada al azar marcada radiactivamente con [³²P]dCTP (NEN, Boston, MA). La sonda se obtuvo a partir de un fragmento de 666 pares de bases BSL1 HindIII/PstI (Figura 6A), que se purificó usando la columna de purificación NucTrap (Stratagene), y se marcó radiactivamente para tener una actividad específica de 2,0 x 10⁶ cpm/ml. Después de la hibridación, la membrana se lavó en 2,0 X SSC con 0,05% SDS a 65°C, y se expuso a una película durante 72 horas a -70°C.

Se detectó un transcrito BSL2 ARNm 3,6 kb en varios tipos de células. En particular, se detectaron altos niveles de BSL2 ARNm en todas las HMVEC estimuladas con TNF- α . Se detectaron niveles moderados de BSL2 ARNm en las células THP1 en reposo, y las células THP1 activadas con LPS (Figura 7D). Por el contrario, se detectaron bajos niveles de BSL2 ARNm en los monocitos de sangre periférica estimulados con PHA o GM-CSF/IL-4, y BSL2 ARNm no se detectó en las células T en reposo o estimuladas de sangre periférica, o en las células RAJI en reposo, células RAMOS en reposo, o células H292 desprovistas de suero (Figura 7D).

Ensayo PCR para determinar la abundancia relativa de BSL2-4616811 y BSL2-L165-35b: para determinar si BSL2-4616811 o BSL2-L165-35b era la especie predominante de BSL2, y si la predominancia se correspondía con el tipo de célula y/o tipo de estímulo, se usó el siguiente planteamiento experimental. El análisis de la secuencia genómica de BSL2 indicó que la secuencia incluye varios exones separados por intrones. Se presumía que un transcrito primario se produjo a partir de esta secuencia, y el transcrito primario se empalmó para producir ARN maduro de BSL2-4616811. El análisis de la secuencia de BSL2-4616811 mostró que codificaba lo siguiente: un 5' UTR, un ATG de inicio, una secuencia de péptido señal, un plegamiento de Ig variable (v1), un plegamiento constante de Ig (c1), un plegamiento Ig V (v2), un plegamiento de Ig C (c2), una bisagra corta un dominio transmembrana supuesto, una cola citoplásmica corta, un codón de parada, y una 3' UTR.

La secuencia codificante de BSL2-4616811 parecía única en el genoma humano, como la secuencia v1 y c1 (v1c1) era aproximadamente 95% idéntica a la secuencia v2 y c2 (v2c2) en el nivel de aminoácidos. De manera importante, todos los restos importantes de manera estructural se conservaron en las secuencias de aminoácidos v1 c1 y v2c2, y la mayoría de los cambios de v1c1 a v2c2 eran cambios conservadores. La comparación de las secuencias de BSL2-L165-21 y BSL2-L165-35b (que contenía solamente plegamientos V y C individuales) con la secuencia de BSL2-4616811 indicó que en cada caso, se producía un episodio de ajuste que daba como resultado en un desplazamiento desde v1 al sitio exactamente homólogo en v2. Sin embargo, BSL2-L165-21 se desplazaba desde v1 a v2 en un sitio diferente de BSL2-L165-35b.

A pesar del 96% de identidad entre v1c1 y v2c2 a nivel de nucleótidos, la comparación de secuencias entre las dos regiones que usan GCG Gap reveló una corta región de homología relativamente baja. Un cebador directo denominado BSL2-9 se diseñó para aprovecharse de esta corta región de baja homología. BSL2-9 se diseñó para unirse de manera específica a v1 (La Figura 8E demuestra la especificidad del cebador BSL2-9). Un cebador inverso, BSL2-11 se diseñó para hibridarse a la secuencia bisagra.

ES 2 300 340 T3

De manera notable, el transcrito BSL2-4616811 contenía tanto el sitio de unión BSL2-9 v1 -en v1 como el sitio homólogo en v2. El transcrito BSL2-L165-35b contenía solamente el sitio de unión de BSL2-9 v1. El transcrito BSL2-L165-21 contenía solamente el sitio v2. De acuerdo con lo anterior, PCR se realizó con los cebadores BSL2-9 y BSL2-11 se esperó que producía: 1) un producto de la PCR de aproximadamente 1150 pares de bases, que representa BSL2-4616811; o 2) un producto de PCR de aproximadamente 550 pares de bases, que representa BSL2-L165-35b.

La PCR se llevó a cabo inicialmente con el plásmido BSL2-4616811 para confirmar la especificidad del cebador de BSL2-9. La PCR se realizó usando 2 μ l 10 ng/ μ l de ADN del plásmido BSL2-4616811, 5 μ l de tampón del PCR (GibcoBRL), 1,5 μ l de 25 mM de $MgCl_2$ (GibcoBRL), 1 μ l de 10 mM dNTPs (GibcoBRL), 2,5 μ l de 10 pMol/ μ l de cebador de BSL2-9 (5' TGGTGCACAGCTTTGCT 3') (SEQ ID NO: 59), 2,5 μ l de 10 pMol/ μ l de cebador BSL2-11 (5' TCTGGGGGGAATGTCAT 3') (SEQ ID NO: 60), 0,5 μ l de 5U/ μ l de platino Taq ADN polimerasa de GibcoBRL (Cat. N° 10966-018), y 35 μ l dH_2O . La PCR se realizó sobre un PE Biosystems 9700 que usa las siguientes condiciones de ciclación: 94°C durante 30 seg; seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 seg, 61°C durante 30 seg, 72°C durante 60 seg; seguido de 72°C durante 10 min. Después de esto, 40 μ l de la reacción de la PCR se llevó a cabo sobre un gel de agarosa al 1,2% a continuación la escala de ADN Lambda BstEII (Nueva Inglaterra Biolabs Beverly, MA; N° de Cat. 301-4S). La banda de 1150 pares de bases era predominante, indicando que el cebador de la PCR BSL2-9 era específico para la secuencia de BSL2-4616811 (Figura 8 E).

Líneas celulares de tipo Raji, Ramos, PM-LCL, PL-LCL, y CE-LCL B; líneas celulares de tipo monocítico HL-60 y Thp1; y líneas celulares de tipo CEM y Hut78 T se desarrollaron en RPMI 1640 con FBS al 10% y 1% de GibcoBRL penicilina/estreptomina hasta una concentración de 5×10^5 células/ml. Los cultivos se dividieron y una mitad los cultivos de tipo B y de tipo T se estimularon con 30 ng/ml PMA y 1 μ M de ionomicina durante 24 horas. Líneas celulares monocíticas se estimularon con 1 μ g/ml de LPS durante 24 hr. Se desarrollaron HUVEC de subcultivo temprano hasta 90% de confluencia, y una mitad del cultivo se estimuló con 10 ng/ml de TNF α , y se recogieron a las 6 o 24 horas. HUVEC no estimuladas se recogieron a las 24 horas.

Células T de sangre periférica de dos donantes se purificaron como sigue:

Preparación de Células T periféricas

Se obtuvieron células T periféricas humanas a partir de células sanguíneas mediante decantación. El tampón de decantación contenía 1 litro de RPMI (GibcoBRL/Life Technologies Inc., Rockville, MD; n° de Cat. 11875-085) con EDTA 2,5 mM y 10 μ g/ml de polimixina B. El tampón se preparó 1 día antes del procedimiento de decantación, y se almacenó a temperatura ambiente. Para el procedimiento de decantación, se obtuvieron y se prepararon 225 ml de sangre entera/donante en EDTA. Se añadieron veinte mililitros de tampón de decantación a doce tubos de centrifuga de 50 ml, y los 225 ml de sangre se dividieron de manera igual entre los tubos. Doce mililitros de solución de ficoll (medio de separación de linfocitos) se usó para reforzar la mezcla en cada tubo (AccuPrep Lymphocytes, Accurate Scientific Co.; n° de Cat. 1053980). Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 25 min (minutos).

Glóbulos rojos de oveja se prepararon mediante el siguiente procedimiento. Doce mililitros de Sheep Blood Alsever's (SRBC; Colorado Serum Co., Denver, CO; n° de Cat. CS1112) se volvieron a suspender, y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. El revestimiento superior del sedimento de SRBC se retiró, y se lavó el sedimento 2 veces con tampón de decantación. Después de cada lavado, se centrifugó el sedimento a 2200 rpm durante 8 min. Después del segundo lavado el sedimento se volvió a suspender en 5 ml de tampón de decantación y se refrigeró.

Después de la centrifugación, el sobrenadante de los tubos de refuerzo de ficoll se aspiraron para dejar detrás aproximadamente 5 ml de la fase de interfase. La capa de interfase se separó cuidadosamente a un tubo nuevo, sin alterar el sedimento de los glóbulos rojos en cada tubo. Las fases de interfase de dos tubos de 50 ml se combinaron y se transfirieron a un tubo nuevo de 50 ml, dando como resultado un total de seis tubos de 50 ml. El tampón de decantación se añadió a cada tubo para llegar hasta un volumen final de 50 ml por tubo. Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 min, y se retiró el sobrenadante. Las células T de sangre periférica de cada donante se combinaron y se dividieron entre dos tubos, y se volvieron a suspender en 40 ml de tampón de decantación por tubo. Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, se aspiró el sobrenadante, y el sedimento de volvió a suspender en 30 ml de tampón de decantación por tubo.

Después de esta etapa, 3 ml de SRBC lavado se añadieron a cada tubo, y la mezcla se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. El sedimento se incubó sobre hielo durante al menos 1 hr, y cada sedimento se volvió a suspender cuidadosamente mediante la inversión de los tubos. Se usaron doce mililitros de ficoll para reforzar la mezcla en cada tubo. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min, y las fases de interfase se separaron a tubos nuevos como se ha descrito previamente. Las fases de interfase después se volvieron a suspender en 10 ml de tampón de decantación y se almacenaron en hielo hasta el comienzo del procedimiento de decantación.

Decantación de Células T: La decantación se realizó como sigue. La velocidad de la bomba de decantación se estableció a ~ 65 ml/min, y el etanol de almacenamiento se retiró de las líneas de alimentación para la bomba. Las líneas de alimentación, cámaras y rotor se lavaron con ~ 100 ml de agua destilada. La velocidad de la bomba se redujo hasta 50 ml/min, y se pasó el tampón de decantación se pasó a través de las líneas de alimentación, cámaras y rotor. Las líneas de alimentación se comprobaron para evaluar la presencia de burbujas, y las burbujas se eliminaron. La

ES 2 300 340 T3

velocidad de centrifuga se estableció después a 1950 ± 1 rpm, y se calibró la bomba a 15 ml/mm. La velocidad de la bomba se redujo después hasta 11 ml/min y se cerró la llave de paso de la cámara.

Para cargar las células, se cerró la llave de paso de la jeringa de carga y la pipeta de salida se colocó en el tubo de la muestra de 50 ml marcado como fracción de 11 ml/min. Se mezclaron las células y se añadieron a la jeringa de carga. La llave de paso de la jeringa de carga se abrió y el tubo de alimentación se enjuagó con 10 ml de tampón de decantación. Cuando ~ 0.5 ml de células permanecían en la jeringa, se añadió tampón de decantación y se repitió esta etapa una vez más. Después de esta etapa, se cerró la llave de paso de la jeringa de carga y la llave de paso de la cámara se abrió. Se recogieron fracciones de cincuenta mililitros a las velocidades de bomba de 11 (2 fracciones), 14, 16, y 36 (2 fracciones) ml/min, y después se colocaron en hielo. Se centrifugó la fracción de las células T a 1800 rpm durante 8 min, y las células se volvieron a suspender en 10 ml de 25% de suero fetal bovino/RPMI con $1 \mu\text{g/ml}$ de polimixina B. Se contaron las células y se almacenaron en hielo hasta uso. Se añadieron las células (1×10^6 células/ml) a RPMI 1640 con suero humano al 10% y 1% de GibcoBRL penicilina/estreptomicina. Después las células se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 72 hr. Se revistieron matraces T75 con $1 \mu\text{g/ml}$ de CD3 Mab G19.4 (descrito en el presente documento) en PBS durante 4 hr a 37°C . El matraz se lavó dos veces con PBS, y se añadieron las células (1×10^5 células/ml) in RPMI 1640 con suero humano al 10% y 1% GibcoBRL penicilina/estreptomicina.

CD28 MAb 9,3 (descrito anteriormente) se añadió hasta una concentración final de $1 \mu\text{g/ml}$. Se desarrollaron las células a 37°C y 5% de CO_2 durante 72 hr. Se añadieron células (1×10^6 células/ml) a RPMI 1640 con suero humano al 10% y 1% de GibcoBRL penicilina/estreptomicina. Se añadió PMA a 30 ng/ml y se añadió ionomicina a $1 \mu\text{M}$ y se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 hr. Se confirmó la proliferación de las células T de manera visual. Se sedimentaron todos los tipos de células y se congelaron sobre hielo seco y se almacenaron a -70°C hasta uso.

Se preparó ARN total usando el kit de aislamiento de aislamiento de ARN total SNAP de Invitrogen (Carlsbad, CA) (nº de Cat. K1950-01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se produjo usando Superscript First-Strand Synthesis System de GibcoBRL para RT-PCR (nº de Cat. 11904-018) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el cebado de oligo dT. La PCR se realizó usando $2 \mu\text{l}$ de la primera cadena de ADNc, $5 \mu\text{l}$ de tampón de la PCR (GibcoBRL), $1.5 \mu\text{l}$ de 25 mM MgCl_2 (GibcoBRL), $1 \mu\text{l}$ de 10 mM dNTPs (GibcoBRL), $2.5 \mu\text{l}$ de 10 pMol/ μl de cebador BSL2-9 (5' TGGTGCACAGCTTTGCT 3') (SEQ ID NO: 61), $2.5 \mu\text{l}$ de 10 pMol/ μl cebador BSL2-11 (5' TCTGGGGGGAATGTCAT 3') (SEQ ID NO: 62), $0.5 \mu\text{l}$ de 5U/ μl de platino Taq ADN polimerasa de GibcoBRL (nº de Cat. 10966-018), y $35 \mu\text{l}$ de dH_2O . la PCR se realizó sobre un PE Biosystems 9700. Usando las siguientes condiciones de ciclación: 94°C durante 30 seg; seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 seg, 61°C durante 30 seg, 72°C durante 60 seg; seguido de 72°C durante 10 min. Después de esto, $40 \mu\text{l}$ de la reacción de la PCR se desarrolló sobre un gel de agarosa al 1,2%.

El análisis de PCR indicó que ciertos tipos de células contenían predominantemente el transcrito BSL2-4616811, con o sin estimulación. Células PL-LCL no estimuladas y estimuladas mostraron mayores niveles de transcrito BSL2-4616811 que el transcrito BSL2-L165-35b (Figura 8A). Tanto las células no estimuladas como estimuladas HUVEC mostraron mayores niveles del transcrito BSL2-4616811 que el transcrito BSL2-L165-35b (Figura 8B).

Por el contrario, otros tipos de células contenían de manera predominante el transcrito BSL2-L165-35b, con o sin estimulación. Las células Raji estimuladas, y células Ramos no estimuladas y estimuladas mostraron mayores niveles del transcrito BSL2-L165-35b que el transcrito BSL2-4616811 (Figura 8A). Las células HL60 no estimuladas y estimuladas mostraron mayores niveles de transcrito BSL2-L165-35b que el transcrito BSL2-4616811 (Figura 8B).

Además, ciertos tipos de células mostraron un incremento en los niveles de transcrito BSL2-4616811 tras la activación. Células PM-LCL no estimuladas mostraron mayores niveles del transcrito BSL2-4616811, que se incremento con relación al transcrito BSL2-L165-35b tras la estimulación (Figura 8A). De manera similar, las células CE-LCL no estimuladas mostraron niveles mayores del transcrito BSL2-4616811, que se incrementaba con relación al transcrito BSL2-L165-35b tras la estimulación (Figura 8B). Las células Thp1 no estimuladas mostraron niveles equivalentes del transcrito BSL2-4616811 y el transcrito BSL2-L165-35b, sin embargo, los niveles del transcrito BSL2-4616811 se incrementaban tras la estimulación (Figura 8B). Las células T de sangre periférica no estimuladas del donante 079 mostraron predominantemente BSL-L 165-35b pero se desplazaron a BSL2-4616811 de manera predominante tras la estimulación. Las células t de sangre periférica del donante 124 mostraron un desplazamiento menos espectacular de BSL2-L165-35b a BSL2-4616811 tras la estimulación (Figura 8C). Las células CEM no estimuladas mostraron mayores niveles del transcrito BSL2-L165-35b, pero los niveles del transcrito BSL2-4616811 se incrementaron tras la activación (Figura 8D).

Otros tipos de células mostraron un incremento en los niveles de BSL2-L165-35b tras la activación. Las células HUT78 no estimuladas mostraron mayores niveles del transcrito BSL2-4616811, pero los niveles del transcrito BSL2-L165-35b se incrementaban tras la activación (Figura 8D). Estos resultados, acoplados a la conservación de las secuencias de aminoácido en los cuatro plegamientos de Ig, la conservación restos de aminoácidos importantes estructuralmente en los cuatro plegamientos de Ig, y la naturaleza conservadora de las diferencias de aminoácidos entre v1 c1 y v2c2, apoyan una función para BSL2-4616811 (BSL2vcvc) que es distinta de BSL2-L165-35b y BSL2-L165-21 (BSL2vc).

Para regular la presencia de los artefactos de la PCR, el producto de la PCR de HUVEC activadas con $\text{TNF}\alpha$ durante 24 hr se clonó usando el kit de clonación Invitrogen Original TA (nº de Cat. K2000-01) de acuerdo con

ES 2 300 340 T3

las instrucciones del fabricante. La construcción se usó para transferir células bacterianas, y se aislaron 25 colonias de color blanco y se desarrollaron en LB con 100 µg/ml de ampicilina. Se realizaron preparaciones de ADN y se realizó la secuenciación. De los 25 clones, 10 clones no contenían inserción, 3 clones no produjeron secuencia que se pudiera leer, 3 clones contenían secuencias relacionadas con BSL2 con supresiones extensivas, y los 9 clones restantes produjeron secuencia consistente con BSL2-4616811.

Se observó que ningún producto de la PCR que corresponde a BSL2-4616811 o BSL2-L165-35b se observó en células Raji no estimuladas. Para confirmar este resultado, la PCR se repitió para las células Raji no estimuladas y no estimuladas como se ha descrito previamente. De nuevo, no se detectó ningún producto de PCR para las células Raji no estimuladas. Después de esto, se realizó la PCR usando los cebadores G3PDH con el molde aislado de las células Raji no estimuladas y estimuladas. Las condiciones de ciclación eran idénticas a las descritas anteriormente, excepto que la temperatura de hibridación era de 55°C, y el tiempo de extensión era 45 seg. Se detectaron cantidades relativamente iguales de producto de G3PDH para tanto las células Raji no estimuladas como estimuladas. Esto proporcionó un apoyo adicional para la observación de que las células Raji no contienen transcrito BSL2 detectable.

Construcción de fusión de BSL2-4616811-Ig: para construir el plásmido BSL2-4616811-Ig, el dominio extracelular BSL2-4616811 se amplificó mediante la PCR a partir de la primera cadena de ADNc (GibcoBRL n° de Cat. 11904-018). El ADNc se preparó a partir de ARN purificado a partir de células THP1 estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 2 hr. El ARN se purificó usando Invitrogen FastTrack 2.0 (n° de Cat. K1593-02). La reacción de la PCR incluía 1 µl de ADNc; 5 µl de tampón 10 X PCR de GibcoBRL; 1,5 µl de 25 mM MgCl₂; 1 µl 10 mM dNTPs (Boehringer-Mannheim); 2,5 µl de cebador BSL2-L165-21-Ig-1 (10 pM/µl); 2,5 µl de cebador BSL2-L165-21-Ig-2 (10 pM/µl); 1 µl de CLONTECH Advantage polimerasa (n° de Cat. 8417-1); y 35,5 µl de milliQ H₂O. Los cebadores contenían la secuencia siguiente: BSL2-L165-21-Ig-1: 5' gg ggt ace ATG CTG CGT CGG CG 3' (SEQ ID NO: 63); BSL2-L165-21-Ig-2: 5' cg gaa ttc TGG GGG GAA TGT CAT AG 3' (SEQ ID NO: 64). Las muestras de la PCR se incubaron a 94°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos de incubación a 94°C durante 30 seg, 59°C durante 30 seg, y 72°C durante 45 seg, seguido de la incubación a 72°C durante 10 min.

