

(11) Número de Publicação: **PT 1781682 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/13 (2013.01) **C07K 14/705** (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01) **A61K 38/17** (2013.01)
G01N 33/53 (2013.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.06.24	(73) Titular(es): MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH 200 FIRST STREET S.W. ROCHESTER, MN 55905 US
(30) Prioridade(s): 2004.06.24 US 582491 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.05.09	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.03.13 091/2013	(72) Inventor(es): LIEPING CHEN US
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **B7-H5, UM POLIPÉPTIDO COESTIMULANTE**

(57) Resumo:

SÃO AQUI PROPORCIONADOS POLIPÉPTIDOS COESTIMULANTES B7- H5, ÁCIDOS NUCLEICOS CODIFICANDO ESTES POLIPÉPTIDOS, E MÉTODOS PARA UTILIZAÇÃO DOS POLIPÉPTIDOS E ÁCIDOS NUCLEICOS PARA INTENSIFICAR UMA RESPOSTA DE CÉLULA T.

RESUMO

"B7-H5, um polipéptido coestimulante"

São aqui proporcionados polipéptidos coestimulantes B7-H5, ácidos nucleicos codificando estes polipéptidos, e métodos para utilização dos polipéptidos e ácidos nucleicos para intensificar uma resposta de célula T.

DESCRIÇÃO

"B7-H5, um polipéptido coestimulante"

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

Este pedido de patente reivindica o benefício da data de depósito do Pedido de Patente Provisório dos E.U.A. N.º de Série 60/582 491, depositado em 4 de Junho de 2004.

ANTECEDENTES

Os linfócitos T activados desempenham papéis críticos na defesa do hospedeiro contra infecções virais e cancro e estão envolvidos na progressão de doenças auto-imunes. Tipicamente são requeridos dois sinais distintos para activação óptima de linfócitos T específicos de antigénio. O primeiro sinal é proporcionado pelas interacções do complexo de péptido antigénico e do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) com o receptor de células T (TCR). O segundo sinal é entregue às células T por moléculas coestimulantes expressas sobre células de apresentação de antigénio (APCs). Estudos têm demonstrado que interacções coestimulantes estimulam o crescimento de células T, regulam de modo ascendente a produção de citocina, e promovem a diferenciação de células T. Além disso, a ligação de moléculas coestimulantes proporciona um sinal de sobrevivência essencial para células T para prevenir a apoptose. Adicionalmente, os sinais coestimulantes parecem ser críticos para a indução e manutenção de anergia de células T. Mais importante, existe um interesse claro na manipulação terapêutica de percursos coestimulantes porque o controlo de sinais coestimulantes pode proporcionar um meio quer para intensificar quer para inibir respostas imunitárias.

A WO 01/04297 A2 refere-se a proteínas humanas possuindo domínios hidrofóbicos, ADNs codificando estas proteínas, vectores de expressão para estes ADNs, células eucarióticas transformadas expressando estes ADNs e anticorpos dirigidos contra estas proteínas. A SEQ ID NO 9 da WO 01/04297 A2 refere-se a uma proteína de 311 aminoácidos. O ácido nucleico de codificação é apresentado nas SEQ ID NOs. 19 e 29. A WO

01/04297 A2 revela também em geral métodos de produção recombinante e rastreio bem como utilizações médicas para as proteínas reveladas na WO 01/04297 A2.

A DATABASE EMBL [Online] 29 de Setembro de 2000, "Homo sapiens mRNA for FLJ00041 protein, partial cds.", n.º de acesso EBI EMBL:AK024449, n.º de acesso à base de dados AK024449 revela um ARNm de *homo sapiens* de 4689 ácidos nucleicos e uma sequência de aminoácidos traduzida de 330 aminoácidos.

A DATABASE EMBL [Online] 8 de Fevereiro de 2001, "Mus musculus 0 day neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 4632428N05 product: hypothetical Immunoglobulin and major histocompatibility complex domain/Immunoglobulin subtype containing protein, full insert sequence.", n.º de acesso EBI EMBL:AK014600, n.º de acesso à base de dados AK014600 revela um ARNm de rato de 4397 ácidos nucleicos e uma sequência de aminoácidos traduzida de 309 aminoácidos.