Después de esto, 30 µl de la reacción de la PCR se llevó a cabo un gel de agarosa al 1,2% 0,5 X TBE. Una banda de aproximadamente 1100 pares de bases se escindió y se purificó mediante el kit de extracción en gel de QIAGEN (N° de Cat. 28704). Se ligó un microlitro del producto de la PCR (L254) en pCR2.1 usando el kit de clonación TA (Invitrogen; N° de Cat. K2050-01). Se transfectaron cinco mililitros de la mezcla de ligación en las bacterias competentes MAX Efficiency DH5-alfa (GibcoBRL; N° de Cat. 18258-012), y las células transfectadas se sembraron en placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 800 µg X-Gal. Se inocularon las colonias de color blanco en 5 ml de caldo LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina, y se desarrollaron a 37°C durante 18 hr. El ADN del plásmido se purificó con el kit QIAGEN spin miniprep (N° de Cat. 27106). El ADN del plásmido se digirió con KpnI y EcoRI. Los plásmidos que contenían las inserciones de aproximadamente 1300 pares de bases se secuenciaron usando las secuencias de ADN automatizadas de Applied Biosystems (secuenciadores de disposición capilar ABI 3700). L254-7 se determinó para contener la secuencia de tipo salvaje BSL2-4616811.

La parte de Fc de la IgG1 humana se amplificó por la PCR usando 0,001 µl de BSL1-Ig, como se ha descrito previamente; 5 µl de tampón de la PCR de GibcoBRL; 1,5 µl de 25 mM MgCl₂; 1 µl de 10 mM dNTPs (Boehringer-Mannheim); 2,5 µl de cebador Ig-1 (10 pM/µl) 2,5 µl de cebador de cebador BSL1g-2 (10 pM/µl); 1 µl de CLONTECH Advantage polimerasa; 36 µl de dH₂O. Los cebadores contenían la siguiente secuencia:

IgG-1: 5'g gaa ttc GAG CCC AAA TCT TGT GAC AA 3' (SEQ ID NO: 65); BSL1Ig-2 gc gc tct aga TCA TTT ACC CGG AGA CAG G (SEQ ID NO: 66). Se incubaron las muestras de la PCR a 94°C durante 1 min; después de 25 ciclos de incubación a 94°C durante 30 seg, 59°C durante 30 seg, y 72°C durante 30 seg; después de la incubación a 72°C durante 10 min.

Después de esto, 30 µl de la reacción de la PCR se desarrolló sobre un gel de agarosa al 1,2% 0,5 X TBE. Se escindió una banda de aproximadamente 700 pares de bases y se purificó usando el kit de extracción en gel de QIAGEN Qiaquick. Dos microlitros del fragmento purificado (L174) se ligaron en pCR2.1 usando el kit de clonación TA (Invitrogen). Cinco microlitros de la mezcla de ligación se transfectaron en bacterias competentes de GibcoBRL MAX Efficiency DH5-alfa, y las células transfectadas se sembraron sobre placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina y 800 µPg de X-gal. Las placas se incubaron durante 18 hr a 37°C. Se inocularon las colonias de color blanco en 5 ml de caldo LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se desarrollaron a 37°C durante 18 hr. El ADN del plásmido se preparó usando QIAGEN el kit Qiaprep spin miniprep. El ADN del plásmido se digirió con EcoRI y se desarrolló sobre un gel de agarosa. Se secuenciaron los plásmidos que contenían inserciones de aproximadamente 900 pares de bases. L174-3 se determinó que contenía la secuencia de IgG1 Fc de tipo salvaje.

L174-3 se digirió con EcoRI/XbaI y se separó sobre un gel de agarosa al 1,2% 0,5 X TBE. Se escindió una banda de aproximadamente 750 pares de bases y se purificó usando el kit de extracción en gel de QIAGEN. Se desarrollaron diez microlitros del fragmento purificado sobre un gel de agarosa próximo a un estándar para obtener una estimación de la concentración. Se ligaron aproximadamente 20 ng del fragmento EcoRI/XbaI (Ligation 200) en 40 ng del vector pADNC3.1 + digerido con EcoRI/XbaI (Invitrogen) usando la ADN ligasa de T4 de alta concentración de GibcoBRL (5 U/µl) diluido en el tampón de la ADN ligasa de T4 de GibcoBRL. Cinco microlitros de la mezcla de ligación se transfectaron en las bacterias competentes MAX Efficiency DH5-alfa (GibcoBRL), y las células transfectadas se sembraron sobre las placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C durante 18

ES 2 300 340 T3

hr. Las colonias se inocularon en caldo LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. El ADN del plásmido se purificó usando el kit de QIAGEN spin miniprep y se secuenció. La secuencia L200-1 se determinó para que fuera idéntica a la secuencia de L174-3.

5 La construcción L254-7 BSL2-4146811 se digirió con KpnI/EcoRI. Se escindió una banda de aproximadamente 1300 pares de bases a partir de un gel de agarosa al 1,2% 0,5 X TBE y se ligó en la construcción L200-1 Fc digerida con KpnI/EcoRI. Cinco microlitros de la reacción de ligación se transfectoron en células MAX Efficiency DH5-
10 alfa y se sembraron sobre placas LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina. Se desarrollaron las colonias, y el ADN del plásmido se purificó como se ha descrito anteriormente. El ADN del plásmido se digirió con KpnI/XbaI y se separó sobre un gel de agarosa como se ha descrito anteriormente. Los plásmidos que contienen una banda de aproximadamente 2 kb se secuenciaron como se ha descrito anteriormente. Se determinó que BSL2-4616811-Ig contenía las secuencias de BSL2-4616811 de tipo salvaje y de IgG1 de tipo salvaje. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de BSL2-4616811-Ig se muestra en las Figuras 4A y 4B.

15 *Anticuerpos monoclonales de BSL2*: la proteína de fusión de BSL2-4616811-Ig se purificó mediante purificación por afinidad.

Purificación de la proteína de fusión BSL2-4616811-Ig: la purificación de BSL2-4616811-Ig (humana-IgG1) se llevó a cabo mediante la purificación por afinidad de una etapa. El sobrenadante de las células COS transfectadas de manera transitoria que expresan BSL2461681 1-ig se aplicó a una columna de Sepharose de la proteína A inmovilizada.
20 La columna se lavó con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzó el nivel de comienzo. La proteína unida se eluyó con tampón de elución Pure IgG (Pierce Chemical, Rockford, IL; N° de Cat. 21004). Las fracciones que contenían la proteína unida se neutralizaron con 1/8 v/v de fosfato de sodio 3 M, pH 7. La preparación resultante se dializó contra PBS, se filtró (0,2 µm). Todos los tampones contenían 0,02% p/v de azida de sodio. Después la proteína de fusión purificada se usó para inmunizar ratones usando el protocolo descrito después excepto que se usó una cuarta dosis de recuerdo.

Inmunización con el polipéptido BSL2: Para la inmunización inicial, se usaron ratones entre 1 y 3 meses (BalbC; Harlan, Indianapolis, Indiana). Se preparó el adyuvante RIBI como sigue. En un vial, 0,5 mg de MPL (monofosfaril
30 lípido A; RIBI Immunochemical Research, Inc., Hamilton, MT); 0,5 mg de TDM (trehalosa dicorinomicolato sintético; RIBI Immunochemical Research, Inc.); y se mezclaron conjuntamente 40 µl de Escualeno con 0,2% de Tween 80. La mezcla se calentó hasta 40-45°C durante 5-10 min, y se añadieron 2 ml de polipéptido BSL2/PBS (125 µg/ml). La solución se agitó en un aparato Vortex vigorosamente durante varios minutos. La solución se extrajo con una jeringa y se inyectó en los ratones.

35 Las dosificaciones siguieron las recomendaciones de RIBI Immunochemical Research, Inc. Para la primera inyección, aproximadamente 100 µg de polipéptido BSL3 se volvió a suspender en 250 µl de 1 X RIBI en PBS. La mezcla se inyectó por vía intraperitoneal con una aguja de calibre 21. para una segunda e inyecciones posteriores, se proporcionaron refuerzos al menos con 3 semanas de diferencia. Las inyecciones estaban a la mitad de dosis. Al menos tres
40 semanas después de la tercera inyección, una vez que la titulación alcanzó un nivel aceptable (véase más adelante), al animal se le proporcionó un refuerzo final. Para las inyecciones finales, aproximadamente 1 mg/ml de polipéptido BSL2 se volvió a suspender en PBS (se omitió RIBI), y se administró la mezcla por vía intravenosa a través de las venas de la cola. Los animales se recogieron 3-4 días después.

45 Para controlar los niveles de titulación, se recogieron muestras de suero antes de la inmunización inicial (fondo) y 7-10 días después de cada inmunización para el control de la titulación. Los niveles de la titulación se midieron mediante ELISA. Se recogió el suero mediante extracción de sangre del ojo, o extracción de sangre de la cola. De manera típica, se extrajeron 200 µl de sangre para el ensayo de suero. Después de esto, se construyeron líneas celulares de hibridoma y se aislaron los MAb de BSL2 MABs como sigue:

50 *Líneas celulares de hibridoma*: las líneas celulares de hibridoma se construyeron usando los siguientes reactivos: medio de Dulbecco modificado por Iscoves (GibcoBRL; n° de Cat. 12440-053); Suero fetal bovino (Hyclone; N° de Cat. A-1115L, n° de Lote 11152564) inactivado por calor durante 30 min a 56°C; L-Glutamina-200 mm, 100 X (GibcoBRL; N° de Cat. 25030-081); Penicilina/estreptomycin (GibcoBRL; N° de Cat. 15140-122); ORIGEN Factor de Clonación de Hibridoma (Igen International, Inc., Gaithersburg, MD; n° de Cat. IG50-0615, n° de Lote 8077);
55 suplemento HT 100X (GibcoBRL; N° de Cat. 11067-030); suplemento HAT 100X (GibcoBRL; n° de Cat. 31062-037); PEG 1500, (Boehringer Mannheim; N° de Cat. 783 641); tampón de lisado de glóbulos rojos de Lab Services (N° de Cat. 3KL-449); azul de tripano; etanol al 70%; Células de mieloma (P3x) de ATCC.

60 Se usaron el siguiente equipo y suministros: capucha de flujo laminar; incubador de CO₂, microscopio invertido; baño de agua a 37°C; centrifuga; placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos (Corning; N° de Cat. 25860-96); pipetas serológicas y placas petri Integrad (Falcon); tubos de centrifuga de 50 ml (Corning; N° de Cat. 430921); tubos cónicos de 15 ml (Falcon; N° de Cat. 2096); tijeras y fórceps esterilizados en autoclave; pipeta de canales múltiples; puntas de pipera de 200 µl de orificio ancho (Denville Scientific, Inc., Metuchen, NJ; N° de Cat. P1105-CP); puntas de pipera estériles (VWR, Buffalo Grove, IL; N° de Cat. 53508-794).
65

ES 2 300 340 T3

Los medios de HAT y HT se prepararon como sigue:

Medio HAT		Medio HT	
IMDM	500 ml	IMDM	500 ml
L-Glutamina	2,5 ml	L-Glutamina	2,5 ml
Pen/estrep	5 ml	Pen/estrep	5 ml
Suplemento HAT	5 ml	Suplemento HT	5 ml
Hi. De organ. F.	10% final	Hi. De organ. F.	10% final
Clon.		Clon.	

A los ratones se les proporcionó un refuerzo final de 3-4 días antes de la fusión en PBS por vía intravenosa o intraperitoneal. Las células de mieloma se mantuvieron en crecimiento exponencial (fase logarítmica). Se sacrificaron los ratones, y se recogió de manera aséptica el bazo de cada ratón. El bazo se colocó en una placa Petri que contenía solución de Iscoves caliente sin FBS. Se preparó una solución de células de bazo y se transfirió a un tubo de centrifuga. Las células de mieloma sensibles a HAT se colocaron en un tubo de centrifuga de 50 ml. Las células de bazo y las células de mieloma se centrifugaron a 400 x g durante 5 min, y se aspiró el sobrenadante. Los glóbulos rojos del bazo se lisaron con 5 ml de tampón de lisis de RBC durante 1 min, y se llenó el tubo con medio SF (medio sin suero de hibridoma; GibcoBRL; N° de Cat. 12045-076). Se lavaron los esplenocitos con 50 ml de medio SF, y las células de bazo y las células de mieloma se centrifugaron en tubos de centrifuga separados a 400 x g durante 5 min. Las células de bazo y las células de mieloma se contaron y se volvieron a suspender en 25 ml con medio SF. Las células de mieloma se añadieron a las células de bazo para proporcionar una relación de 1:4. La mezcla se centrifugó a 400 x g durante 10 min para formar un sedimento compacto, y se retiró toda la solución de medio mediante aspiración.

Para los experimentos de fusión de células, PEG, medio SF, y medio HAT se inocularon a 37°C. Un ml de PEG al 50% se añadió a las células durante 1 min (se añadió PEG durante 30 seg y las células se agitaron durante 30 sec). La solución de PEG se añadió al lateral del tubo, y se agitó suavemente el sedimento. Con agitación, se añadió 1 ml de medio SF a las células durante 1 min, y se añadieron 8 ml de medio SF a las células durante 2 min. Las células se centrifugaron a 400 x g durante 10 min, y se aspiró el sobrenadante. Las células se volvieron a suspender de manera suave en 10 ml de medio selectivo HAT mediante una pipeta de puntería directamente al sedimento y con agitación. Se añadió medio HAT adicional para conseguir una concentración de células de 5×10^5 células/ml. Se tomaron alícuotas de las células en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a 5×10^4 células/pocillo. Después de 3 días, se añadió medio HT a 100 μ l/pocillo. Aproximadamente 10 días después, se ensayaron los clones para evaluar la producción de anticuerpos. Los clones positivos se expandieron a 1 pocillo una placa de 24 pocillos. Después los clones positivos se volvieron a ensayar, se determinó el isotipo, y se expandió a T25 (matraz de cultivo de tejidos de 0,25 cm cuadrados).

Análisis de ELISA: para ensayar para evaluar los clones positivos, se realizó el análisis de ELISA usando los siguientes reactivos y suministros: carbonato/bicarbonato pH 9,6 (Sigma, St. Louis, MO; N° de Cat. C-3041) para revestimiento; placas Immulon 2 ELISA (Dynex, Chantilly, VA; N° de Cat. 0110103455); 10 X PBS (GibcoBRL) preparado hasta concentración 1 X; tampón de lavado que comprende Tween 20 (0,05% de concentración final) en 1 X PBS; tampón de bloqueo/diluyente de muestra que comprende tampón de lavado con 5% de NFM leche desnatada; y mezcla de cromógeno que comprende 50% de TMB (Kirkegaard & Perry Labs Gaithersburg, MD; N° de Cat. 50-76-01) y 50% de peroxidasa (Kirkegaard & Perry Labs N° de Cat. 50-65-00).

Para ELISA, las placas de revistieron con 75 μ l/pocillo (1 μ l/ml) BSL3-Ig en carbonato/bicarbonato durante toda una noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS Tween 20 (usando Skatron), y se bloquearon con 300 μ l de tampón de bloqueo durante 45 min a temperatura ambiente. Las placas se secaron golpeando ligeramente y se incubaron con 75 μ l/pocillo de suero diluidos en tampón de bloqueo (el suero se diluyó 1:50 para la concentración más alta y después se diluyó en serie por factores de tres) durante 45 min a temperatura ambiente y se lavó como antes. Después las placas se incubaron con 75 μ l/pocillo de anti-ratón IgG en tampón de bloqueo (dilución 1:10000; marcado con HRP; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) durante 45 min a temperatura ambiente, y se lavó como antes. Después de esto, las placas se incubaron con 100 μ l/pocillo de mezcla de cromogen, y se incubaron hasta 15 min a temperatura ambiente. La señal se inactivó con 100 μ l de ácido sulfúrico 1N, y se leyeron las muestras a 450/630 nm. Usando ELISA, los sobrenadantes de hibridomas se seleccionaron inicialmente contra la proteína de fusión BSL2-4616811-Ig, y después se seleccionaron contra la proteína Ig sola. Los hibridomas que producían anticuerpos que se unen a BSL2-4616811-Ig, pero no a Ig, se designaron como clones positivos.

Subclonación: se expandieron los clones positivos de la placa de fusión inicial. Una vez desarrolladas, las células se sometieron a dos rondas de clonación de células individuales para asegurarse que eran monoclonales. Cada hibridoma se sembró en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una concentración de 0,5 células/pocillo o menos. Una vez que se formaron las colonias macroscópicas, se seleccionaron las colonias mediante ELISA. Los clones de cada

ES 2 300 340 T3

hibridoma se valoraron mediante ELISA. Los clones que dieron lugar a las señales más fuertes se expandieron y se sometieron a una segunda ronda de clonación. Los clones positivos se seleccionaron de nuevo mediante ELISA y se valoraron. Los clones que daban lugar a la señal más fuerte se expandieron y se volvieron a congelar.

5 Ejemplo 3

Ensayos que usan anticuerpos monoclonales de BSL

Análisis de FACS de Células epiteliales de pulmón que usa BSL1 y BSL2

10

Anticuerpos monoclonales: A549, una línea celular de epitelio de pulmón se cultivó en RPMI 1640 (GibcoBRL n° de Cat. 11875-005) más FBS al 10% (Summit, Ft Collins, CO; N° de Cat. S-100-05) y penicilina/estreptomicina al 1% (GibcoBRL n° de Cat. 15140-122) a 37°C y 5% de CO₂ hasta un 90% de confluencia en un matraz T75 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ; n° de Cat. 353111). Las células se transportaron con Versene (GibcoBRL N° de Cat. 15040-066) y se lavaron dos veces con RPMI 1640. Las células se añadieron a una placa de 96 pocillos (Becton Dickinson N° de Cat. 353077) (2,5 x 10⁵ células por pocillo), y se centrifugaron a 2000 RPM en una centrífuga de mesa Beckman. A continuación, las células se volvieron a suspender en RPMI 1640 o RPMI1640 con 1 µg de anticuerpo de control negativo (MAb 15E10AA3) o sobrenadante de hibridoma, y se incubaron en hielo durante 30 min. Las células se lavaron después dos veces en RPMI 1640, y se volvieron a suspender en anticuerpos conjugados anti-ratón anti-Fc FITC (BioSource, Camarillo CA; n° de Cat. AMI4408) se diluyeron 1:50 en RPMI 1640. Después de esto, las células se incubaron sobre hielo durante 30 min, se lavaron dos veces en RPMI 1640, se volvieron a suspender en RPMI 1640, y se analizaron en un Becton Dickinson FACScan. El análisis de FACS indicó que los MAbs de BSL1 MAb 32F9A7 (Figura 9A) y BSL2-4616811 (Figura 9B) se unían todos a las células A549.

15

20

25

Análisis de FACS de diversos tipos de células que usa anticuerpos monoclonales de BSL3: Para determinar si el polipéptido de BSL3 se expresaba sobre la superficie de diversos tipos de células, las células se desarrollaron en medio como se muestra en la Tabla 2, a continuación. HUT 78 se suplementó con FBS al 20% (Summit Biotechnology, Ft Collins, CO; N° de Cat. S-100-05). Todas las otras líneas celulares se suplementaron con 10% de Summit FBS. Además, todas las líneas celulares se suplementaron con 1% de penicilina/estreptomicina (GibcoBRL; N° de Cat. 15140-122). Todas las líneas celulares se desarrollaron a 37°C con 5% de CO₂.

30

TABLA 2

35

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	MEDIO
HL60	premieloide	RPMI 1640
THP1	monocítico	RPMI 1640
40 A549	epitelio de pulmón	RPMI 1640
H292	epitelio de pulmón	RPMI 1640
45 PM LCL	linaje B	RPMI 1640
PL LCL	linaje B	RPMI 1640
CE LCL	linaje B	RPMI 1640
50 Ramos	linaje B	RPMI 1640
CEM	linaje T	RPMI 1640
HUT 78	linaje T	IMDM ¹
55 Jurkat	linaje T	RPMI 1640 ²
¹ IMDM: GibcoBRL; N° de Cat. 12440-053		
² RPMI 1640: GibcoBRL; N° de Cat. 11875-005		

60

65

Las células se desarrollaron hasta aproximadamente 5 x 10⁵ células/ml. Las células se lavaron dos veces en RPMI 1640 sin suero y se volvieron a suspender proporcionando una concentración final de 2,5 x 10⁶ células/ml. Los anticuerpos anti-BSL3 MAb 1A4A1 o anticuerpos MAb 15E10A3 de control de isótopos se añadieron a 5 µg/ml y se incubaron a 4°C durante 30 min. Las células se lavaron dos veces en RPMI 1640 sin suero se volvieron a suspender en el RPMI 1640 sin suero más 2% de anti-ratón IgG de cabra conjugado a FITC (BioSource, Camarillo, CA; N° de

Cat. AMI4408). Las células se incubaron 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces en RPMI 1640 sin suero y se analizaron en un Becton Dickinson FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). El polipéptido de BSL3 se expresó sobre A549 (epitelio de pulmón), H292 (epitelio de pulmón), PM LCL (linaje B), μ l LCL (linaje B), CE LCL (linaje B), y HUT78 (linaje T) células (Figura 9C).