SUMÁRIO

O invento é baseado, em parte, na clonagem de moléculas de ADNc de humano e rato codificando moléculas homólogas que coestimulam as respostas de células T de ambas as espécies e na caracterização funcional dos polipéptidos que as moléculas de ADNc codificam. O polipéptido de humano é designado por hB7-H5 e o polipéptido de rato por mB7-H5. O texto que se refere a B7-H5 sem especificar humano *versus* rato é pertinente para ambas as formas de B7-H5. O invento apresenta os polipéptidos hB7-H5 e mB7-H5, fragmentos funcionais dos polipéptidos, ácidos nucleicos codificando os polipéptidos ou fragmentos, proteínas de fusão contendo os polipéptidos ou fragmentos funcionais dos polipéptidos, e células expressando os polipéptidos ou os fragmentos funcionais para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero. São também incluídos no invento anticorpos que se ligam aos polipéptidos B7-H5. O invento apresenta métodos *in vitro* de coestimulação de respostas de célula T e métodos de rastreio para compostos que modulam respostas imunitárias.

O invento abrange também um polipéptido B7-H5 isolado para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, e.g., um polipéptido codificado por um ADN que inclui uma sequência de ácido nucleico que (i) codifica um polipéptido com a capacidade para coestimular uma célula T e (ii) se hibridiza sob condições estridentes com o complemento de uma sequência que codifica um polipéptido com uma sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:1 ou a SEQ ID NO:3. O polipéptido B7-H5 pode incluir uma sequência de aminoácidos do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3. O invento abrange também polipéptidos B7-H5 que incluem uma sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:1 ou a SEQ ID NO:3 para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, ou um polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 1 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, onde o polipéptido tem a capacidade para coestimular uma célula T. Os polipéptidos do invento incluem proteínas de fusão contendo um primeiro domínio e pelo menos um domínio adicional. O primeiro domínio pode ser qualquer dos polipéptidos B7-H5 descritos acima. O pelo menos um domínio adicional pode ser, por exemplo, uma sequência líder ou de direccionamento heteróloga, ou uma sequência de aminoácidos que facilita a purificação, detecção ou solubilidade da proteína de fusão.

Outra concretização do invento é um método de coestimulação de uma célula T que envolve contacto da célula T com qualquer dos polipéptidos B7-H5 do invento, ou proteínas de fusão do invento; estas 2 classes de moléculas são designadas, por conveniência, "agentes B7-H5". O contacto pode ser por cultura de qualquer destes agentes B7-H5 com a célula T *in vitro*. Um contacto de uma célula T num mamífero (e.g., um humano, primata não humano (e.g., macaco), ratinho, rato, cobaia, vaca, ovelha, cavalo, porco, coelho, cão ou gato) com qualquer dos polipéptidos B7-H5 do invento, ou proteínas de fusão do invento, pode ser por administração de

qualquer dos agentes B7-H5 ao mamífero ou administração de um ácido nucleico codificando o agente B7-H5 ao mamífero. Num procedimento *ex vivo* uma célula recombinante, que é a progenitura de uma célula obtida a partir do mamífero e foi transfectada ou transformada *ex vivo* com um ácido nucleico codificando qualquer dos agentes B7-H5 tal que a célula expressa o agente B7-H5, pode ser proporcionada e administrada ao mamífero. Neste procedimento *ex vivo*, a célula pode ser uma célula de apresentação de antigénio (APC) que expressa o agente B7-H5 sobre a sua superfície. Adicionalmente, antes da administração ao mamífero, a APC pode ser pulsada com um antigénio ou um péptido antigénico. Em qualquer dos métodos anteriores, o mamífero pode ser suspeito de ter, por exemplo, uma doença de imunodeficiência, uma condição inflamatória ou uma doença auto-imune. Além disso, em qualquer dos métodos, a célula T pode ser uma célula T auxiliar, *e.g.*, uma célula T que ajuda uma resposta efectora (*e.g.*, um linfócito T citotóxico (CTL) ou um anticorpo de célula B). Uma resposta de anticorpo pode ser, por exemplo, uma resposta de anticorpo IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE ou IgA. A coestimulação de uma célula T por qualquer dos agentes B7-H5 pode resultar num aumento no nível de ligando CD40 sobre a superfície da célula T.