Análisis de FACS de Células endoteliales de la vena umbilical que usa anticuerpos monoclonales de BSL3: se usaron anticuerpos monoclonales BSL3 para medir los niveles de polipéptido de BSL3 sobre las células endoteliales de la vena umbilical humana con o sin estimulación con TNF-alfa. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se desarrollaron a 37°C con 5% de CO₂ en medio EGM (Clonetics, Walkersville, MD; N° de Cat. CC-4176) y se desarrollaron hasta confluencia. TNF-alfa se omitió o añadió a 10 ng/ml durante 24 hr. Las células se transportaron con Versene (GibcoBRL; N° de Cat. 15040-066) y se prepararon para citometría de flujo usando anticuerpos anti-BSL3 MAb 1A4A1 como se ha descrito anteriormente. Como control, se realizó la citometría de flujo sin anticuerpos. Los resultados indicaron que los niveles del polipéptido de BSL3 se incrementaron con HUVEC estimuladas con TNF-alfa (Figura 9D). Este incremento no se observó en las células no estimuladas células (Figura 9D).

Análisis de FACS de monocitos de sangre periférica usando anticuerpos monoclonales de BSL3: Se usaron los anticuerpos monoclonales de BSL3 para medir los niveles de monocitos de sangre periférica humana con o sin GM-CSF IL-4 o estimulación por PHA. Se purificaron monocitos de sangre periférica (PBMC) como sigue. Se tomaron alícuotas de muestras de sangre de manera igual entre doce tubos cónicos de 50 ml. Se añadió un volumen de tampón de decantación (a temperatura ambiente) a cada una de las muestras. Las muestras no se reforzaron con 10 ml de solución en ficoll de LSM (mezcla de separación de linfocitos), y se centrifugaron a 1800 rpm durante 25 min. Se retiró la capa superior de material rojizo, y la capa de LSM se transfirió a un nuevo tubo (6 tubos por donante). La mayoría de los PBMC se observaron en la parte superior de la capa de LSM layer. Se añadió tampón de decantación (50 ml) a cada tubo, y se centrifugó la mezcla a 1800 rpm durante 8 min. Se aspiró el sobrenadante, y se volvieron a suspender los PBMC en 15 ml de tampón de decantación. La mezcla se transfirió en 2 nuevos tubos cónicos de 50 ml (45 ml de volumen total por tubo), y se centrifugó a 1000 rpm durante 8 min. Se aspiró el sobrenadante, y se repitió este procedimiento dos veces más. Los PBMC se volvieron a suspender en matraces que contenían RPMI 1640 con FBS al 2% FBS, y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante una hr. Los matraces se sacudieron cada 20 min. Los matraces se lavaron suavemente (dos veces) con medio para retirar las células T y las células B. Después los matraces se lavaron vigorosamente con RPMI 1640 más 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina para obtener monocitos. Los PBMC se lavaron dos veces en RPMI 1640 con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina. Los PBMC se volvieron a hasta 5×10^6 células/ml, y se transfirieron a matraces. Los PBMC se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ sin estimulación durante cuatro días. En experimentos paralelos, los PBMC se incubaron con GM-CSF (15 ng/ml) e IL-4 (75 ng/ml) durante cuatro días, o los PBMC se incubaron con PHA (1 μ g/ml) durante cuatro días. Los matraces se lavaron de manera vigorosa con RPMI 1640 para retirar los monocitos. Los PBMC se lavaron dos veces en RPMI 1640 se examinaron mediante citometría de flujo como se ha descrito para las diversas líneas celulares, anteriormente. Los resultados indicaron que los niveles de polipéptidos de BSL3 se incrementaron sobre las células estimuladas con GM-CSF IL4 o PHA (Figuras 9E-9F). Este incremento no se observó en las células no estimuladas (Figuras 9E-9F).

Coestimulación de células T de sangre periférica: se revistieron placas de 96 pocillos (Becton Dickinson N° de Cat. 353072) con la cantidad indicada de anti-CD3 MAb G19.4 (descrito previamente) en PBS (GibcoBRL N° de Cat. 14190-144). Las placas se incubaron a 4°C durante 16 hr. Las placas se lavaron dos veces en PBS. Se añadieron las siguientes proteínas: BSL2-4616811-Ig (20 μ g/ml), BSL3-Ig (15 μ g/ml), o Chi L6 (10 μ g/ml) en PBS. Chi L6 es un fragmento de proteína que comprende la parte Fc de la IgG humana, y es idéntica a la parte de Fc usada en las proteínas de fusión BSL, descritas anteriormente. Se usaron diferentes concentraciones de proteína para proporcionar una molaridad equivalente. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 hr. Las placas se lavaron dos veces en PBS. Células T de sangre periférica se purificaron como se ha descrito anteriormente. Se añadieron células (5×10^4 células por pocillo) en RPMI con 10% de suero humano (Sigma N° de Cat. H-4522) y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 hr. Durante las últimas 8 hr, las células se incubaron con 50 μ l adicionales de medio que contiene 50 μ Ci/ml ³H-timidina (NEN N° de Cat. NET-027). Se recogieron las células sobre un recolector de células Brandel (Brandel, Gaithersburg, MD) usando placas Packard GF/C (Packard, Meriden, CT; N° de Cat. 6005174), y las placas se secaron al aire durante toda una noche. Después de esto, se añadieron. 50 μ l de Microscint 20 (Packard N° de Cat. 6013621), y se contó la marca radiactiva sobre un Packard Topcount NXT.

Bloqueo de la coestimulación de la célula T de sangre periférica usando los anticuerpos monoclonales BSL2 y BSL3: se revistieron placas de 96 pocillos (Becton Dickinson N° de Cat. 353072) con 20 μ g/ml de CD3 MAb G19.4 (descrito previamente) en PBS (GibcoBRL N° de Cat. 14190-144). Se incubaron las placas a 4°C durante 16 hr. Las placas se lavaron dos veces en PBS. Se añadieron las siguientes proteínas: BSL2-4616811-Ig (20 μ g/ml), BSL3-Ig (15 μ g/ml), o (10 μ g/ml) L6-Ig en PBS. Se usaron diferentes concentraciones de proteína para proporcionar una molaridad equivalente. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 hr. Las placas se lavaron dos veces en PBS. Se purificaron las células T de sangre periférica como se ha descrito anteriormente. Se añadieron las células (5×10^4 células por pocillo) en RPMI con 10% de suero humano (Sigma N° de Cat. H-4522) y 1% de GibcoBRL penicilina/estreptomicina. Se añadieron BSL2 o BSL3 MAbs o MAbs de isotipo control hasta una concentración final de 20 μ g/ml. Para ensayar la coestimulación, se omitieron los MAb. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 hr. Durante las últimas 8 horas, las células se incubaron en 50 μ l de medio con 50 μ Ci/ml ³H-timidina (NEN N° de Cat. NET-027). Se recogieron las células sobre un recolector de células Brandel usando placas Packard GF/C (N° de Cat. 6005174), las placas se secaron al aire durante toda una noche. Después de esto, se añadieron 50 μ l de Microscint 20 (Packard

ES 2 300 340 T3

Nº de Cat. 6013621), y se contó la marca radiactiva sobre un Packard Topcount NXT.

Los resultados indicaron que las proteínas de fusión BSL2-4616811-Ig y BSL3-Ig actuaban como moléculas de coestimulación para las células T de sangre periférica se incubaron con CD3 MAb G19.4 (Figuras 10A-10F). Esto se confirmó con donantes separados de células t de sangre periférica: donante 010 (Figura 10A); donante 127 (Figura 10B); donante 078 (Figuras 10C-10D); y donante 124 (Figuras 10E-10F). Los resultados además indicaron que los Mab de BSL2 y BSL3 bloqueaban el efecto de coestimulación de las proteínas de fusión de BSL2-4616811-Ig y BSL3-Ig, respectivamente (Figuras 10G-10J). Esto se confirmó con dos donantes separados de células T de sangre periférica: donante 010 (Figuras 10G-10H); y donante 127 (Figuras 10I-10J).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico o una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 ó 13;
- (b) una molécula de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1 a 465 de la SEQ ID NO: 7;
- (c) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 11;
- (d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos 99,5% idéntica a la SEQ ID NO: 13;
- (e) una secuencia de nucleótidos que comprende los polinucleótidos que codifican los aminoácidos 1 a 698 de la SEQ ID NO: 9;
- (f) una secuencia de nucleótidos que comprende los polinucleótidos que codifican los aminoácidos 2 a 698 de la SEQ ID NO: 9;
- (g) una secuencia de nucleótidos que comprende los polinucleótidos que codifican los aminoácidos 69 a 698 de la SEQ ID NO: 9;
- (h) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 1 a 2094 de la SEQ ID NO: 8;
- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 4 a 2094 de la SEQ ID NO: 8;
- (j) una secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos 205 a 2094 de la SEQ ID NO: 8;
- (k) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6, 10 ó 12;
- (l) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el ADN contenido en PTA-1987, PTA-1988 o PTA-1993;
- (m) una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de (a) a (k); y
- (n) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEQ ID NO: 7, 11 y 13 y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio Fc de inmunoglobulina G.

2. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la célula huésped se selecciona entre el grupo constituido por células de bacterias, levaduras, insectos, mamíferos y vegetales.

4. Un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

5. Un anticuerpo que se une al polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 que es monoclonal.

7. Una célula de hibridoma que produce el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 3, el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 y un vehículo, excipiente, o diluyente fisiológicamente aceptable.

9. Un procedimiento de identificación de un ligando que se une a un polipéptido relacionado con B7 de la reivindicación 4, que comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido que tiene unido a él el polipéptido relacionado con B7;
- (b) poner en contacto el soporte con los polipéptidos obtenidos de una muestra biológica, e incubar el soporte en condiciones que permiten uno o más polipéptidos de la muestra que se asocian al polipéptido relacionado con B7; y

ES 2 300 340 T3

- (c) determinar si el polipéptido relacionado con B7 se asocia con uno o más polipéptidos de la muestra, de ese modo identificar un ligando que se une al polipéptido relacionado con B7.

10. Un procedimiento de identificación de un agente de ensayo que se une a un polipéptido relacionado con B7 de la reivindicación 4 que comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido que tiene unido a él el polipéptido relacionado con B7;
- (b) poner en contacto el soporte con los agentes de ensayo, e incubar el soporte en condiciones que permiten que uno o más de los agentes de ensayo se asocien al polipéptido relacionado con B7; y
- (c) determinar si el polipéptido relacionado con B7 se asocia con uno o más de los agentes de ensayo, de ese modo identificar un agente de ensayo que se une al polipéptido relacionado con B7.

11. Uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 3, el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4 o el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5 para la preparación de una composición farmacéutica para incrementar o disminuir la actividad de las células T en un sujeto que comprende: administrar al sujeto la composición farmacéutica en una cantidad eficaz para disminuir la actividad de la célula inmune.

12. Un procedimiento *in vitro* de diagnóstico de una afección que está asociada a la actividad celular inmune, que comprende:

- (a) poner en contacto ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 con una muestra biológica en condiciones de alta rigurosidad que permiten que el ácido nucleico se hibride a un ácido nucleico en la muestra y de este modo formar un complejo;
- (b) medir el complejo de hibridación de (a); y
- (c) comparar la cantidad del complejo de hibridación de (a) con un complejo de hibridación en una muestra biológica estándar, en la que un incremento de la cantidad estándar indica la diagnosis de la afección.

13. Un procedimiento *in vitro* de diagnóstico de una afección que está asociada a un incremento de la actividad celular inmune, que comprende:

- (a) poner en contacto el anticuerpo aislado de la reivindicación 5 con una muestra biológica en condiciones que permiten que el que el anticuerpo se una a una secuencia de aminoácidos en la muestra, y de ese modo formar un complejo;
- (b) detectar el complejo de (a); y
- (c) comparar la cantidad de complejo de (a) con una cantidad de complejo en una muestra biológica estándar, en la que un incremento de la cantidad estándar indica la diagnosis de la afección.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el sujeto está diagnosticado con una infección viral.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la infección viral se selecciona entre el grupo constituido por infecciones por virus de inmunodeficiencia humano, virus de papiloma humano, virus herpes simplex, virus de encefalitis humano, rinovirus humano, y virus de la gripe humano.

16. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el sujeto está diagnosticado con cáncer.

17. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que el sujeto está diagnosticado con o la afección es una afección seleccionada entre el grupo constituido por rechazo de tejidos, rechazo de médula ósea, rechazo de transplante de órganos, y enfermedad de injerto contra huésped.

18. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, en el que el sujeto está diagnosticado con o la afección es una afección asociada a inflamación.

19. El uso o los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la afección se selecciona entre el grupo constituido por psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y aterosclerosis.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 11 o los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que el sujeto está diagnosticado con, o la afección es, una enfermedad autoinmune.

21. El uso o los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona entre el grupo constituido por artritis reumatoides, esclerosis múltiple, Lupus eritematoso, tiroiditis de

ES 2 300 340 T3

Hashimoto, mixedema primario, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, diabetes mellitus insulina dependiente, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, pénfigo, enfermedad de Crohn, oftalmia simpática, uveitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, polimiositis y enfermedad mixta del tejido conectivo.

5

22. Un kit para detectar una molécula de ácido nucleico relacionada con B7 que comprende:

(a) la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1; y

10 (b) al menos un componente para detectar la unión de la molécula de ácido nucleico aislada con la molécula de ácido nucleico relacionada con B7.

23. Un kit para detectar un polipéptido relacionado con B7 que comprende:

15 (a) el anticuerpo aislado de la reivindicación 5; y

(b) al menos un componente para detectar la unión del anticuerpo aislado a una secuencia de polipéptidos relacionados con B7.

20 24. Un ratón transgénico que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

25. Una línea celular que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

```

1      acgcgggggt gccgcgcggc cccagttctg cgcagcttcc cgaggctccg
51     caccagccgc gcttctgtcc gcctgcaggg cattccagaa agatgaggat
101    atttgctgtc tttatattca tgacctactg gcatttgctg aacgcattta
151    ctgtcacggg tcccaaggac ctatatgtgg tagagtatgg tagcaatatg
201    acaattgaat gcaaattccc agtagaaaaa caattagacc tggctgcact
251    aattgtctat tgggaaatgg aggataagaa cattattcaa tttgtgcatg
301    gagaggaaga cctgaagggt cagcatagta gctacagaca gagggcccgg
351    ctgttgaagg accagctctc cctgggaaat gctgcacttc agatcacaga
401    tgtgaaattg caggatgcag ggggtgtaccg ctgcatgata agctatgggtg
451    gtgccgacta caagcgaatt actgtgaaag tcaatgcccc atacaacaaa
501    atcaacccaa gaattttggg tgtggatcca gtcacctctg aacatgaact
551    gacatgtcag gctgagggct accccaagge cgaagtcatc tggacaagca
601    gtgaccatca agtccctgagt ggtaagacca ccaccaccaa ttccaagaga
651    gaggagaagc ttttcaatgt gaccagcaca ctgagaatca acacaacaac
701    taatgagatt ttctactgca cttttaggag attagatcct gaggaaaacc
751    atacagctga attgggtcatc ccagaactac ctctggcaca tccctccaat
801    gaaaggactc acttggtaat tctgggagcc atcttattat gcotttggtgt
851    agcactgaca ttcattcttc gttaaagaaa agggagaatg atggatgtga
901    aaaaatgtgg catccaagat acaaactcaa agaagcaag tgaatacat
951    ttggaggaga cgtaatccag cattggaact tctgatcttc aagcagggat
1001   tctcaacctg tggtttaggg gttcatcggg gctgagcgtg acaagaggaa
1051   ggaatgggcc cgtgggatgc aggcaatgtg ggacttaaaa ggcccaagca
1101   ctgaaaatgg aacctgcgaa agcagaggag gagaatgaag aaagatggag
1151   tcaaacaggg agcctggagg gagaccttga tactttcaaa tgccctgaggg
1201   gctcatcgac gcctgtgaca gggagaaaagg atacttctga acaaggagcc
1251   tccaagcaaa tcatccattg ctcatcctag gaagacgggt tgagaatccc
1301   taatttgagg gtcagttcct gcagaagtgc cctttgcctc cactcaatgc
1351   ctcaatttct tttctgcatg actgagagtc tcagtgttgg aacgggacag
1401   tatttatgta tgagtttttc ctattttatt tgagtcctgt aggtcttctt
1451   gtcatgtgag tgtggttgtg aatgatttct tttgaagata tattgtagta
1501   gatgttataa ttttgtcgcc aaactaaact tgctgcttaa tgatttgctc
1551   acatctagta aaacatggag tattcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1601   aaaa

```

FIG. 1B

```

1      MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEME
61     DKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG
121    ADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTT
181    TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTH
241    LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

```

FIG. 1C

1	acgcgsggggt	gccgcgcggc	cccagttctg	cgcagcttcc	cgaggctccg
51	caccagccgc	gcttctgtcc	gcctgcagg	cattccagaa	agatgaggat
101	atgtgctgtc	tttatattca	tgacctactg	gcatttgctg	aacgcattta
151	ctgtcacgg	tcccaaggac	ctatatgtgg	tagagtatgg	tagcaatatg
201	acaattgaat	gcaaattccc	agtagaaaaa	caattagacc	tggctgcact
251	aattgtctat	tgggaaatgg	aggataagaa	cattattcaa	tttgtgcatg
301	gagaggaaga	cctgaagggt	cagcatagta	gctacagaca	gaggggcccgg
351	ctgttgaagg	accagctctc	cctgggaaat	gctgcacttc	agatcacaga
401	tgtgaaattg	caggatgcag	gggtgtaccg	ctgcatgatc	agctatgggtg
451	gtgccgacta	caagcgaatt	actgtgaaag	tcaatgcccc	ataaacaaca
501	atcaacccaa	gaattttgg	tgtggatcca	gtcacctctg	aacatgaact
551	gacatgtcag	gctgagggct	accccaaggc	cgaagtcatc	tggacaagca
601	gtgaccatca	agtccctgag	ggtaagacca	ccaccacca	ttccaagaga
651	gaggagaagc	ttttcaatgt	gaccagcaca	ctgagaatca	acacaacaac
701	taatgagatt	ttctactgca	cttttaggag	attagatcct	gaggaaaacc
751	atacagctga	attgggtcatc	ccagaactac	ctctggcaca	tcctccaaat
801	gaaaggactc	acttggtaat	tctgggagcc	atcttattat	gccttggtgt
851	agcactgaca	ttcatcttcc	gtttaagaaa	agggagaatg	atggatgtga
901	aaaaatgtgg	catccaagat	acaaactcaa	agaagcaaag	tgatacacat
951	ttggaggaga	cgtaatccag	cattggaaact	tctgatcttc	aagcagggat
1001	tctcaacctg	tggtttaggg	gttcatcggg	gctgagcgtg	acaagaggaa
1051	ggaatgggccc	cgtgggatgc	aggcaatgtg	ggacttaaaa	ggcccaagca
1101	ctgaaaatgg	aacctgcgaa	agcagaggag	gagaatgaag	aaagatggag
1151	tcaaacaggg	agcctggagg	gagaccttga	tactttcaaa	tgccctgagg
1201	gctcatcgac	gcctgtgaca	gggagaaaagg	atacttctga	acaaggagcc
1251	tccaagcaaa	tcatccattg	ctcatcctag	gaagacgggt	tgagaatccc
1301	taatttgagg	gtcagttcct	gcagaagtgc	cctttgcctc	cactcaatgc
1351	ctcaatttct	tttctgcatg	actgagagtc	tcagtgttgg	aacgggacag
1401	tatttatgta	tgagttttcc	ctattttatt	tgagtctgtg	aggctctctt
1451	gtcatgtgag	tgtggttgtg	aatgatttct	tttgaagata	tattgtagta
1501	gatgttacaa	ttttgtcgcc	aaactaaact	tgctgcttaa	tgatttgctc
1551	acatctagta	aaacatggag	tatttgtaag	gtgcttggtc	tcctctataa
1601	ctacaagtat	acattggaag	cataaagatc	aaaccgttgg	ttgcatagga
1651	tgtcaccttt	atttaaccca	ttaatactct	ggttgacctc	atcttattct
1701	cagacctcaa	gtgtctgtgc	agtatctgtt	ccattttaa	atcagcttta
1751	caattatgtg	gtagcctaca	cacataatct	catttcatcg	ctgtaaccac
1801	cctgtttgtg	taaccactat	tatttttacc	atcgtacagc	tgaggaagca
1851	aacagattaa	gtaacttgcc	caaaccagta	aatagcagac	ctcagactgc
1901	caccactgt	cctttttata	tacaattttac	agctatatatt	tacttttaagc
1951	aattcttttta	ttcaaaaacc	atttatttaag	tgcccttgca	atatcaatcg
2001	ctgtgccagg	cattgaatct	acagatgtga	gcaagacaaa	gtacctgtcc
2051	tcaaggagct	catagtataa	tgaggagatt	aacaagaaaa	tgtattatta
2101	caatttagtc	cagtgtcata	gcataaggat	gatgcgagg	gaaaaccgca
2151	gcagtgttgc	caagaggagg	aaataggcca	atgtggtctg	ggacgggttg
2201	atatacttaa	acatcttaat	aatcagagta	attttcattt	acaaagagag
2251	gtcggtactt	aaaataaccc	tgaaaaataa	cactggaatt	ccttttctag
2301	cattatatatt	attcctgatt	tgcctttgcc	atataatcta	atgcttggtt

FIG. 1C (CONTINUACIÓN)

```

2351  atatagtgtc  tggatattggt  taacagttct  gtcttttcta  tttaaatgcc
2401  actaaatttt  aaattcatac  ctttccatga  ttcaaaattc  aaaagatccc
2451  atgggagatg  gttggaaaaa  ctccacttca  tcctccaagc  cattcaagtt
2501  tcctttccag  aagcaactgc  tactgccttt  cattcatatg  ttcttctaaa
2551  gatagtctac  atttggaaat  gtatgttaaa  agcacgtatt  tttaaaattt
2601  ttttcctaaa  tagtaacaca  ttgtatgtct  gctgtgtact  ttgctatttt
2651  tattttatttt  agtgtttctt  atatagcaga  tggaatgaat  ttgaagttcc
2701  cagggctgag  gatccatgcc  ttctttgttt  ctaagttatc  tttcccatag
2751  cttttcatta  tctttcatat  gatccagtat  atgttaaata  tgtcctacat
2801  atacatttag  acaaccacca  tttgttaagt  atttgctcta  ggacagagtt
2851  tggatttggt  tatgtttgct  caaaaggaga  cccatgggct  ctccaggggtg
2901  cactgagtca  atctagtcct  aaaaagcaat  cttattatta  actctgtatg
2951  acagaatcat  gtctggaact  tttgttttct  gctttctgtc  aagtataaac
3001  ttcactttga  tgctgtactt  gcaaaatcac  attttctttc  tggaaattcc
3051  ggcagtgtac  cttgactgct  agctaccctg  tgccagaaaa  gcctcattcg
3101  ttgtgcttga  acccttgaat  gccaccagct  gtcatcacta  cacagccctc
3151  ctaagaggct  tcctggagggt  ttcgagattc  agatgccctg  ggagatccca
3201  gagtttccct  tccctcctgg  ccatattctg  gtgtcaatga  caaggagtac
3251  cttggctttg  ccacatgtca  aggctgaaga  aacagtgtct  ccaacagagc
3301  tccttgttat  ctgtttgtac  atgtgcattt  gtacagtaat  tgggtgtgaca
3351  gtgttctttg  tgtgaattac  aggcaagaat  tgtggctgag  caaggcacat
3401  agtctactca  gtctattcct  aagtcctaac  tcctccttgt  ggtgttggat
3451  ttgtaaggca  ctttatccct  tttgtctcat  gtttcatcgt  aaatggcata
3501  ggcagagatg  atacctaat  ctgcatttga  ttgtcacttt  ttgtacctgc
3551  attaatttaa  taaaatattc  ttatttattt  tgttacttgg  taaaaaaaaa
3601  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  a

```

FIG. 2A

```

1   atgcccattgggggtctctgcaaccgctggccaccttgtacctgctggggatgctgggtcgct
61  tcctgcctcggaactagtgttcccaaggacctatatgtggttagagtatggtagcaatatg
121 acaattgaatgcaaattcccagtagaaaaacaatttagacctggctgcactaattgtctat
181 tgggaaatggaggataaagaacattattcaatttgtgcatggagagggaagacctgaagggt
241 cagcatagtagctacagacagagggcccggtgttgaaggaccagctctccctgggaaat
301 gctgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatgac
361 agctatgggtgggtgccgactacaagcgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaaaaa
421 atcaaccaagaattttgggtgtggatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcag
481 gctgagggctaccocaaggccgaagtcacatctggacaagcagtgaccatcaagtcctgagt
541 ggtaagaccaccaccaccaattccaagagagaggagaagcttttcaatgtgaccagcaca
601 ctgagaatcaacacacaactaatgagattttctactgcacttttaggagattagatcct
661 gaggaaaaccatacagctgaattgggtcatcccagaactacctctggcacatcctccaaat
721 gaaaggactcgaggagatcccaggaggcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccc
781 ccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaaccc
841 aaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagc
901 cacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
961 aagacaaagccgcgaggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc
1021 gtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagcc
1081 ctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag
1141 gtgtacacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgc
1201 ctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
1261 gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctac
1321 agcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
1381 atgcatgagggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
1441 tga

```

FIG. 2B

```

1   MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGTSVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY
61  WEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI
121 SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTS SDHQVLS
181 GKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELV IPELPLAHPN
241 ERTRGDPEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
301 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
361 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
421 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

FIG. 3A

```

1      attcggctcg agggcgactg agccaggctg ggccgcgtcc ctgagtccca
51     gagtcggcgc ggcgcggcag gggcagcctt ccaccacggg gagcccagct
101    gtcagccgcc tcacaggaag atgctgcgtc ggccggggcag ccctggcatg
151    ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg
201    agccctggag gtccaggctc ctgaagaccc agtgggtggca ctggtgggca
251    ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg
301    gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca
351    cagctttgct gagggccagg accagggcag cgccatagcc aaccgcacgg
401    ccctcttccc ggacctgctg gcacagggca acgcattccct gaggtgacg
451    cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg
501    ggatttcggc agcgtgcgcg tcagcctgca ggtggccgct ccctactcga
551    agcccagcat gacctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg
601    gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt
651    ctggcaggat gggcagggtg tgccctgac tggcaacgtg accacgtcgc
701    agatggccaa cgagcagggc ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg
751    gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc ctggtgcgca acccgtgct
801    gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag agaagcccca
851    caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggcctagtg
901    ggcaccgatg ccacctgcg ctgtctcttc tccccgagc ctggcttcag
951    cctggcacag ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg
1001   tgcacagttt caccgaagge cgggaccagg gcagcgctta tgccaaccgc
1051   acggccctct tcccggacct gctggcacia ggcaatgcat ccctgaggct
1101   gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc ttcgtgagca
1151   tccgggattt cggcagcgtc gccgtcagcc tgcagggtggc cgctccctac
1201   tcgaagccca gcatgacctt ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga
1251   cacggtgacc atcacgtgct ccagctaccg gggctacctt gaggtgagg
1301   tgttctggca ggatgggcag ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg
1351   tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt gatgtgcaca gcgtcctgcg
1401   ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg cgcaaccccg
1451   tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatacacagg gcagcctatg
1501   acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct
1551   cattgcactg ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac
1601   agagctgtga ggaggagaat gcaggagctg aggaccagga tggggaggga
1651   gaaggctcca agacagccct gcagcctctg aaacactctg acagcaaaga
1701   agatgatgga caagaaatag cctgacctg aggaccaggg agctgctacc
1751   cctccctaca gctcctacce tctggctgca atggggctgc actgtgagcc
1801   ctgcccccaa cagatgcata ctgctctgac aggtgggctc cttctccaaa
1851   ggatgcgata cacagaccac tgtgcagcct tatttctcca atggacatga
1901   tteccaagtc atcctgctgc ctttttctt atagacacaa tgaacagacc
1951   acccacaacc ttagttctct aagtcattct gcctgctgcc ttatttcaca
2001   gtacatacat ttcttaggga cacagtacac tgaccacatc accacctct

```

FIG. 3A (CONTINUACIÓN)

```

2051  tcttccagtg  ctgcgtggac  catctggetg  ccttttttct  ccaaaagatg
2101  caatattcag  actgactgac  cccctgcctt  atttcaccaa  agacacgatg
2151  catagtcacc  ccggccttgt  ttctccaatg  gccgtgatac  actagtgatc
2201  atgttcagcc  ctgcttccac  ctgcatagaa  tcttttcttc  tcagacaggg
2251  acagtgcggc  ctcaacatct  cctggagtct  agaagctgtt  tcctttcccc
2301  tccttcctcc  tcttgctcta  gccttaatac  tggccttttc  cctccctgcc
2351  ccaagtgaag  acagggcact  ctgcgcccac  cacatgcaca  gctgtgcatg
2401  gagacctgca  ggtgcacgtg  ctggaacacg  tgtggttccc  ccctggccca
2451  gcctcctctg  cagtgcctct  ctccctgcc  catcctcccc  acggaagcat
2501  gtgctggtca  cactggttct  ccaggggtct  gtgatggggc  ccctgggggt
2551  cagcttctgt  ccctctgctt  tctcacctct  ttgttccttt  cttttcatgt
2601  atccattcag  ttgatgttta  ttgagcaact  acagatgtca  gcaactgtgt
2651  aggtgctggg  ggccctgcgt  gggaagataa  agttcctccc  tcaaggactc
2701  cccatccagc  tgggagacag  acaactaact  aactgcacc  ctgcggtttg
2751  cagggggctc  ctgcctggct  ccctgctcca  cacctcctct  gtggctcaag
2801  gcttcctgga  tacctacccc  ccatccccc  cataattctt  acccagagca
2851  tgggggtggg  gcggaacct  ggagagaggg  acatagcccc  tcgccacggc
2901  tagagaatct  ggtggtgtcc  aaaatgtctg  tccaggtgtg  ggcaggtggg
2951  caggcaccaa  ggccctctgg  acctttcata  gcagcagaaa  aggcagagcc
3001  tggggcaggg  cagggccagg  aatgctttgg  ggacaccgag  gggactgccc
3051  cccaccccca  ccattggtgct  attctggggc  tggggcagtc  ttttcctggc
3101  ttgcctctgg  ccagctcctg  gcctctggta  gagtgagact  tcagacgttc
3151  tgatgccttc  cggatgtcat  ctctccctgc  cccaggaatg  gaagatg

```

FIG. 3B

```

1   MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
51  SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
101 AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
151 PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
201 LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ
251 VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
301 RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
351 AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDQD
401 GVPLTGNTTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
451 GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEN
501 AGAEDQDGEQ EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA

```

FIG. 3C

```

1   atgctgcgtc ggcggggcag cccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc
51  cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc
101 ctgaagaccc agtgggtggca ctggtgggca ccgatgccac cctgcgctgc
151 tccttctccc ccgagcctgg cttcagcctg gcacagctca acctcatctg
201 gcagctgaca gacaccaaac agctggtgca cagtttcacg gaaggccggg
251 accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg cctcttccc ggacctgctg
301 gcacaaggca atgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga
351 gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccc
401 tcagcctgca ggtggccgct ccctactcga agcccagcat gacctggag
451 cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg gtgaccatca cgtgctccag
501 ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat gggcagggtg
551 tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
601 ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac
651 ctacagctgc ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct
701 ctgtcaccat cacagggcag cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg
751 gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt gcactgctgg tggccctggc
801 ttctgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag gagaatgcag
851 gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag
901 cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcctg
951 a

```

FIG. 3D

```

1      MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLRC
51     SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFT EGRDQGSAYA NRTALFPDLL
101    AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFF SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
151    PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
201    LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
251    VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEGSKTALQ
301    PLKHSDSKED DGQEIA*
    
```

FIG. 3E

```

1   atgctgcgtc ggcgggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc
51  cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc
101 ctgaagaccc agtgggtggca ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc
151 tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg gcacagctca acctcatctg
201 gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct gagggccagg
251 accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg
301 gcacaaggca atgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga
351 gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccc
401 tcagcctgca ggtggccgct ccctaetega agcccagcat gacctggag
451 cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg gtgaccatca cgtgctccag
501 ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat gggcaggggtg
551 tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
601 ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac
651 ctacagctgc ctggtgcgca acccgtgct gcagcaggat gcgcacggct
701 ctgtcaccat cacagggcag cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg
751 gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt gcactgctgg tggccctggc
801 tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag gagaatgcag
851 gagctgagga ccaggatggg gagggagaaa gctccaagac agccctgcag
901 cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcctga

```

FIG. 3F

```
1   MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
51  SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
101 AQGNASLRLO RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
151 PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
201 LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
251 VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGESSKTALQ
301 PLKHSDSKED DGQEIA
```

FIG. 4A

```

1   atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc
51  cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtec
101 ctgaagaccc agtgggtggca ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc
151 tectttctccc ctgagcctgg cttcagcctg gcacagctca acctcatctg
201 gcagctgaca gataccaaac agctgggtgca cagctttgct gagggccagg
251 accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg
301 gcacagggca acgcatccct gaggtgcag cgctgctgtg tggcgagcga
351 gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccc
401 tcagcctgca ggtggccgct ccctactcga agcccagcat gacctggag
451 cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg gtgaccatca cgtgctccag
501 ctaccagggc taccctgagg ctgagggtgt ctggcaggat gggcagggtg
551 tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
601 ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac
651 ctacagctgc ctggtgcgca acccgtgct gcagcaggat gcgcacagct
701 ctgtcaccat cacaccccag agaagcccca caggagccgt ggaggctccag
751 gtccctgagg acccgggtgt ggccctagt ggcaccgat ccacctgcg
801 ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag ctcaacctca
851 tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc
901 cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct
951 gctggcacaa ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg
1001 acgagggcag cttcacctgc ttctgtgagca tccgggattt cggcagcgt
1051 gccgtcagcc tgcagggtggc cgctccctac tccaagccca gcatgacctt
1101 ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc atcacgtgct
1151 ccagctaccg gggctaccct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag
1201 ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca
1251 gggcttgttt gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtgggtgctg ggtgcgaatg
1301 gcacctacag ctgcctggtg cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac
1351 ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg acattcccc cagaattcga
1401 gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg
1451 aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac
1501 acctcatga tctcccgac ccctgaggte acatgcgtgg tgggtggacgt
1551 gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg
1601 aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg
1651 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg
1701 caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg
1751 agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac
1801 acctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac
1851 ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga
1901 gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac
1951 tcogacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag
2001 gtggcagcag gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc
2051 acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga

```

FIG. 4B

```

1  MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
51  SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDOGSAYA NRTALFPDLL
101 AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
151 PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
201 LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ
251 VPEDFVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTBG
301 RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
351 AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDGO
401 GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
451 GSVTITGQPM TFPPEFEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
501 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
551 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
601 TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
651 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

FIG. 5A

```

1  gctttcgtca gttcctcaga actagttctg gtttgactca ctctcatggt
51  acggcaaaacc ttaagctgaa tgaacaactt ttctttctctt gaatatatct
101 taacgccaaa ttttgagtgc ttttttggtta cccatcctca tatgtcccag
151 ctggaaagaa tcctgggttg gagctactgc atgttgattg ttttggtttt
201 ctttttggtt gttcattttg gtggctacta taaggaaatc taacacaaac
251 agcaactggt ttttggtgtt tacttttgca tctttacttg tggagctgtg
301 gcaagtcctc atatcaaata cagaacatga tcttcctcctt gctaagtgtg
351 agcctggaat tgcagcttca ccagatagca gctttattca cagtgcaggt
401 ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg accctggaat
451 gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagcaggt
501 ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt
551 gctggaggag cagctgcccc tagggaaggc ctcgttccac atacctcaag
601 tccaagtgag ggacgaagga cagtaccaat gcataatcat ctatgggggtc
651 gcctgggact acaagtacct gactctgaaa gtcaaagctt cctacaggaa
701 aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag gtgagctca
751 cctgccaggc tacaggttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc
801 agcgttcctg ccaacaccag ccactccagg acccctgaag gcctctacca
851 ggtcaccagt gttctgcgcc taaagccacc ccctggcaga aactctagct
901 gtgtgttctg gaatactcac gtgagggaac ttactttggc cagcattgac
951 cttcaaagtc agatggaacc caggacccat ccaacttggc tgcttcacat
1001 ttcatccccc tcctgcatac ttgctttcat ttcatagcc acagtgatag
1051 ccctaagaaa acaactctgt caaaagctgt attcttcaaa agacacaaca
1101 aaaagacctg tcaccacaac aaagagggaa gtgaacagtg ctatctgaac
1151 ctgtggtctt gggagccagg gtgacctgat atgacatcta aagaagcttc
1201 tggactctga acaagaattc ggtggcctgc agagcttgcc atttgcactt
1251 ttcaaatgcc tttggatgac ccagcacttt aatctgaaac ctgcaacaag
1301 actagccaac acctggccat gaaacttgcc ccttcactga tctggactca
1351 cctctggagc ctatggcttt aagcaagcac tactgcactt tacagaatta
1401 cccactgga tcctggaccc acagaattcc ttcaggatcc ttcttgctgc
1451 cagactgaaa gcaaaaggaa ttatttcccc tcaagttttc taagtgattt
1501 ccaaaagcag aggtgtgtgg aaatttccag taacagaaac agatgggttg
1551 ccaatagagt tattttttat ctatagcttc ctctgggtac tagaaggaggc
1601 tattgagact atgagctcac agacagggct tcgcacaaac tcaaatcata
1651 attgacatgt tttatggatt actggaatct tgatagcata atgaagtgtt
1701 tctaattaac agagagcatt taaatataca ctaagtgcac aaattgtgga
1751 gtaaagtcac caagctctgt ttttgaggtc taagtcacaa agcatttgtt
1801 ttaacctgta atggcaccat gtttaatggg gggttttttt ttgaactaca
1851 tctttccttt aaaaattatt gggttctttt tatttggttt taccttagaa
1901 atcaattata tacagtcaaa aatatttgat atgctcatac gttgtatctg
1951 cagcaatttc agataagtag ctaaaatggc caaagcccca aactaagcct
2001 ccttttctgg ccctcaatat gactttaaat ttgacttttc agtgccctcag
2051 tttgcacatc tgtaatacag caatgctaag tagtcaaggc ctttgataat
2101 tggcactatg gaaatcctgc aagatcccac tacatatgtg tggagcagaa
2151 gggtaactcg gctacagtaa cagcttaatt ttgttaaatt tggttcttat
2201 actggagcca tgaagctcag agcattagct gacccttgaa ctattcaaat
2251 gggcacatta gctagtataa cagacttaca taggtgggac taaagcaagc
2301 tccttaactg agcaaaattt ggggcttatg agaatgaaag ggtgtgaaat
2351 tgactaacag acaaatcata catctcagtt tctcaattct catgtaaatc
2401 agagaatgcc tttagaaatt accaaagtgt tccat

```

FIG. 5B

1	MIFLLLMLSL	ELQLHQIAAL	FTVTVPKELY	IIEHGSNVTL	ECNFDTGSHV
51	NLGAITASLQ	KVENDTSPHR	ERATLLEEQL	PLGKASFHIP	QVQVRDEGQY
101	QCIIIIYGVAV	DYKYLTCLKVK	ASRKINTHI	LKVPETDEVE	LTCQATGYPL
151	AEVSWPNVSV	PANTSHSRTP	EGLYQVTSVL	RLKPPPGRNF	SCVFWNTHVR
201	ELTLASIDLQ	SQMEPRTHPT	WLLHIFIPSC	IIAFIFIATV	IALRKQLCQK
251	LYSSKDTTKR	PVTTTKREVN	SAI*		

FIG. 6A

```

1  atgatcttcc tcttgcta at gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat
51 agcagcttta ttcacagtga cagtccttaa ggaactgtac ataatagagc
101 atggcagcaa tgtgaccctg gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg
151 aaccttggag caataacagc cagtttgcaa aaggtggaaa atgatacatc
201 cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg cccctagggg
251 aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac
301 caatgcataa tcatctatgg ggtcgctgg gactacaagt acctgactct
351 gaaagtcaaa gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc ctaaagggtc
401 cagaaacaga tgaggtagag ctacacctgc aggctacagg ttatcctctg
451 gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt cctgccaa caagccactc
501 caggacccct gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg cgcctaaagc
551 caccctctgg cagaaacttc agctgtgtgg tctggaatac tcacgtgagg
601 gaacttactt tggccagcat tgacctcaa agtcagatgg aaccaggagc
651 cgaattcgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc
701 cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa
751 cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggg
801 ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagtccaac tggtagctgg
851 acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac
901 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcttgc accaggactg
951 gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag
1001 ccccatcgga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
1051 caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt
1101 cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg
1151 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc
1201 gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga
1251 caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg
1301 aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
1351 aaatga

```

FIG. 6B

```
1  MIFLLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV
51  NLGAITASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY
101 QCIIIYGVAW DYKYLTLKVK ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL
151 AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL RLKPPPGRNF SCVVWNTHVR
201 ELTLASIDLQ SQMEPRTEFE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
251 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
301 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
351 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD LAVEWESNGQ PENNYKTPPP
401 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
451 K*
```

FIG. 7A

```

1   agcttttcaa tgtgaccagc acactgagaa tcaacacaac aactaatgag
51  atttttctact gcacttttag gagattagat cctgaggaaa accatacagc
101 tgaattggtc atcccagaac tacctctggc acatcctcca aatgaaagga
151 ctcacttggt aattctggga gccatcttat tatgccttgg ttagcactg
201 acattcatct tccgtttaag aaaagggaga atgatggatg tgaaaaaatg
251 tggcatccaa gatacaaaact caaagaagca aagtgataca catttggagg
301 agacgtaatc cagcattgga acttctgatc ttcaagcagg gattctcaac
351 ctgtgggtta ggggttcacg ggggctgagc gtgacaagag gaaggaatgg
401 gcccgaggga tgcaggcaat gtgggactta aaaggcccaa gcactgaaaa
451 tggaacctgg cgaaacagag gaggagaatg aagaaagatg gagtcaaaca
501 gggagcctgg agggagacct tgatactttc aaatgcctga ggggctcatc
551 gacgcctgtg acagggagaa aggatacttc tgaacaagga gcctccaagc
601 aaatcatcca ttgctcatcc taggaagacg ggttgagaat ccctaatttg
651 agggtcagtt cctgca