O invento inclui um método de identificação de um composto que modula uma resposta imunitária. O método envolve: proporcionar um composto de teste; cultivar, em conjunto, o composto, um ou mais agentes B7-H5, uma célula T e uma molécula de activação de célula T; e determinar se o composto de teste modula a resposta da célula T à molécula, como uma indicação de que o composto de teste modula uma resposta imunitária. A molécula pode ser, por exemplo, um anticorpo que se liga a um receptor de célula T ou a um polipéptido CD3. Alternativamente, a molécula pode ser um aloantigénio ou um péptido antigénico ligado a uma molécula de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) sobre a superfície de uma célula de apresentação de antigénio (APC). A APC pode ser transfectada ou transformada com um ácido nucleico codificando o agente B7-H5 e o agente B7-H5 pode ser expresso sobre a superfície da APC.

O invento apresenta também um anticorpo (e.g., um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal) que se liga a qualquer dos polipéptidos B7-H5 do invento, e.g., o polipéptido com a SEQ ID NO:1 ou a SEQ ID NO:3, e.g., o anticorpo monoclonal 5H9 ou o anticorpo monoclonal 1H11 aqui revelados. Estes anticorpos monoclonais podem ser segregados por hibridomas.

"Polipéptido" e "proteína" são utilizados intermutavelmente e significam qualquer cadeia de aminoácidos ligados por ligações peptídicas, independentemente do comprimento ou modificação pós-tradução. O invento apresenta também polipéptidos B7-H5 com substituições conservativas. Substituições conservativas incluem tipicamente substituições dentro dos seguintes grupos: glicina e alanina; valina, isoleucina e leucina; ácido aspártico e ácido glutâmico; asparagina, glutamina, serina e treonina; lisina, histidina e arginina; e fenilalanina e tirosina.

O termo polipéptido ou fragmento de péptido "isolado" como aqui utilizado refere-se a um polipéptido ou a um fragmento de péptido que ou não tem qualquer correspondente de ocorrência natural (e.g., um peptidomimético), ou foi separado ou purificado a partir de componentes que naturalmente o acompanham, e.g., em tecidos tais como pâncreas, fígado, baço, ovário, testículos, músculo, tecido articular, tecido neural, tecido gastrointestinal ou fluidos corporais tais como sangue, soro ou urina. Tipicamente, o polipéptido ou fragmento de péptido é considerado "isolado" quando está pelo menos 70%, em peso seco, isento das proteínas e moléculas orgânicas de ocorrência natural com as quais está associado naturalmente. Preferivelmente, uma preparação de um polipéptido (ou seu fragmento de péptido) do invento é pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e muito preferivelmente pelo menos 99%, em peso seco, do polipéptido (ou do seu fragmento de péptido), respectivamente, do invento. Assim, por exemplo, uma preparação de polipéptido x é pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e muito preferivelmente pelo menos 99%, em peso seco, do polipéptido x. Uma vez que um polipéptido que é sintetizado quimicamente está, pela sua natureza, separado dos componentes que naturalmente o

acompanham, o polipéptido sintético ou ácido nucleico está "isolado".

Um polipéptido (ou fragmento de péptido) isolado do invento pode ser obtido, por exemplo, por extracção a partir de uma fonte natural (e.g., a partir de tecidos humanos ou fluidos corporais); por expressão de um ácido nucleico recombinante codificando o péptido; ou por síntese química. Um péptido que é produzido num sistema celular diferente da fonte a partir da qual é naturalmente originário é "isolado", porque estará separado de componentes que naturalmente o acompanham. A extensão do isolamento ou pureza pode ser medida por qualquer método apropriado, e.g., cromatografia em coluna, electroforese em gel de poliacrilamida ou análise de HPLC.

Um "ADN isolado" significa ADN livre de um ou de ambos os genes que flanqueiam o gene contendo o ADN de interesse no genoma do organismo no qual o gene contendo o ADN de interesse ocorre naturalmente. O termo inclui por conseguinte um ADN recombinante incorporado num vector, num plasmídeo de replicação autónoma ou vírus, ou no ADN genómico de um procaríota ou eucaríota. Inclui também uma molécula separada tal como: um ADNc onde o ADN genómico correspondente possui intrões e é por isso uma sequência diferente; um fragmento genómico; um fragmento produzido por reacção em cadeia da polimerase (PCR); um fragmento de restrição; um ADN codificando uma proteína de ocorrência não natural, proteína de fusão ou fragmento de uma dada proteína; ou um ácido nucleico que é uma variante degenerada de um ácido nucleico de ocorrência natural. Adicionalmente, inclui uma sequência de nucleótidos recombinante que é parte de um gene híbrido, i.e., um gene codificando uma proteína de fusão. É também incluído um ADN recombinante que inclui uma porção de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:6. Será evidente a partir do anterior que ADN isolado não significa um ADN presente entre centenas a milhões de outras moléculas de ADN, por exemplo, dentro de bibliotecas de ADNc ou ADN genómico ou digeridos de restrição de ADN genómico, por exemplo, numa mistura reaccional de digeridos de restrição ou uma fatia de gel electroforético.