```

FIG. 7B

```

1      attcggctcg agggcgactg agccaggctg ggccgcgtcc ctgagtccca
51     gagtcggcgc ggcgcggcag gggcagcctt ccaccacggg gagcccagct
101    gtcagccgcc tcacaggaag atgctgcgtc ggccggggcag ccctggcatg
151    ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg
201    agccctggag gtccaggctc ctgaagaccc agtgggtggca ctggtgggca
251    ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg
301    gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctgggtgca
351    cagctttgct gagggccagg accaggggcag cgcctatgcc aaccgcacgg
401    ccctcttccc ggacctgctg gcacagggca acgcatccct gaggctgcag
451    cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg
501    ggatttcggc agcgtgcgcg tcagcctgca ggtggccgct ccctaactga
551    agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg
601    gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt
651    ctggcaggat gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc
701    agatggccaa cgagcagggc ttgtttgatg tgcacagcat cctgcggggtg
751    gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc ctggtgcgca acccgtgct
801    gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacacccag agaagcccca
851    caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg
901    ggcaccgatg ccacctgcg ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag
951    cctggcacag ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg
1001   tgcacagttt caccgaaggc cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc
1051   acggccctct tcccggacct gctggcacia ggcaatgcat ccctgaggct
1101   gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc ttcgtgagca
1151   tccgggattt cggcagcgtc gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac
1201   tcgaagccca gcatgacctt ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga
1251   cacggtgacc atcacgtgct ccagctaccg gggctacctt gaggtgagg
1301   tgttctggca ggatgggcag ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg
1351   tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt gatgtgcaca gcgtcctgcg
1401   ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg cgcaaccccg
1451   tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg
1501   acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct
1551   cattgcactg ctggtggccc tggcttctgt gtgctggaga aagatcaaac
1601   agagctgtga ggaggagaat gcaggagctg aggaccagga tggggagggga
1651   gaaggctcca agacagccct gcagcctctg aaacactctg acagcaaaga
1701   agatgatgga caagaaatag cctgaccatg aggaccaggg agctgctacc
1751   cctccctaca gctcctacce tctggctgca atggggctgc actgtgagcc
1801   ctgcccccaa cagatgcate ctgctctgac aggtgggctc cttctccaaa
1851   ggatgcgata cacagaccac tgtgcagcct tatttctcca atggacatga
1901   ttcccaagtc atcctgctgc cttttttctt atagacacaa tgaacagacc
1951   accacaaccc ttagttctct aagtcacctt gcctgctgcc ttatttcaca
2001   gtacatacat ttcttaggga cacagtacac tgaccacatc accacctctt
2051   tcttcagtg ctgcgtggac catctggctg cttttttctt ccaaaagatg

```

FIG. 7B (CONTINUACIÓN)

```

2101 caatattcag actgactgac cccctgcctt atttcaccaa agacacgatg
2151 catagtcacc ccggccttgt ttctccaatg gccgtgatac actagtgate
2201 atgttcagcc ctgcttccac ctgcatagaa tcttttcttc tcagacaggg
2251 acagtgcggc ctcaacatct cctggagtct agaagctgtt tcctttcccc
2301 tccttctctc tcttgetcta gccttaatac tggccttttc cctccctgcc
2351 ccaagtgaag acagggcact ctgcgcccac cacatgcaca gctgtgcatg
2401 gagacctgca ggtgcacgtg ctggaacacg tgtggttccc ccctggccca
2451 gcctcctctg cagtgcacct ctcccctgcc catcctcccc acggaagcat
2501 gtgctggtca cactgggtct ccaggggtct gtgatggggc ccctgggggt
2551 cagcttctgt ccctctgcct tctcacctct ttgttctttt cttttcatgt
2601 atccattcag ttgatgttta ttgagcaact acagatgtca gcaactgtgtt
2651 aggtgctggg ggccctgcgt gggaagataa agttcctccc tcaaggactc
2701 cccatccagc tgggagacag acaactaact aactgcacc ctgcggtttg
2751 cagggggctc ctgcctggct ccctgctcca cacctcctct gtggctcaag
2801 gcttcctgga tacctcacc ccattcccacc cataattctt acccagagca
2851 tggggttggg gcggaaacct ggagagaggg acatagcccc tcgccacggc
2901 tagagaatct ggtggtgtcc aaaatgtctg tccaggtgtg ggcaggtggg
2951 caggcaccaa ggccctctgg acctttcata gcagcagaaa aggcagagcc
3001 tggggcaggg cagggccagg aatgctttgg ggacaccgag gggactgccc
3051 cccaccccca ccatggtgct attctggggc tggggcagtc ttttctggc
3101 ttgcctctgg ccagctcctg gcctctggtg gagtgagact tcagacgttc
3151 tgatgccttc cggatgtcat ctctccctgc cccaggaatg gaagatg

```

FIG. 7C

```

1   ccgggggtacc atgatcttcc tcctgctaata gttgagcctg gaattgcagc
51  ttcaccagat agcagcttta ttcacagtga cagtccctaa ggaactgtac
101 ataatagagc atggcagcaa tgtgaccctg gaatgcaact ttgacactgg
151 aagtcattgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa aaggtggaaa
201 atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg
251 cccctaggggaggcctcggt ccacatacct caagtccaag tgagggacga
301 aggacagtac caatgcataa tcattctatgg ggtcgctgg gactacaagt
351 acctgactct gaaagtcaaa gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc
401 cttaaagggttc cagaaacaga tgaggtagag ctcacctgcc aggctacagg
451 ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt cctgccaaca
501 ccagccactc caggaccctt gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg
551 cgcctaaagc caccocctgg cagaaacttc agctgtgtgt tctggaatac
601 tcacgtgagg gaacttactt tggccagcat tgacctcaa agtcagatgg
651 aaccagagac ccatccaact tggctgcttc acattttcat cccctcctgc
701 atcattgctt tcattttcat agccacagtg atagccctaa gaaaacaact
751 ctgtcaaaag ctgtattctt caaaagacac aacaaaaaga cctgtcacca
801 caacaaagag ggaagtgaac agtgctatct gatctagagc gc

```

FIG. 7D

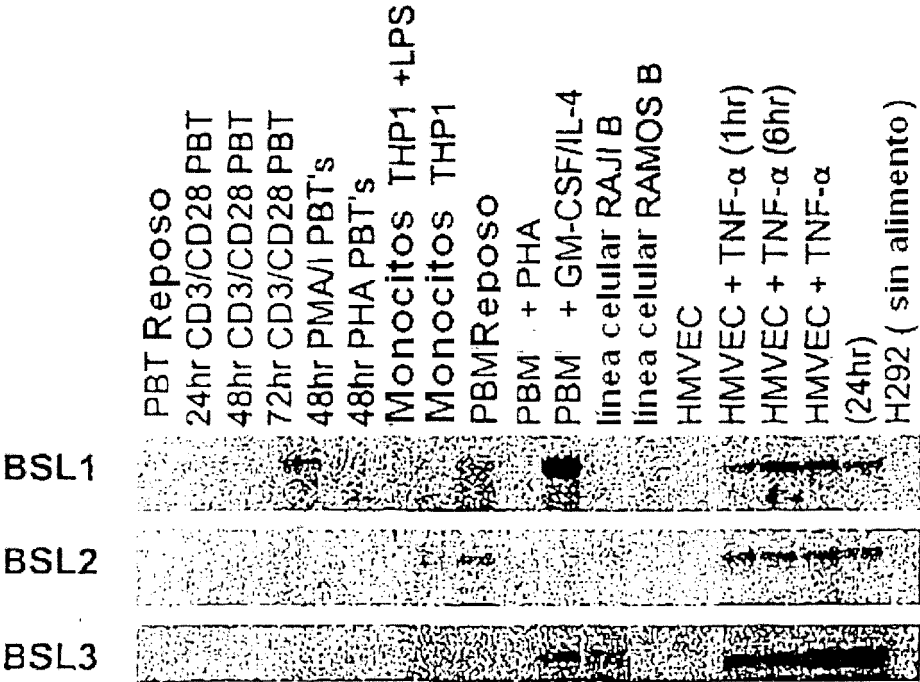


FIG. 7E

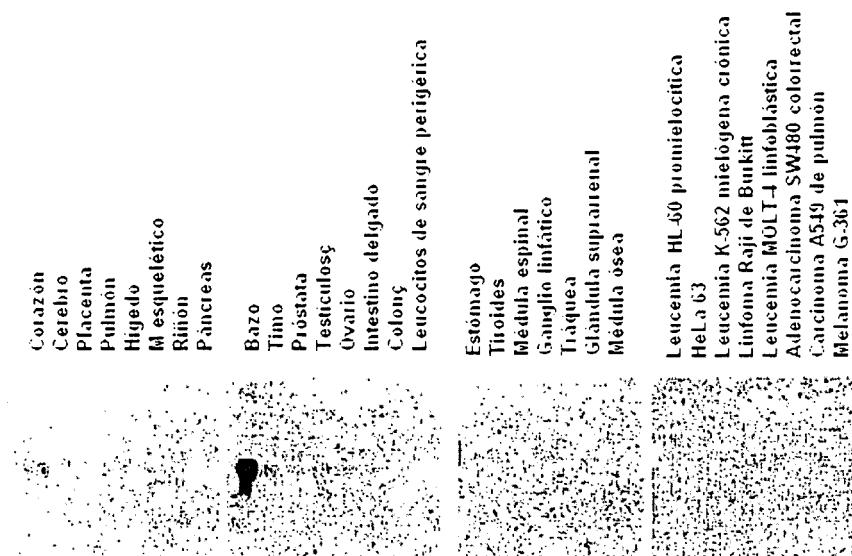
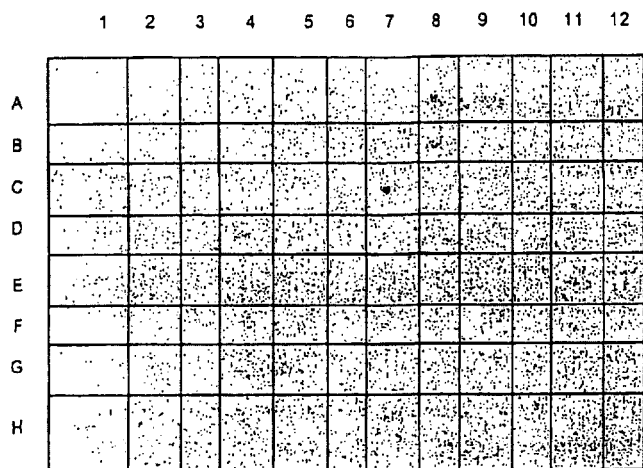
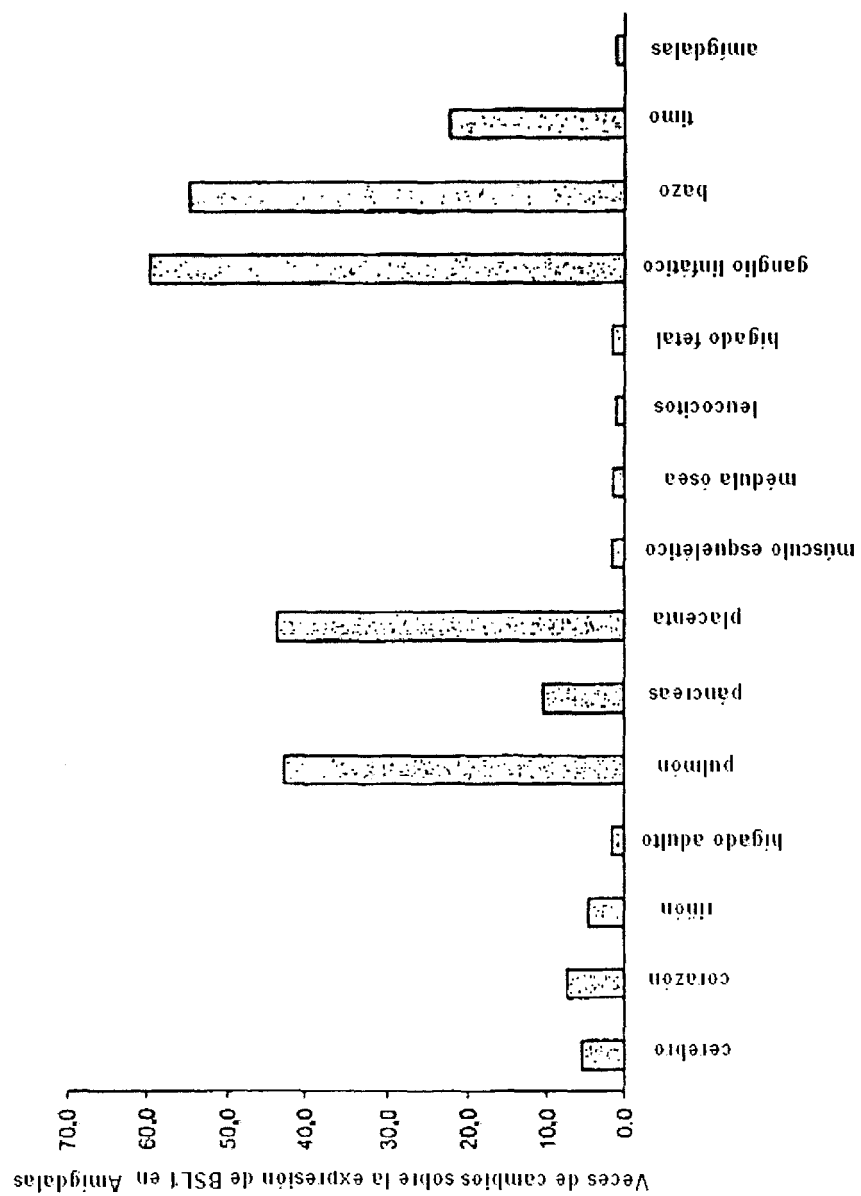


FIG. 7F



A1 = cerebro entero	A5 =esófago	A9 = hígado
B1 = cortex cerebral	B5 = estómago	B9 = páncreas
C1 = lóbulo frontal	C5 = duodeno	C9 = glándula suprarrenal
D1 = lóbulo parietal	D5 = yeyuno	D9 = glándula tiroides
E1 = lóbulo occipital	E5 = ileon	E9 = gándula salivar
F1 = lóbulo temporal	F5 = iloceco	F9 = glándula mamaria
G1 = girus paracental del cortex cerebral	G5 = apéndice	G9 = blanco
H1 = pons	H5 = colon, ascendente	H9 = blanco
A2 = cerebelo, izquierdo	A6 = colon, transverso	A10 = leucemia, HL-60
B2 = cerebelo, derecho	B6 = colon, descendente	B10 = Hela S3
C2 = cuerpo calloso	C6 = recto	C10 = leucemia, K-562
D2 = amígdala	D6 = blanco	D10 = leucemia, MOLT-4
E2 = núcleo caudado	E6 = blanco	E10 = linfoma, raji
F2 = hipocampo	F6 = blanco	F10 = linfoma, Daudi
G2 = médula oblongata	G6 = blanco	G10 = carcinoma colorrectal, SW480
H2 = putamen	H6 = blanco	H10 = carcinoma de pulmón, A549
A3 = sustancia negra	A7 = riñón	A11 = cerebro fetal
B3 = núcleo accumbens	B7 = músculo esquelético	B11 = corazón fetal
C3 = tálamo	C7 = bazo	C11 = riñón fetal
D3 = glándula pituitaria	D7 = timo	D11 = hígado fetal
E3 = médula espinal	E7 = PBI	E11 = bazo fetal
F3 = Blanco	F7 = ganglio linfático	F11 = timo fetal
G3 = Blanco	G7 = médula ósea	G11 = pulmón fetal
H3 = Blanco	H7 = tráquea	H11 = blanco
A4 = Corazón	A8 = pulmón	A12 = ARN total de levadura
B4 = aorta	B8 = placenta	B12 = ARN t de levadura
C4 = atrio, izquierdo	C8 = vejiga	C12 = ARNr de <i>E. coli</i>
D4 = atrio, derecho	D8 = útero	D12 = ADN de <i>E. coli</i>
E4 = ventrículo, izquierdo	E8 = próstata	E12 = poly r(A)
F4 = ventrículo, derecho	F8 = testículos	F12 = ADN C ₆ t-1 humano
G4 = septo intraventricular	G8 = ovarios	G12 = 100 ng de ADN humano
H4 = apex del corazón	H8 = blanco	H12 = 500 ng de ADN humano

FIG. 7G



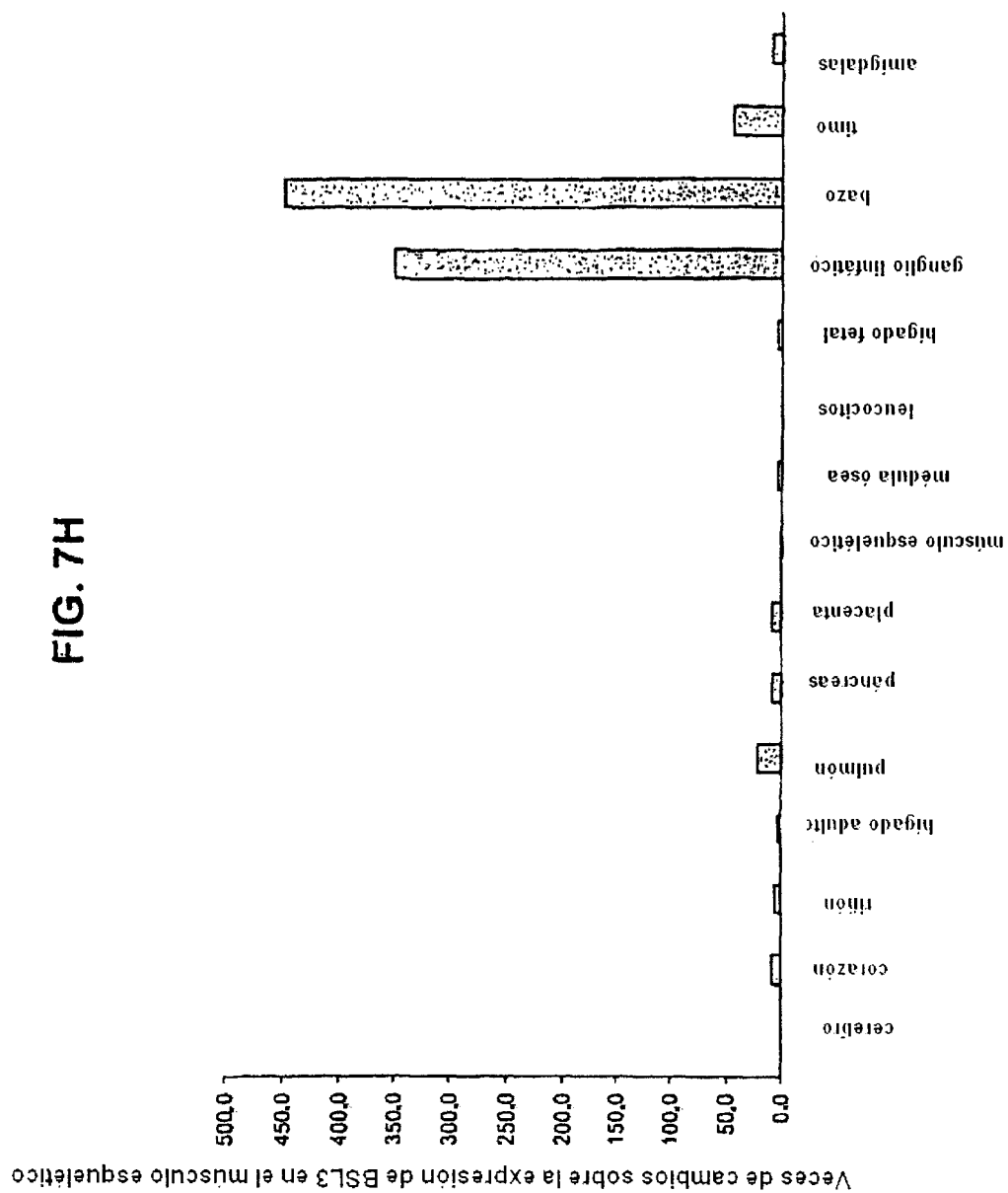
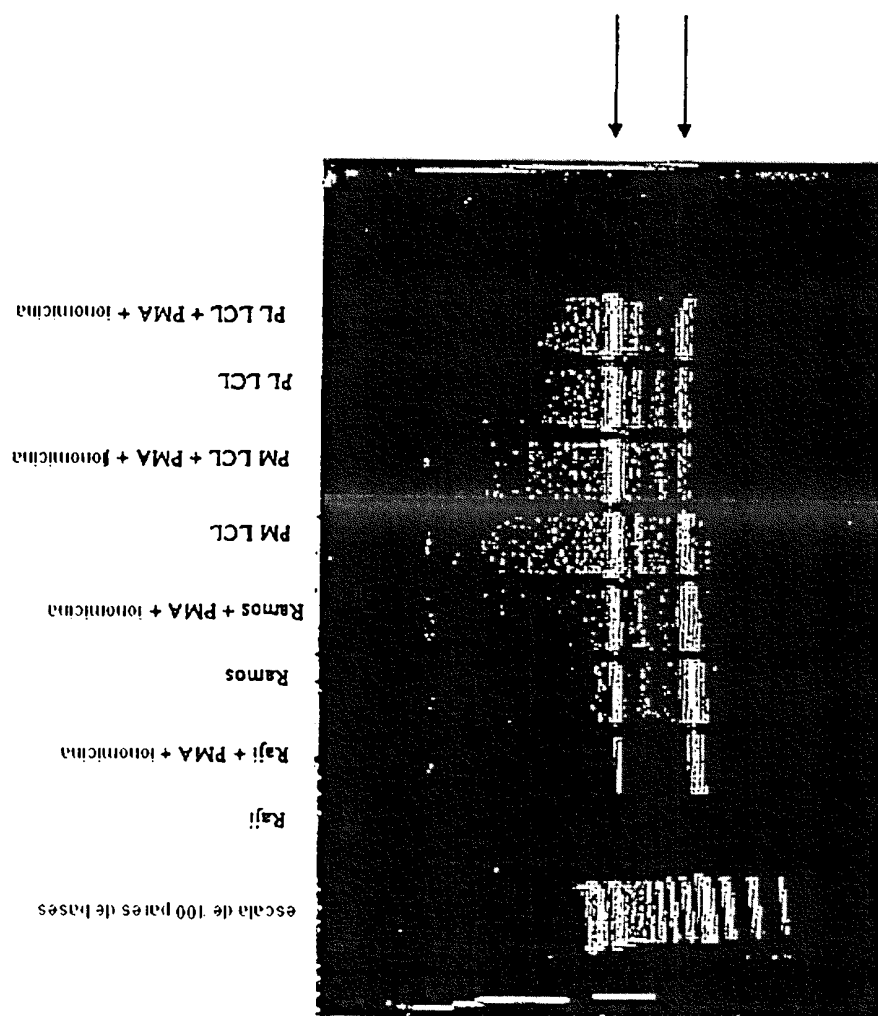
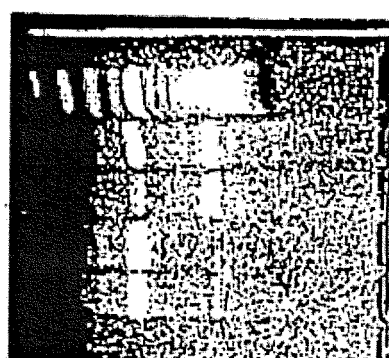


FIG. 8A





escala de 100 pares de bases

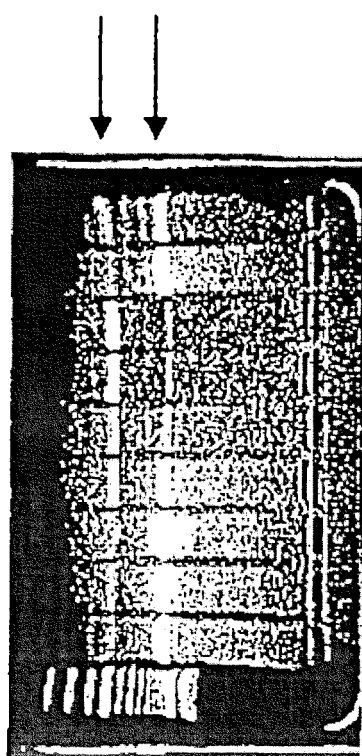
PBT 079 + PMA + ionomicina

PBT 079 + 3x28

PBT 124

PBT 124 + PMA + ionomicina

FIG. 8C



CE LCL

CE LCL + PMA + ionomicina

HL60

HL60 + LPS

Thp1

Thp1 + LPS

HUVEC

HUVEC + TNF alfa 6hr

HUVEC + TNF alfa 24HR

escala de 100 pares de bases

FIG. 8B

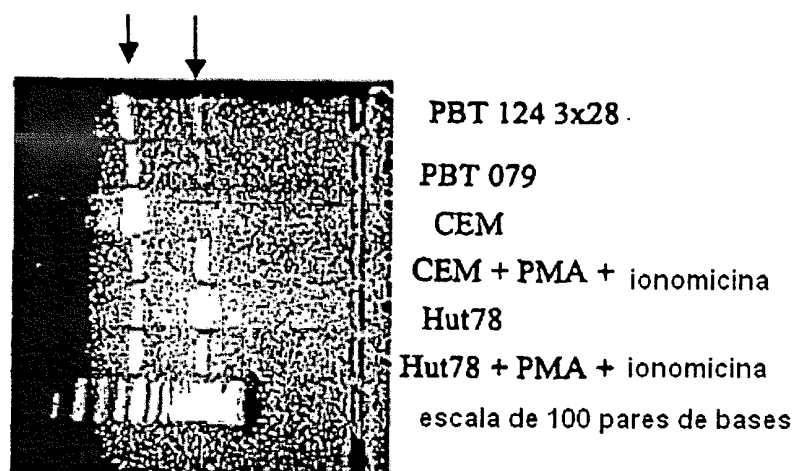


FIG. 8D

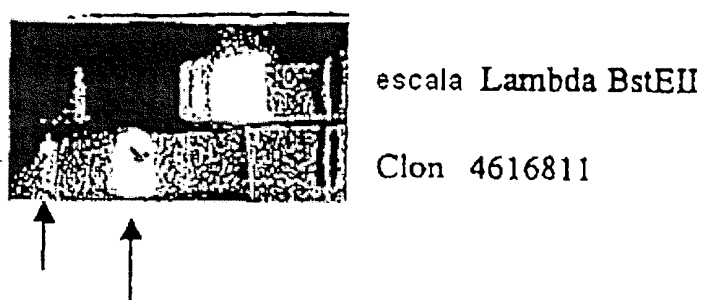


FIG. 8E

FIG. 9A

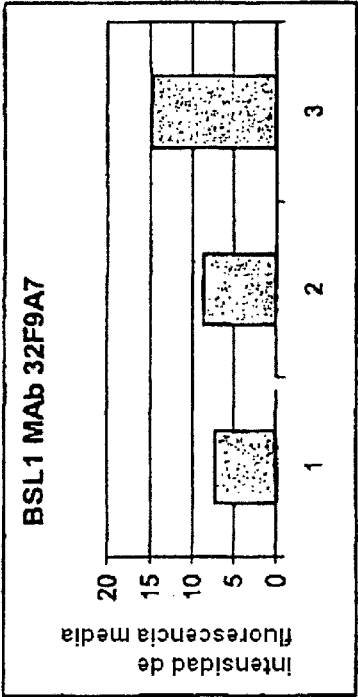


FIG. 9B

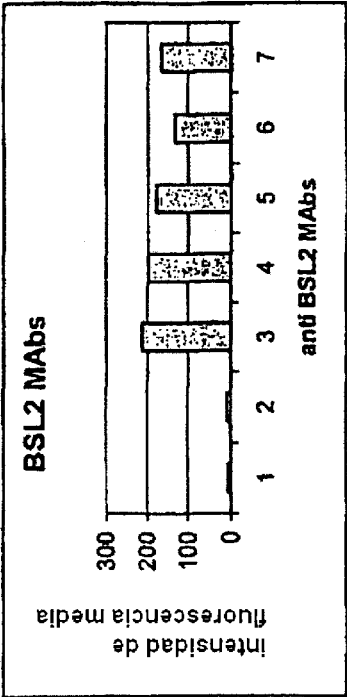


FIG. 9C

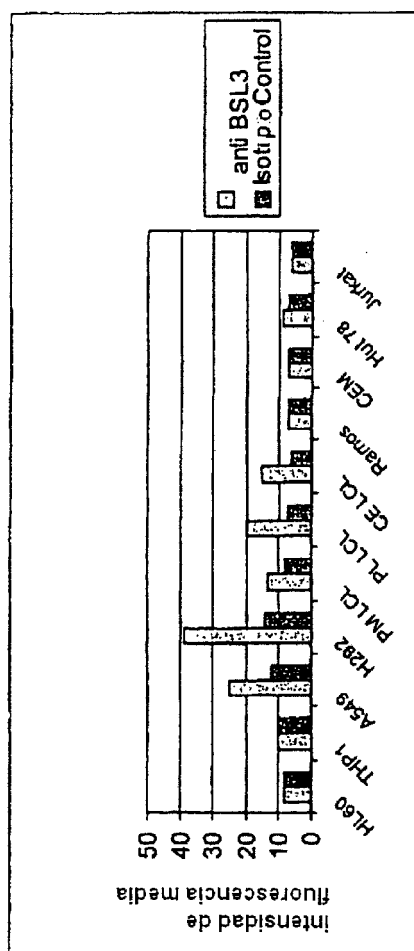


FIG. 9D

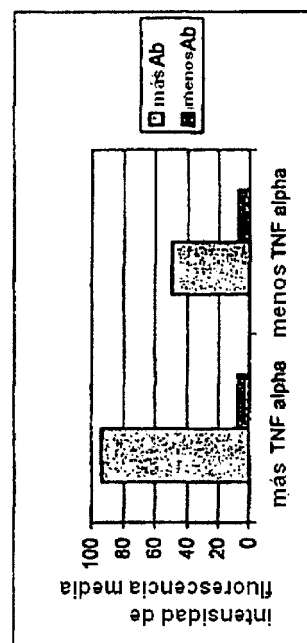


FIG. 9E

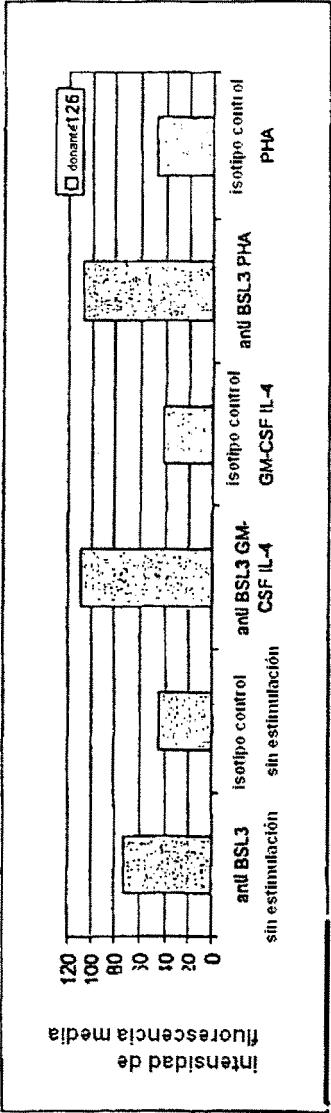


FIG. 9F

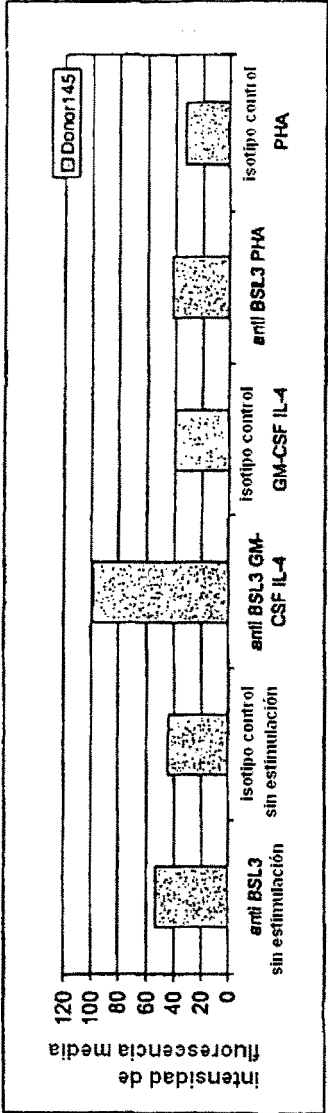


FIG. 10A

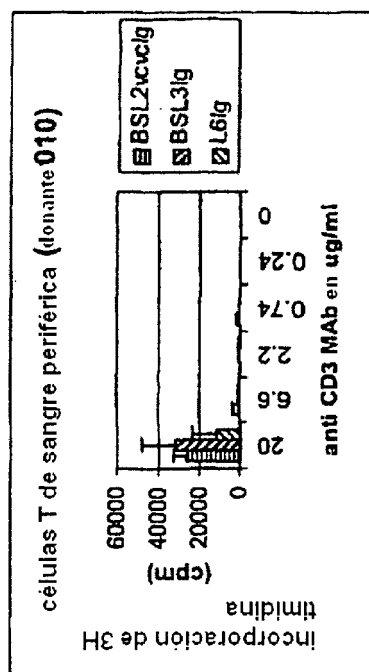


FIG. 10B

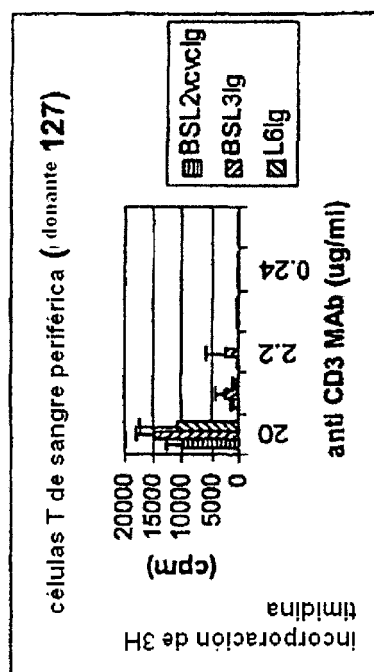


FIG. 10C

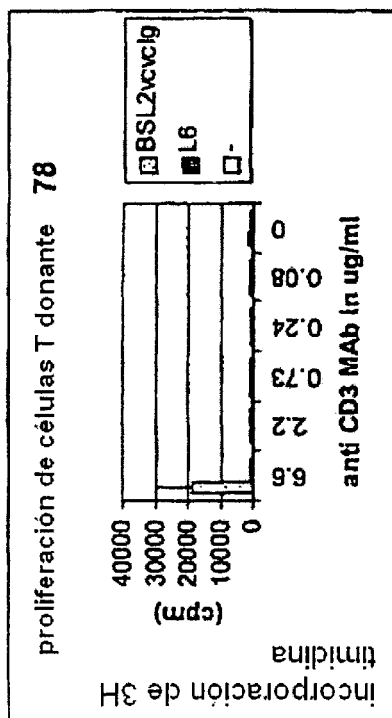


FIG. 10D

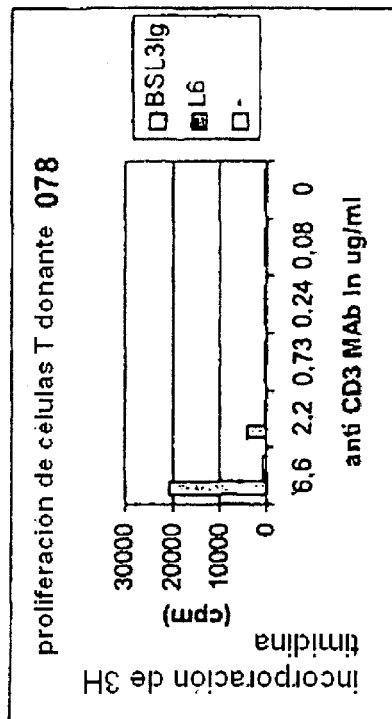


FIG. 10E

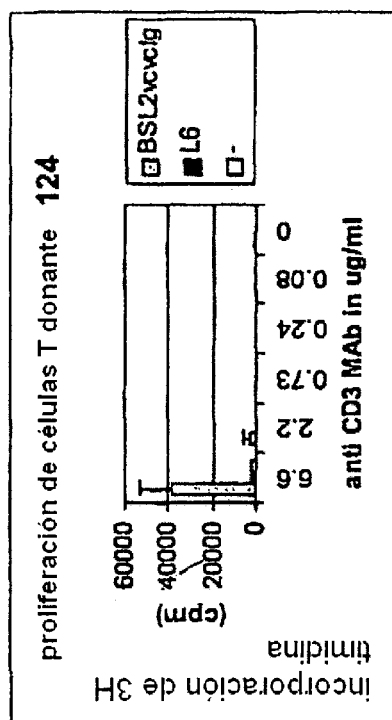


FIG. 10F

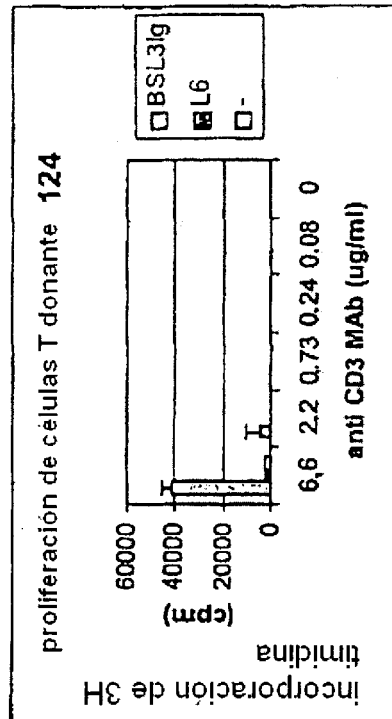


FIG. 10H

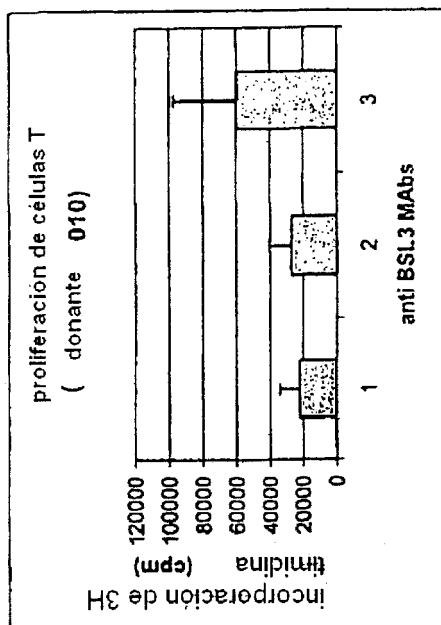


FIG. 10J

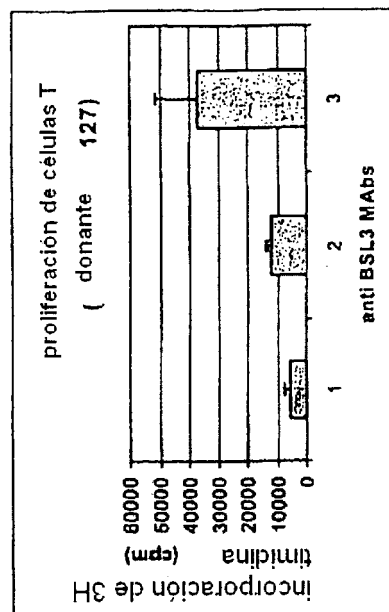


FIG. 10G

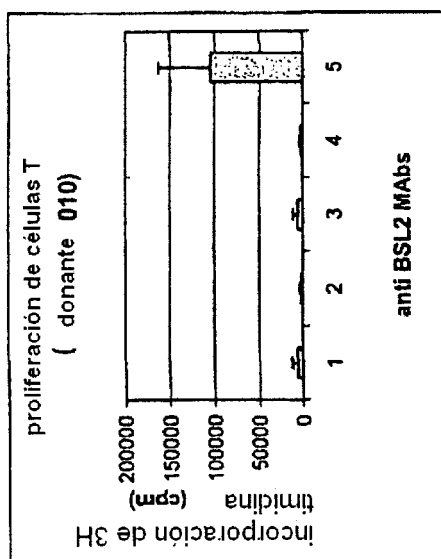
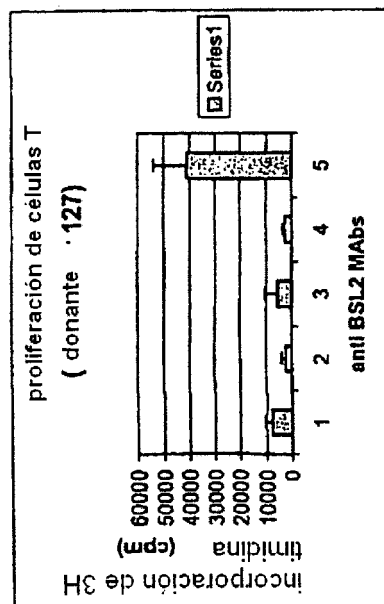