Como aqui utilizado, um polipéptido que "coestimula" uma célula T é um polipéptido que, pela interacção com uma molécula na superfície celular sobre a célula T, intensifica a resposta da célula T. A resposta de célula T que resulta da interacção será mais elevada do que a resposta na ausência do polipéptido. A resposta da célula T na ausência do polipéptido coestimulante pode ser ausência de resposta ou pode ser uma resposta significativamente mais baixa do que na presença do polipéptido coestimulante. É entendido que a resposta da célula T pode ser uma resposta efectora (e.g., CTL ou uma célula B produtora de anticorpo), uma resposta auxiliar proporcionando auxílio para uma ou mais respostas efectoras (e.g., CTL ou célula B produtora de anticorpo), ou uma resposta supressora.

Como aqui utilizado, um "estímulo de activação" é uma molécula que entrega um sinal de activação a uma célula T, preferivelmente através do receptor de célula T (TCR) específico de antigénio. O estímulo de activação pode ser suficiente para induzir uma resposta detectável na célula T. Alternativamente, a célula T pode requerer coestimulação (e.g., por um polipéptido B7-H5) por forma a responder de modo detectável ao estímulo de activação. Exemplos de estímulos de activação incluem, sem limitação, anticorpos que se ligam ao TCR ou a um polipéptido do complexo CD3 que está fisicamente associado ao TCR sobre a superfície da célula T, aloantígenos ou um péptido antigénico ligado a uma molécula de MHC.

Como aqui utilizado, um "fragmento" de um polipéptido B7-H5 é um fragmento do polipéptido que é mais curto do que o polipéptido imaturo a todo o comprimento. Geralmente, os fragmentos terão 5 ou mais aminoácidos, e.g., 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 21, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 260, 270, 280, 285, 290, 295, 300, 303, 306 ou 308 ou mais aminoácidos, de comprimento. Um fragmento antigénico tem a capacidade para ser reconhecido e ligado por um anticorpo. Em certas concretizações, os fragmentos antigénicos são também fragmentos funcionais.

Como aqui utilizado, um "fragmento funcional" de um polipéptido B7-H5 é um fragmento do polipéptido que é mais

curto do que o polipéptido imaturo a todo o comprimento e tem pelo menos 25% (e.g., pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mesmo 100% ou mais) da capacidade do polipéptido B7-H5 maduro a todo o comprimento para coestimular uma célula T. São conhecidos na especialidade métodos para estabelecer se um fragmento de uma molécula B7-H5 é ou não funcional. Por exemplo, fragmentos de interesse podem ser preparados por métodos recombinantes, sintéticos ou de digestão proteolítica. Estes fragmentos podem depois ser isolados e testados quanto à sua capacidade para coestimular células T por procedimentos aqui descritos.

Como aqui utilizado, "ligado operavelmente" significa incorporado numa construção genética tal que sequências de controlo expressão controlam eficazmente a expressão de uma sequência de codificação de interesse.

Como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se não apenas a moléculas de anticorpo inteiras, mas também a fragmentos de ligação de antigénio, e.g., fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv e Fv de cadeia simples. São também incluídos anticorpos quiméricos.

Como aqui utilizado, um anticorpo que "se liga especificamente" a um polipéptido B7-H5 isolado codificado por um ADN que inclui uma sequência de ácido nucleico que (i) codifica um polipéptido com a capacidade para coestimular uma célula T e (ii) se hibridiza sob condições estridentes com o complemento de uma sequência que codifica um polipéptido com uma sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO:1 ou a SEQ ID NO:3, é um anticorpo que não se liga a polipéptidos B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3 ou B7H-4.

A não ser que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado como habitualmente compreendido por uma pessoa competente na especialidade à qual este invento pertence. Em caso de conflito, prevalecerá o presente documento, incluindo definições. Métodos e materiais preferidos são descritos abaixo, ainda que na prática ou ensaio do presente invento se possam utilizar métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos. Os materiais, métodos e exemplos aqui

revelados são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitantes.