FIG. 10I



ES 2 300 340 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Bristol-Myers Squibb Company
- 5 <120> ÁCIDOS NUCLEICOS Y POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS CON B7 ÚTILES PARA INMUNOMODULACIÓN
- <130> 3053-4071PC1
- 10 <140> PCT/US01/18257
- <141> 2001-06-06
- 15 <150> 60/272,107
- <151> 2001-02-28
- <150> 60/209,811
- 20 <151> 2000-06-06
- <160> 94
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 25 <210> 1
- <211> 1604
- <212> ADN
- 30 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 35 acgcgggggt gcgcgcgcgc cccagttctg cgcagcttcc cgaggctccg caccagccgc 60
- gcttctgtcc gcctgcaggg cattccagaa agatgaggat atttgctgtc tttatatcca 120
- tgacctactg gcatttgctg aacgcattta ctgtcacggg tcccaaggac ctatatgtgg 180
- tagagtatgg tagcaatatg acaattgaat gcaaattccc agtagaaaaa caattagacc 240
- tggctgcact aattgtctat tgggaaatgg aggataagaa cattattcaa tttgtgcatg 300
- 40 gagaggaaga cctgaagggt cagcatagta gctacagaca gagggcccgg ctggtgaagg 360
- accagctctc cctgggaaat gctgcacttc agatcacaga tgtgaaattg caggatgcag 420
- gggtgtaccg ctgcatgac agctatgggt gtgccgacta caagcgaatt actgtgaaag 480
- tcaatgcccc atacaacaaa atcaacaaa gaattttggt tgtggatcca gtcacctctg 540
- 45 aacatgaact gacatgtcag gctgagggt accccaaggc cgaagtcac tggacaagca 600
- gtgaccatca agtcctgagt ggtaagacca ccaccacca ttccaagaga gaggagaagc 660
- ttttcaatgt gaccagcaca ctgagaatca acacaacaac taatgagatt ttctactgca 720
- cttttaggag attagatcct gaggaaaacc atacagctga attggtcac ccagaactac 780
- ctctggcaca tcctccaaat gaaaggactc acttggtaat tctgggagcc atcttattat 840
- 50 gccttggtgt agcactgaca ttcatcttcc gtttaagaaa agggagaatg atggatgtga 900
- aaaaatgtgg catccaagat acaaactcaa agaagcaaa tgatacacat ttggaggaga 960
- cgtaatccag cattggaact tctgatcttc aagcagggat tctcaacctg tggtttaggg 1020
- gttcacgcgg gctgagcgtg acaagaggaa ggaatgggccc cgtgggatgc aggcaatgtg 1080
- ggacttaaaa ggcccaagca ctgaaaatgg aacctgcgaa agcagaggag gagaatgaag 1140
- 55 aaagatggag tcaaacaggg agcctggagg gagacctga tactttcaa tgcctgaggg 1200
- gctcatcgac gcctgtgaca gggagaaagg atacttctga acaaggagcc tccaagcaaa 1260
- tcattccattg ctcatcctag gaagacgggt tgagaatccc taatttgagg gtcagtccct 1320
- gcagaagtgc cctttgcctc cactcaatgc ctcaatttct tttctgcatg actgagagtc 1380
- 60 tcagtgttgg aacgggacag tatttatgta tgagtttttc ctattttatt tgagtctgtg 1440
- aggtcttctt gtcatgtgag tgtggttgtg aatgatttct tttgaagata tattgtagta 1500
- gatgtttacaa ttttgcgcc aaactaaact tgctgcttaa tgatttgctc acatctagta 1560
- aaacatggag tattcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1604
- 65 <210> 2
- <211> 290
- <212> PRT

ES 2 300 340 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

<210> 3

<211> 3600

ES 2 300 340 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 3

	acgcgggggt	gccgcgcggc	cccagttctg	cgcagcttcc	cgaggctccg	caccagccgc	60
	gcttctgtcc	gcctgcaggg	cattccagaa	agatgaggat	atttgcgtgc	tttatattca	120
	tgacctactg	gcatttgctg	aacgcattta	ctgtcacggt	tcccaaggac	ctatatgtgg	180
10	tagagtatgg	tagcaatatg	acaattgaat	gcaaattccc	agtagaaaaa	caattagacc	240
	tggctgcact	aattgtctat	tgggaaatgg	aggataagaa	cattattcaa	tttgtgcatg	300
	gagagggaaga	cctgaagggt	cagcatagta	gctacagaca	gagggcccg	ctgttgaagg	360
	accagctctc	cctgggaaat	gctgcacttc	agatcacaga	tgtgaaattg	caggatgcag	420
	gggtgtaccg	ctgcatgac	agctatggtg	gtgccgacta	caagcgaatt	actgtgaaag	480
15	tcaatgcccc	atacaacaaa	atcaacaaa	gaatttttgt	tgtggatcca	gtcacctctg	540
	aacatgaact	gacatgtcag	gctgagggtc	accccaaggc	cgaagtcac	tggacaagca	600
	gtgaccatca	agtcctgagt	ggtaagacca	ccaccaccaa	ttccaagaga	gaggagaagc	660
	ttttcaatgt	gaccagcaca	ctgagaatca	acacaacaac	taatgagatt	ttctactgca	720
20	cttttaggag	attagatcct	gaggaaaacc	atacagctga	attggtcac	ccagaactac	780
	ctctggcaca	tcttccaaat	gaaaggactc	acttggtaat	tctgggagcc	atcttattat	840
	gccttggtgt	agcactgaca	ttcatcttcc	gtttaagaaa	agggagaatg	atggatgtga	900
	aaaaatgtgg	catccaagat	acaaactcaa	agaagcaaag	tgatacacat	ttggaggaga	960
	cgtaatccag	cattggaact	tctgatcttc	aagcagggat	tctcaacctg	tggtttaggg	1020
25	gttcatcggg	gctgagcgtg	acaagaggaa	ggaatgggcc	cgtgggatgc	aggcaatgtg	1080
	ggacttaaaa	ggcccaagca	ctgaaaatgg	aacctgcgaa	agcagaggag	gagaatgaag	1140
	aaagatggag	tcaaacaggg	agcctggagg	gagaccttga	tactttcaaa	tgcctgaggg	1200
	gctcatcgac	gcctgtgaca	gggagaaagg	atacttctga	acaaggagcc	tccaagcaaa	1260
	tcatccattg	ctcatcctag	gaagacgggt	tgagaatccc	taatttgagg	gtcagttcct	1320
30	gcagaagtgc	cctttgcctc	cactcaatgc	ctcaatttct	tttctgcatg	actgagagtc	1380
	tcagtgttgg	aacgggacag	tatttatgta	tgagtttttc	ctatttattt	tgagtctgtg	1440
	aggtcttctt	gtcatgtgag	tgtggttgtg	aatgatttct	tttgaagata	tattgtagta	1500
	gatgttacia	ttttgtcgcc	aaactaaact	tgctgcttaa	tgatttgctc	acatctagta	1560
35	aaacatggag	tatttgtaag	gtgcttggtc	tctctataaa	ctacaagtat	acattggaag	1620
	cataaagatc	aaaccgttgg	ttgcatagga	tgtcaccttt	atttaaccca	ttaatactct	1680
	ggttgacctt	atcttattct	cagacctcaa	gtgtctgtgc	agtatctgtt	ccatttaaat	1740
	atcagcttta	caattatgtg	gtagcctaca	cacataatct	catttcatcg	ctgtaaccac	1800
	cctgttgtga	taaccactat	tattttaccc	atcgtacagc	tgagggaagca	aacagattaa	1860
40	gtaacttgcc	caaaccagta	aatagcagac	ctcagactgc	caccactgtg	ccttttataa	1920
	tacaattttac	agctatatatt	tactttaagc	aattctttta	ttcaaaaacc	atttattaag	1980
	tgcccttgca	atatcaatcg	ctgtgccagg	cattgaaatc	acagatgtga	gcaagacaaa	2040
	gtacctgtcc	tcaaggagct	catagtataa	tgaggagatt	aacaagaaaa	tgtattatta	2100
	caatttagtc	cagtgtcata	gcataaggat	gatgcgaggg	gaaaaccoga	gcagtgttgc	2160
45	caagaggagg	aaataggcca	atgtggtctg	ggagcgttgg	atatacttaa	acattttaa	2220
	aatcagagta	attttcattt	acaaagagag	gtcgttactt	aaaataaccc	tgaaaaataa	2280
	cactggaatt	ccttttctag	cattatattt	attcctgatt	tgcctttgcc	atataatcta	2340
	atgcttgttt	atatagtgtc	tggatattgt	taacagttct	gtcttttcta	tttaaatgcc	2400
	actaaatttt	aaattcatac	ctttccatga	ttcaaaattc	aaaagatccc	atgggagatg	2460
50	gttggaataa	ctccacttca	tcttccaagc	cattcaagtt	tctttccag	aagcaactgc	2520
	tactgccttt	cattcatatg	ttcttctaaa	gatagtctac	atttggaat	gtatgttaaa	2580
	agcacgtatt	tttaaaattt	ttttcctaaa	tagtaacaca	ttgtatgtct	gctgtgtact	2640
	ttgetatttt	tatttatatt	agtgtttctt	atatagcaga	tggaatgaat	ttgaagttcc	2700
55	cagggtcag	gatccatgcc	ttctttgttt	ctaagttatc	tttcccatag	cctttcatta	2760
	tctttcata	gatccagtat	atgttaataa	tgtcctacat	atacatttag	acaaccacca	2820
	tttgttaagt	atttgcctta	ggacagagtt	tggatttgtt	tatgtttgct	caaaaggaga	2880
	cccatgggct	ctccagggtg	cactgagtc	atctagtctt	aaaaagcaat	cttattatta	2940
	actctgtatg	acagaatcat	gtctggaact	tttgttttct	gctttctgtc	aagtataaac	3000
60	ttcaactttga	tgtgttactt	gcaaaatcac	attttctttc	tggaaattcc	ggcagtgatc	3060
	cttgaactgct	agctaccctg	tgcacagaaa	gcttcattcg	ttgtgcttga	acccttgaat	3120
	gocaccagct	gtcatcacta	cacagccctc	ctaagaggct	tcttgagggt	ttcgagattc	3180
	agatgccctg	ggagatccca	gagtttctct	tccctcttgg	ccatattctg	gtgtcaatga	3240
	caaggagtag	cttggctttg	ccacatgtca	aggetgaaga	aacagtgtct	ccaacagagc	3300
65	tccttgttat	ctgtttgtac	atgtgcattt	gtacagtaat	tgggtgtgaca	gtgttctttg	3360

ES 2 300 340 T3

```

tgtgaattac aggcaagaat tgttggtgag caaggcacat agtctactca gtctattcct 3420
aagtcctaac tcctccttgt ggtgttgat ttgtgaaggca ctttatccct ttgttctcat 3480
gtttcatcgt aaatggcata ggcagagatg atacctaatt ctgcatttga ttgtcacttt 3540
ttgtacctgc attaatttaa taaaatattc ttattttattt tgttacttgg taaaaaaaaa 3600

```

<210> 4

<211> 1443

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción de fusión sintética

<400> 4

```

atgccatgg ggtctctgca accgctggcc accttgtacc tgcctgggat gctggctcgt 60
tcctgcctcg gaactagtgt tcccaaggac ctatatgtgg tagagtatgg tagcaatatg 120
acaattgaat gcaaattccc agtagaaaaa caattagacc tggctgcact aattgtctat 180
tggaagtgg aggataagaa cattattcaa ttgtgcatg gagaggaaga cctgaagggt 240
cagcatagta gctacagaca gagggcccg ctgttgaagg accagctctc cctgggaaat 300
gctgcacttc agatcacaga tgtgaaattg caggatgcag ggtgtaccg ctgcattgat 360
agctatggtg gtgccgacta caagcgaatt actgtgaaag tcaatgcccc atacaacaaa 420
atcaacaaaa gaattttggt tgtggatcca gtcacctctg aacatgaact gacatgtcag 480
gctgagggct accccaaggc cgaagtcac tggacaagca gtgaccatca agtcctgagt 540
ggtaagacca ccaccaccaa ttccaagaga gaggagaagc ttttcaatgt gaccagcaca 600
ctgagaatca acacaacaac taatgagatt ttctactgca cttttaggag attagatcct 660
gaggaaaacc atacagctga atttggtcac ccagaactac ctctggcaca tcctccaaat 720
gaaaggactc gaggagatcc cgaggagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca 780
ccgtgcccg cactgaact cctgggggga ccgtcagctc tcctcttccc cccaaaaccc 840
aaggacaccc tcattgatctc ccggaccctc gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 900
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 960
aagacaaaag cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1020
gtcctgcacc aggaactggc gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1080
ctccagccc ccacgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1140
gtgtacacc tgcccccac ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1200
ctgggtcaaa gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1260
gagaacaact acaagaccac gctcccggtg ctggactccg acggtcctt ctctctctac 1320
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg 1380
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1440
tga

```

<210> 5

<211> 480

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción de fusión sintética

<400> 5

```

Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly
1           5           10           15
Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly Thr Ser Val Pro Lys Asp Leu Tyr
20           25           30
Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val
35           40           45

```

ES 2 300 340 T3

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

ES 2 300 340 T3

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 370 375 380

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 385 390 395 400

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 405 410 415

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 420 425 430

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 435 440 445

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 450 455 460

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475 480

<210> 6

<211> 3197

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

attcggtctg agggcgactg agccaggctg ggccgcgtcc ctgagtccca gagtccggcg 60
 ggccgcggcag gggcagcctt ccaccacggg gagcccagct gtcagccgcc tcacaggaag 120
 atgctgctgc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 180
 ctgtggttct gcttcacagg agccctggag gtccaggctc ctgaagaccc agtggtggca 240
 ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tcttctctcc ctgagcctgg cttcagcctg 300
 gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 360
 gaggggcagg accagggcag cgcttatgcc aaccgcacgg cctcttctcc ggacctgctg 420
 gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 480
 acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccg tcagcctgca ggtggccgct 540
 ccctactcga agccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 600
 gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 660
 gggcaggggtg tgcctctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 720
 ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 780
 ctggtgcgca acccgtgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 840
 agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg 900
 ggcaccgatg ccacctgctg ctgtctcttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 960
 ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 1020
 cgggaccagg gcagcgccca tgcgaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcaca 1080
 ggcaatgcat cctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1140
 ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtc cgcgtcagcc tgcaggtggc cgtccctac 1200
 tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga caccgtgacc 1260
 atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag 1320
 ggtgtgcgcc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttggtt 1380
 gatgtgcaca gcgtcctgct ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1440
 cgcaaccccc tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1500
 acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1560
 ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1620
 gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1680
 aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgacctg aggaccaggg 1740
 agctgtaccc cctccctaca gctcctaccc tctggctgca atggggctgc actgtgagcc 1800
 ctgcccccaa cagatgcac ctgctctgac aggtgggctc ctctccaaa ggatgcgata 1860
 cacagaccac tgtgcagcct ttttctcca atggacatga ttcccaagtc atcctgctgc 1920
 cttttttctt atagacacaa tgaacagacc acccacaacc ttagttctct aagtcacct 1980

ES 2 300 340 T3

```

gectgctgcc ttatttcaca gtacatacat ttcttaggga cacagtacac tgaccacatc 2040
accaccctct tcttccagtg ctgcgtggac catctggctg ccttttttct ccaaaagatg 2100
caatattcag actgactgac cccctgcctt atttcaccaa agacacgatg catagtcacc 2160
ccggccttgt ttctccaatg gccgtgatac actagtgate atgttcagcc ctgcttccac 2220
5 ctgcatagaa tcttttcttc tcagacaggg acagtgcggc ctcaacatct cctggagtct 2280
agaagctgtt tcctttcccc tecttccctc tcttgctcta gccttaatac tggccttttc 2340
cctccctgcc ccaagtgaag acagggcact ctgcgcccac cacatgcaca gctgtgcatg 2400
gagacctgca ggtgcacgtg ctggaacacg tgtggttccc ccttgcccca gcctcctctg 2460
10 cagtgcacct ctccctgcc catcctcccc acggaagcat gtgctggtca cactggttct 2520
ccaggggtct gtgatggggc ccttggggtt cagcttctgt cctctgcct tctcacctct 2580
ttgttcttct cttttcatgt atccattcag ttgatgttta ttgagcaact acagatgtca 2640
gcactgtgtt aggtgctggg ggccctgcgt gggaaagataa agttcctccc tcaaggactc 2700
cccatccagc tgggagacag acaactaact acactgcacc ctgcgggtttg caggggggtc 2760
15 ctgcctggtt cctgctcca cacctcctct gtggctcaag gcttctgga tacctcacc 2820
ccatccacc cataattctt acccagagca tggggttggg gcggaaacct ggagagagg 2880
acatagcccc tcgccacggc tagagaatct ggtggtgtcc aaaatgtctg tccaggtgtg 2940
ggcaggtggg caggcaccaa ggccctctgg acctttcata gcagcagaaa aggcagagcc 3000
20 tggggcaggg cagggccagg aatgctttgg ggacaccgag gggactgccc cccaccccca 3060
ccatggtgct attctggggt tggggcagtc ttttctggc ttgcctctgg ccagctcctg 3120
gcctctggtg gagtgagact tcagacgttc tgatgccttc cggatgtcat ctctccctgc 3180
cccaggaatg gaagatg 3197

```

```

25 <210> 7
    <211> 534
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
30 <400> 7

```

```

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
35 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

40 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
45 50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

50 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
55 100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
115 120 125

60 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145 150 155 160

65 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
165 170 175

```

ES 2 300 340 T3

	Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	
				180					185					190			
5	Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Ile	Leu	
			195					200					205				
10	Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn	
		210					215					220					
	Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	Ala	His	Ser	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Pro	Gln	
	225					230					235					240	
15	Arg	Ser	Pro	Thr	Gly	Ala	Val	Glu	Val	Gln	Val	Pro	Glu	Asp	Pro	Val	
					245					250					255		
20	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	
				260					265					270			
	Glu	Pro	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn	Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	
			275					280					285				
25	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	His	Ser	Phe	Thr	Glu	Gly	Arg	Asp	Gln	Gly	
		290					295					300					
30	Ser	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	
	305					310					315					320	
	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	
					325					330					335		
35	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp	Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	
				340					345					350			
	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	
			355					360					365				
40	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	
		370					375					380					
45	Ser	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val	Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	
	385					390					395					400	
	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	
					405					410					415		
50	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Val	Leu	Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala	
				420					425					430			
	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	
			435					440					445				
55	Ala	His	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Gly	Gln	Pro	Met	Thr	Phe	Pro	Pro	
		450					455					460					
60	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu	
	465					470					475					480	
	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Val	Cys	Trp	Arg	Lys	Ile	Lys	Gln	Ser	Cys	
					485					490					495		

65

ES 2 300 340 T3

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
500 505 510

5 Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
515 520 525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala
530

10

<210> 8

<211> 2097

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción de fusión sintética

<400> 8

25 atgctgctgc ggccggggcag cccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtec ctgaagaccc agtgggtggca 120
ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccctctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg cctcttccc ggacctgctg 300
gcacagggca acgcattccct gaggtgcag cgcgtgctg tggcggacga gggcagcttc 360
30 acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcgc tcagcctgca ggtggccgct 420
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
35 ttgtttgatg tgcaacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660
ctggtgctga acccctgctg gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720
agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccgttgtt ggccctagtg 780
ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcaagttt caccgaaggc 900
40 cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcaca 960
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1020
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtt gccgtcagcc tgcaggtggc cgtccctac 1080
tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140
45 atcacgtgct ccagctaacc gggtaccct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag 1200
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260
gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgctggtg 1320
cgcaaccccc tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380
acattccccc cagaattcga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1440
50 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 1500
acctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa 1560
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1620
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1680
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 1740
55 gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1800
acctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctggtc 1860
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa 1920
aactacaaga ccacgctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1980
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2040
60 gaggtctctg acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 2097

<210> 9

<211> 698

65

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 300 340 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción de fusión sintética

5 <400> 9

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

ES 2 300 340 T3

	290	295	300
5	Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln 305 310 315 320		
	Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly 325 330 335		
10	Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val 340 345 350		
	Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu 355 360 365		
15	Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser 370 375 380		
	Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln 385 390 395 400		
20	Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu 405 410 415		
	Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala 420 425 430		
25	Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp 435 440 445		
	Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro 450 455 460		
30	Glu Phe Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 465 470 475 480		
35	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 485 490 495		
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 500 505 510		
40	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 515 520 525		
	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 530 535 540		
45	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 545 550 555 560		
50	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 565 570 575		
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 580 585 590		
55	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 595 600 605		
60	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 610 615 620		

65

ES 2 300 340 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
625 630 635 640

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
5 645 650 655

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
660 665 670

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
10 675 680 685

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
15 690 695

<210> 10

<211> 951

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc ctgaagaccc agtgggtggca 120
ctggtgggca ccgatgccac cctgcgctgc tccttctccc ccgagcctgg cttcagcctg 180
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gacaccaaac agctgggtgca cagtctcacc 240
gaaggccggg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg 300
gcacaaggca atgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcctg tcagcctgca ggtggccgct 420
ccctaactca agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540
gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcggggtg gtgctggglg cgaatggcac ctacagctgc 660
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag 720
cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt 780
gcactgctgg tggccctggc ttctgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag 840
gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag 900
cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcctg a 951