Outras particularidades e vantagens do invento, *e.g.*, de melhoria de respostas imunitárias em sujeitos mamíferos, serão evidentes a partir da descrição seguinte, a partir dos desenhos e a partir das reivindicações.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 é uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:5) de um clone de ADNc que inclui uma sequência codificando um polipéptido B7-H5 de humano. O codão de início de B7-H5 está indicado a negrito e sublinhado. O codão de paragem de B7-H5 está indicado a sublinhado.

A Fig. 2 é uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:6) que inclui uma sequência codificando um polipéptido B7-H5 de ratinho. O codão de início de B7-H5 está indicado a negrito e sublinhado. O codão de paragem de B7-H5 está indicado a sublinhado.

A Fig. 3 é uma sequência anotada de aminoácidos (SEQ ID NO:1) de B7-H5 de humano. O domínio tipo IgV está sublinhado; uma cisteína intermolecular prevista está indicada a negrito e sublinhado; o domínio transmembrana previsto está indicado a negrito; uma tirosina que está potencialmente sujeita a fosforilação está numa caixa.

A Fig. 4 é uma sequência anotada de aminoácidos (SEQ ID NO:3) de B7-H5 de ratinho. O domínio tipo IgV está sublinhado; uma cisteína intermolecular prevista está indicada a negrito e sublinhado; o domínio transmembrana previsto está indicado a negrito; tirosinas que estão potencialmente sujeitas a fosforilação estão em caixas.

A Fig. 5 é uma representação da estrutura do domínio de B7-H5 de humano. Uma sequência de sinal prevista inclui os resíduos 1-29 da SEQ ID NO:1. Um domínio previsto tipo imunoglobulina (Ig) inclui os resíduos 30-170 da SEQ ID NO:1. Um domínio de ligador previsto inclui os resíduos 171-194 da SEQ ID NO:1. Um domínio de transmembrana previsto inclui os

resíduos 195-216 da SEQ ID NO:1. Os resíduos 217-311 formam um domínio intracelular previsto, com os resíduos 280-292 formando um motivo estruturado/de baixa complexidade. A estrutura e topologia do domínio são conservadas entre os polipéptidos B7-H5 de humano e de ratinho.

A Fig. 6 é um alinhamento baseado na estrutura de B7-H5 e de outros membros da família B7. Estão alinhadas as sequências de aminoácidos de segmentos dos polipéptidos da família B7 (incluindo B7-H5) (h: humano, m: ratinho) que contêm sequências do domínio V da superfamília de imunoglobulina (IgSF). Os resíduos de consenso do conjunto V de IgSF são apresentados sobre um fundo a negro. As posições de resíduos de consenso estão marcadas com resíduos de IgSF invariantes ou de carácter de resíduo conservado (h: hidrofóbico, p: polar). As posições de resíduo mostradas sobre um fundo cinzento são resíduos de assinatura da família B7 fora das posições de consenso de IgSF. As cadeias beta do domínio V são designadas de acordo com as convenções de IgSF (A', B, C, C', C'', D, F, G). As posições de resíduo marcadas com # estão envolvidas na dimerização de CD80/CD86 nas suas estruturas cristalinas e os resíduos marcados com asterisco participam na ligação de CTLA4. As sequências de aminoácido dos segmentos hCD80, hCD86, hB7-H1, mB7-H1, hB7-H2, hB7-H3, hB7-DC, mB7-DC, hB7-H4, mB7-H4, hB7-H5 e mB7-H5 são aqui apresentadas como SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:22, respectivamente.

A Fig. 7 é um gráfico de linhas ilustrando a coestimulação *in vitro* da proliferação de células T por B7-H5. A proliferação de células T é ilustrada como a incorporação de ³H-timidina (eixo dos y; contagens por minuto, cpm). A concentração de anticorpo anti-CD3 está indicada no eixo dos x.

A Fig. 8A é um histograma de citometria de fluxo de fluorescência (FFC) mostrando o número de células (eixo dos y) com os níveis de fluorescência indicados (eixo dos x). Transfectantes de células CHO expressando B7-H5 de humano

(aberto) ou células CHO transfectadas em falso (a cheio) foram corados com o anticorpo monoclonal 5H9.