<210> 11

<211> 316

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr
65 70 75 80

ES 2 300 340 T3

	Glu	Gly	Arg	Asp	Gln	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe	
					85					90						95	
5	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	
				100					105						110		
10	Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp	
			115					120					125				
15	Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys	
		130					135					140					
20	Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr	
	145				150						155					160	
25	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val	
				165						170					175		
30	Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	Gly	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	
				180				185						190			
35	Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Val	Leu	
			195				200						205				
40	Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn	
		210					215					220					
45	Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	Ala	His	Gly	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Gly	Gln	
	225				230						235					240	
50	Pro	Met	Thr	Phe	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Thr	Val	Gly	Leu	Ser	
				245						250					255		
55	Val	Cys	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Phe	Val	Cys	Trp	Arg	
				260					265					270			
60	Lys	Ile	Lys	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Ala	Glu	Asp	Gln	
			275					280				285					
65	Asp	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	His	
	290						295					300					
70	Ser	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala					
	305				310						315						
75	<210> 12																
80	<211> 951																
85	<212> ADN																
90	<213> <i>Homo sapiens</i>																

ES 2 300 340 T3

<400> 12

```

5      atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
      ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccagggtcc ctgaagaccc agtgggtggca 120
      ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180
      gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240
      gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg cectcttccc ggacctgctg 300
      gcacaaggca atgcatccct gaggtctgag cgcgtgctgt tggcggacga gggcagcttc 360
10     acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcccg tcagcctgca ggtggccgct 420
      ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480

15

      gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtggt ctggcaggat 540
      gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
20     ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc 660
      ctggtgcgca acccctgtct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag 720
      cctatgacat tccccccaga ggccctgttg gtgaccgttg ggctgtctgt ctgtctcatt 780
      gcaactgctg tggccctggc ttctgtgtgc tggagaaaga taaacagag ctgtgaggag 840
      gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaaa gctccaagac agccctgcag 900
25     cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcctg a          951

```

<210> 13

<211> 316

30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 340 T3

<400> 13

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

ES 2 300 340 T3

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
245 250 255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260 265 270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275 280 285

Asp Gly Glu Gly Glu Ser Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

<210> 14
<211> 2435
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 14

gctttcgtca gttcctcaga actagttctg gtttgactca ctctcatggt acggcaaacc 60
25 ttaagctgaa tgaacaactt ttcttctctt gaatatatct taacgccaaa ttttgagtgc 120
ttttttgtta cccatcctca tatgtccag ctggaaagaa tcctgggttg gagctactgc 180
atgttgattg ttttgttttt ccttttggtt gtccattttg gtggctacta taaggaaatc 240
taacacaaaac agcaactggt ttttggtgtt tacttttgca tctttacttg tggagctgtg 300
gcaagtcttc atatcaaata cagaacatga tcttcctcct gctaattgtg agcctggaat 360
30 tgcagcttca ccagatagca gctttattca cagtgcaggt ccctaaggaa ctgtacataa 420
tagagcatgg cagcaatgtg accctggaat gcaactttga cactggaagt catgtgaacc 480
ttggagcaat aacagccagt ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa 540
gagccacttt gctggaggag cagctgcccc tagggaaggc ctggttccac atacctcaag 600
35 tccaagtggg ggacgaagga cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc gcctgggact 660
acaagtacct gactctgaaa gtcaaagctt cctacaggaa aataaact caccatcctaa 720
aggttccaga aacagatgag gtagagctca cctgccaggc tacaggttat cctctggcag 780
aagtatcctg gccaaacgtc agcgttcctg ccaacaccag ccactccagg acccctgaag 840
gcctctacca ggtcaccagt gttctgcgcc taaagccacc ccttggcaga aacttcagct 900
40 gtgtgttctg gaatactcac gtgaggggaa ttactttggc cagcattgac cttcaaagtc 960
agacagggac caggacccat ccaacttggc tgcttcacat tttcatcccc tctgcatca 1020
ttgctttcat tttcatagcc acagtgatag ccctaagaaa acaactctgt caaaagctgt 1080
attcttcaaa agacacaaca aaaagacctg tcaccacaac aaagagggaa gtgaacagt 1140
45 ctatctgaac ctgtggtctt gggagccagg gtgacctgat atgacatcta aagaagcttc 1200
tggactctga acaagaattc ggtggcctgc agagcttgcc atttgactt ttc aaatgcc 1260
tttgatgac ccagcacttt aatctgaaac ctgcaacaag actagccaac acctggccat 1320
gaaacttgcc ctttactga tctggactca cctctggagc ctatggcttt aagcaagcac 1380
tactgcactt tacagaatta ccccaactgga tcttgagccc acagaattcc ttcaggatcc 1440
50 ttcttgctgc cagactgaaa gcaaaaggaa ttatttcccc tcaagtttcc taagtgattt 1500
ccaaaagcag aggtgtgtgg aaatttccag taacagaaac agatgggttg ccaatagagt 1560
tattttttat ctatagcttc ctctgggtac tagaagaggc tattgagact atgagctcac 1620
agacagggct tcgcacaaac tcaaatacata attgacatgt tttatggatt actggaatct 1680
tgatagcata atgaagtgtt tctaattaac agagagcatt taaatatata ctaagtgcac 1740
55 aaattgtgga gtaaagtcac caagctctgt ttttgaggtc taagtcacaa agcatttgtt 1800
ttaacctgta atggcaccat gtttaattgtt ggtttttttt ttgaactaca tctttccttt 1860
aaaaattatt ggtttctttt tatttgtttt taccttagaa atcaattata tacagtcaaa 1920
aatatttgat atgctcatal gttgtatctg cagcaatttc agataagtag ctaaaatggc 1980
60 caaagcccca aactaagcct ccttttctgg ccttcaatat gactttaaat ttgacttttc 2040
agtgcctcag tttgcacatc tgtaatacag caatgctaag tagtcaaggc ctttgataat 2100
tggcactatg gaaatcctgc aagatcccac tacatatgtg tggagcagaa gggttaactc 2160
gtacagtaa cagcttaatt ttgttaaat ttgttcttat actggagcca tgaagctcag 2220
agcattagct gaccttgaa ctattcaaat gggcacatta gctagtataa cagacttaca 2280
65 taggtgggcc taaagcaagc tccttaactg agcaaaattt ggggcttatg agaataaag 2340
ggtgtgaaat tgactaacag acaaatcata catctcagtt tctcaattct catgtaaaatc 2400
agagaatgcc tttagaaatt accaaagtgt tccat 2435

ES 2 300 340 T3

<210> 15

<211> 273

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

```

10      Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
        1             5             10             15

      Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
                20             25             30

15      Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
                35             40             45

20      His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
        50             55             60

      Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
        65             70             75             80

25      Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
                85             90             95

30      Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
                100            105            110

      Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
                115            120            125

35      His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
        130            135            140

      Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
        145            150            155            160

40      Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
                165            170            175

      Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
        180            185            190

50      Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
                195            200            205

      Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
        210            215            220

55      Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
        225            230            235            240

      Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
                245            250            255

60      Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
                260            265            270

```

65 Ile

<210> 16

ES 2 300 340 T3

<211> 1356

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción de fusión sintética

10 <400> 16

```

atgatcttcc tccgtgctaatt gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat agcagcttta 60
ttcacagtga cagtcacctaa ggaactgtac ataataagagc atggcagcaa tgtgaccctg 120
gaatgcaact ttgacactgg aagtcattgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa 180
15 aagggtggaaa atgatacatc cccacacccgt gaaagagcca ctttgcttga ggagcagctg 240
cccttaggga aggcctcggt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 300
caatgcataa tcatctatgg ggtcgccctgg gactacaagt acctgactct gaaagtcaaa 360
gcttctctaca ggaaaataaa cactcacatc cttaaaggttc cagaaacaga tgaggtagag 420
ctcacctgcc aggtctacagg ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcggt 480
20 cctgcccaaca ccagccactc caggacccct gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540
cgcctaaagc caccctctgg cagaaacttc agctgtgtgg tctggaatac tcacgtgagg 600
gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa agtcagatgg aaccaggac cgaattcgag 660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccacgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
25 ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc 780
cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agcgcggga ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctctg accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
30 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca cctgcccccc atcccgggat 1080
gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
35 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtctc gtgatgcag aggtctctga caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1356

```

<210> 17

<211> 451

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Descripción de la secuencia artificial: Construcción de fusión sintética

<400> 17

```

50 Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
    1             5             10             15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
55             20             25             30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
             35             40             45

60 His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
    50             55             60

65 Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu

```

ES 2 300 340 T3

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

ES 2 300 340 T3

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

5 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

10 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 18

<211> 666

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

```

agctttttcaa tgtgaccagc acactgagaa tcaacacaac aactaatgag attttctact 60
gcacttttag gagattagat cctgaggaaa accatacagc tgaattgggtc atcccagaac 120
25 tacctctggc acatcctcca aatgaaagga ctcaacttgggt aattctggga gccatcttat 180
tatgccttgg tgtagcactg acattcatct tccgtttaag aaaagggaga atgatggatg 240
tgaaaaaatg tggcatccaa gatacaaaact caaagaagca aagtataca catttggagg 300
agacgtaatc cagcattgga acttctgac ttcaagcagg gattctcaac ctgtgggtta 360
30 ggggttcacg ggggctgagc gtgacaagag gaaggaatgg gcccgaggga tgcaggcaat 420
gtgggactta aaaggcccaa gcaactgaaa tggaaacctg cgaaacagag gaggagaatg 480
aagaaagatg gagtcaaaca gggagcctgg agggagacct tgatacttcc aaatgcctga 540
ggggctcatc gacgcctgtg acaggagaga aggatacttc tgaacaagga gcctccaagc 600
aaatcatcca ttgctcatcc taggaagacg ggttgagaat ccctaatttg agggtcagtt 660
35 cctgca 666

```

<210> 19

<211> 3197

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

```

attcggctcg agggcgactg agccaggctg ggccgcgtcc ctgagtccca gagtccggcg 60
ggcgcgagcag gggcagcctt ccaccacggg gageccagct gtcagccgce tcacaggaag 120
atgctgcgtc ggcggggagc cctggcagtg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 180
ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggctc ctgaagaccc agtgggtggca 240
50 ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccctctccc ctgagcctgg ctccagcctg 300
gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 360
gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg cctcttccc ggacctgctg 420
gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcgagcga gggcagcttc 480
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcgg tcagcctgca ggtggccgct 540
55 cctactcga agcccagcat gacccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 600
gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 660
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 720
ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 780
60 ctggtgcgca acccctgctg gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 840
agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagt 900
ggcaccgatg ccacctgctg ctgctccttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 960
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 1020
cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacia 1080
65 ggcaatgcat cctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag ctccacctgc 1140
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgtc gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 1200
togaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cagggtgacc 1260

```

ES 2 300 340 T3

```

5   atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag 1320
    ggtgtgcccc tgaactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttggtt 1380
    gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1440
    cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1500
    acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1560
    ctggtggccc tggttttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1620
    gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1680
    aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctgaccatg aggaccaggg 1740
10  agctgctacc cctccctaca gctcctaccc tctggctgca atggggctgc actgtgagcc 1800
    ctgcccccaa cagatgcate ctgctctgac aggtgggctc ctctctccaa ggatgcgata 1860
    cacagaccac tgtgcagcct ttttctcca atggacatga ttcccaagtc atcctgctgc 1920
    cttttttctt atagacacaa tgaacagacc acccacaacc ttagttctct aagtcattct 1980
    gcctgctgcc ttatttcaca gtacatacat ttcttaggga cacagtacac tgaccacatc 2040
15  accacccctc tcttcagtg ctgcgtggac catctggctg cctttttctt ccaaaagatg 2100
    caatattcag actgactgac cccctgcctt atttcaccaa agacacgatg catagtccac 2160
    ccggccttgt ttctccaatg gccgtgatac actagtgate atgttcagcc ctgcttcac 2220
    ctgcatagaa tcttttcttc tcagacaggg acagtgcggc ctcaacatct cctggagtct 2280
20  agaagctggt tcttttcccc tcttctctc tcttgctcta gccttaatac tggccttttc 2340
    cctccctgcc ccaagtgaag acagggcact ctgcgcccac cacatgcaca gctgtgcatg 2400
    gagacctgca ggtgcacgtg ctggaacacg tgtggttccc ccttgccca gcctcctctg 2460
    cagtgcacct ctccctgcc catcctcccc acggaagcat gtgctggta cactggttct 2520
25  ccaggggtct gtgatggggc cctggggggt cagcttctgt cctctgctt tctcacctct 2580
    ttgttctctt cttttcatgt atccattcag ttgatgttta ttgagcaact acagatgtca 2640
    gcactgtggt aggtgctggg ggcctgctgt ggggaagataa agttcctccc tcaaggactc 2700
    cccatccagc tgggagacag acaactaact acactgcacc ctgcggtttg cagggggctc 2760
    ctgctctggt cctgctcca cactcctct gtgggtcaag gcttcctgga tacctcacc 2820
30  ccattccacc cataattctt acccagagca tggggttggg gcggaaacct ggagagagg 2880
    acatagcccc tcgccacggc tagagaatct ggtggtgtcc aaaatgtctg tccaggtgtg 2940
    ggcaggtggg caggcaccaa ggcctctgtg accttctata gcagcagaaa aggcagagcc 3000
    tggggcaggg cagggccagg aatgcttttg ggacaccgag gggactgccc cccaccccca 3060
    ccattggtgt attctggggc tggggcagtc ttttctggtc ttgctctgtg ccagctcctg 3120
35  gcctctggtg gagtgagact tcagacgttc tgatgccttc cggatgtcat ctctcctgct 3180
    ccaggaatg gaagatg                                     3197

```

<210> 20

<211> 842

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

```

    ccgggggtacc atgatcttcc tctgctaact gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat 60
    agcagcttta ttcacagtga cagtccttaa ggaactgtac ataatagagc atggcagcaa 120
    tgtgaccttg gaatgcaact ttgacactgg aagtcattgt aaccttgagg caataacagc 180
50  cagtttgcaa aaggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga 240
    ggagcagctg cccctaggga aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga 300
    aggacaglac caatgcataa tcattctatg ggtgcctggt gactacaagt acctgactct 360
    gaaagtcaaa gcttctctca ggaaaataaa cactcacatc ctaaagggtc cagaaacaga 420
    tgaggtagag ctacactgcc aggtacagg ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa 480
55  cgtcagcgtt cctgccaaca ccagccactc caggaccctt gaaggcctct accaggtcac 540
    cagtgttctg cgctaaagc caccctctgg cagaaacttc agctgtgtgt tctggaatac 600
    tcacgtgagg gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa agtcagatgg aaccaggac 660
    ccattcaact tggctgttcc acattttcat cccctcctgc atcattgctt tcattttcat 720
60  agccacagtg atagccctaa gaaaacaact ctgtcaaaag ctgtattctt caaaagagac 780
    aacaaaaaga cctgtcacca caacaaagag ggaagtgaac agtgctatct gatctagagc 840
    gc                                     842

```

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 300 340 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 21	
	ggcataataa gatggctccc	20
10	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
20	<400> 22	
	catgaactga catgtcaggc	20
25	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
35	<400> 23	
	cattacaaa gagaggtcgg	20
40	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 24	
	agggttattt taagtaccga cc	22
55	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
65	<400> 25	
	ggaaatgtat gttaaagca cg	22

ES 2 300 340 T3

	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 26	
	ggcatggatc ctcagccctg gg	22
15	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 27	
	gagacccatg ggctctccag gg	22
30	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 28	
	gttcaagcac aacgaatgag gc	22
45	<210> 29	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 29	
	tggtttgcc acatgtcaag gc	22
60	<210> 30	
	<211> 34	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 30	
	tcaggtacta gtgttcccaa ggacctatat gtgg	34
10	<210> 31	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
20	<400> 31	
	gattcgagat ctctcgagt ctttcattt ggaggatgtg cc	42
25	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
35	<400> 32	
	tcaggtacta gtgttcccaa ggaccatatg tgg	33
40	<210> 33	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 33	
	gattcgagat ctctcgagt ctttcattgg ggatgtgcc	39
55	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
65	<400> 34	
	ggtgcacagc ttgctga	18

ES 2 300 340 T3

	<210> 35	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 35	
	gctgtgcacc agctgttt	18
15	<210> 36	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 36	
	gctatgaaag gtccagag	18
30	<210> 37	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 37	
	gaatctggtg gtgtccaa	18
45	<210> 38	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 38	
	ctctgtcacc atcacagg	18
60	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
5	<400> 39		
	ctctgtcacc atcacacc		18
10	<210> 40		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
20	<400> 40		
	gaaatcccgg atgctcac		18
25	<210> 41		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
35	<400> 41		
	accacacgtg ttccagca		18
40	<210> 42		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
50	<400> 42		
	tgctggaaca cgtgtggt		18
55	<210> 43		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
65	<400> 43		
	ggcctcagc aaagctgt		18

ES 2 300 340 T3

	<210> 44	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 44	
	agctgtaggt gccattcg	18
15	<210> 45	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 45	
	agggacctgg acctccac	18
30	<210> 46	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 46	
	tggggggaat gtcatagg	18
45	<210> 47	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 47	
	agcaggcagg atgactta	18
60	<210> 48	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
5	<400> 48		
	aacagaccac ccacaacc		18
10	<210> 49		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
20	<400> 49		
	gcaaattggca cctacagc		18
25	<210> 50		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
35	<400> 50		
	tctggggtgt gatggtga		18
40	<210> 51		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
50	<400> 51		
	atgaaaggtc cagagggc		18
55	<210> 52		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador		
65	<400> 52		
	accataatt cttacca		18

ES 2 300 340 T3

	<210> 53	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 53	
	cacagctctg ttgatct	18
15	<210> 54	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 54	
	ctcctaccct ctggctgc	18
30	<210> 55	
	<211> 14	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 55	
	atgctgcgtc ggcg	14
45	<210> 56	
	<211> 24	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 56	
	ttaggtatt tctgtccat catc	24
60	<210> 57	
	<211> 17	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 57	
	gttttccag tcacgac	17
10	<210> 58	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
20	<400> 58	
	caggaaacag ctatgac	17
25	<210> 59	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
35	<400> 59	
	tggtgcacag ctttgct	17
40	<210> 60	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 60	
	tctgggggga atgtcat	17
55	<210> 61	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
65	<400> 61	
	tggtgcacag ctttgct	17

ES 2 300 340 T3

	<210> 62	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 62	
	tctgggggga atgtcat	17
15	<210> 63	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 63	
	ggggtaccat gctgcgtcgg cg	22
30	<210> 64	
	<211> 25	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 64	
	cggaattctg gggggaatgt catag	25
45	<210> 65	
	<211> 27	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 65	
	ggaattcgag cccaaatctt gtgacaa	27
60	<210> 66	
	<211> 29	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 66	
	gcgctctaga tcatttaccg ggagacagg	29
10	<210> 67	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
20	<400> 67	
	gaaggcctct accaggtc	18
25	<210> 68	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
35	<400> 68	
	ctttaggcgc agaacact	18
40	<210> 69	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 69	
	aagggtcagc taatgctc	18
55	<210> 70	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
65	<400> 70	
	tcagtttgca catctgta	18

ES 2 300 340 T3

	<210> 71	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 71	
	tatgctatca agattcca	18
15	<210> 72	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 72	
	gtaaagtgca gtagtgct	18
30	<210> 73	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 73	
	tatgagctca cagacagg	18
45	<210> 74	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 74	
	aggttcagat agcactgt	18
60	<210> 75	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 75	
	acttatctga aattgctg	18
10	<210> 76	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
20	<400> 76	
	ttgatatgct catacggt	18
25	<210> 77	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
35	<400> 77	
	gaattctgtg ggtccagg	18
40	<210> 78	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 78	
	catgtttaat ggtggttt	18
55	<210> 79	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
65	<400> 79	
	aaagctgtat tcttcaaa	18

ES 2 300 340 T3

	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 80	
	gaacactggt gacctggtag ag	22
15	<210> 81	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 81	
	ccgggggtacc atgatcttcc tcctgctaata gttg	34
30	<210> 82	
	<211> 33	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 82	
	gcgctctaga tcagatagca ctgttcactt ccc	33
45	<210> 83	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 83	
	tacaagcgaa ttactgtgaa	20
60	<210> 84	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 84	
	gatgtgccag aggtagtct	20
10	<210> 85	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
20	<400> 85	
	aatagagcat ggcagcaatg	20
25	<210> 86	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
35	<400> 86	
	ggcgacccca tagatgatta	20
40	<210> 87	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
50	<400> 87	
	ccagtaagtg cgggtcat	18
55	<210> 88	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
65	<400> 88	
	ttcacctacg gaaacctt	18

ES 2 300 340 T3

	<210> 89	
	<211> 34	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
10	<400> 89	
	ccgggggtacc atgattctcc tctgctaataa gttg	34
15	<210> 90	
	<211> 26	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
25	<400> 90	
	cggaattcgg tctgggttc catctg	26
30	<210> 91	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 91	
	cgggattcat gatcttctc ctgctaataa t	31
45	<210> 92	
	<211> 29	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
55	<400> 92	
	gcgctctaga tcattaccc ggagacagg	29
60	<210> 93	
	<211> 6	
	<212> PRT	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 300 340 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Marca de epítotope sintética

5 <400> 93

His His His His His His
1 5

10 <210> 94

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Marca de epítotope sintética

20 <400> 94

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

25

30

35

40

45

50

55

60

65