A Fig. 8B é um histograma de FFC ilustrando o número de células (eixo dos y) com os níveis de fluorescência indicados (eixo dos x). Transfectantes de células CHO expressando B7-H5 de humano (aberto) ou células CHO transfectadas em falso (a cheio) foram corados com o anticorpo monoclonal 1H11.

A Fig. 9 é uma sequência de nucleótidos traduzida (SEQ ID NO:2) de um ADNc codificando B7-H5 de humano.

A Fig. 10 é uma sequência de nucleótidos traduzida (SEQ ID NO:4) de um ADNc codificando B7-H5 de ratinho.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Os requerentes identificaram, *inter alia*, um membro da família B7 de moléculas coestimulantes, que foi designado por B7-H5 para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero. São revelados ambos os polipéptidos B7-H5 de humano e de ratinho e nucleótidos codificando os mesmos. Similares a outros membros da família B7, estes polipéptidos B7-H5 podem coestimular células T.

Moléculas de ácido nucleico

As moléculas de ácido nucleico de B7-H5 do invento podem ser ADNc, ADN genómico, ADN sintético ou ARN, e podem ser de cadeia dupla ou de cadeia simples (*i.e.*, uma cadeia quer em sentido quer antissentido ou ambas). Fragmentos destas moléculas são também considerados dentro do âmbito do invento, e podem ser produzidos, por exemplo, pela reacção em cadeia da polimerase (PCR) ou gerados por tratamento com uma ou mais endonucleases de restrição. Uma molécula de ácido ribonucleico (ARN) pode ser produzida por transcrição *in vitro*. Preferivelmente, as moléculas de ácido nucleico codificam polipéptidos que, independentemente do comprimento, são solúveis sob condições fisiológicas normais.

As moléculas de ácido nucleico do invento podem conter sequências de ocorrência natural ou sequências que diferem

das que ocorrem naturalmente mas que, devido à degenerescência do código genético, codificam o mesmo polipéptido (por exemplo, os polipéptidos com as SEQ ID NOs:1 ou 3). Adicionalmente, estas moléculas de ácido nucleico não estão limitadas a sequências de codificação, e.g., podem incluir algumas ou a totalidade das sequências de não codificação que se situam a montante ou a jusante de uma sequência de codificação.

Ácidos nucleicos do invento podem ser análogos de ácido nucleico. Os análogos de ácido nucleico podem estar modificados na porção base, na porção açúcar ou na espinha dorsal de fosfato. Uma tal modificação pode melhorar, por exemplo, a estabilidade, a hibridização ou a solubilidade do ácido nucleico. Modificações na porção de base podem incluir desoxiuridina em vez de desoxitimidina, e 5-metil-2'-desoxicitidina ou 5-bromo-2'-desoxicitidina em vez de desoxicitidina. Modificações da porção açúcar podem incluir modificação do hidroxilo 2' do açúcar ribose para formar 2'-O-metilo ou 2'-O-alilo. A espinha dorsal de desoxirribose-fosfato pode ser modificada para produzir ácidos nucleicos de morfolino, nos quais cada porção de base está ligada a um anel morfolino de seis membros, ou ácidos nucleicos de péptido, nos quais a espinha dorsal de desoxifosfato está substituída por uma espinha dorsal de pseudopéptido e as quatro bases são mantidas. Ver, por exemplo, Summerton e Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195; e Hyrup et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4:5-23. Adicionalmente, a espinha dorsal de desoxifosfato pode ser substituída, por exemplo, por uma espinha dorsal de fosforotioato ou fosforoditioato, uma de fosforamidito, ou uma espinha dorsal de fosfotriéster de alquilo.

As moléculas de ácido nucleico do invento podem ser sintetizadas (por exemplo, por síntese baseada em fosforamidito) ou obtidas a partir de uma célula biológica, tal como a célula de um mamífero. Assim, os ácidos nucleicos podem ser aqueles de um humano, primata não humano (e.g., macaco), ratinho, rato, cobaia, vaca, ovelha, cavalo, porco, coelho, cão ou gato.

Adicionalmente, as moléculas isoladas de ácido nucleico do invento abrangem segmentos que não são encontradas como tal no estado natural. Assim, o invento abrange moléculas de ácido nucleico recombinante (por exemplo, moléculas de ácido nucleico isoladas codificando B7-H5) incorporadas num vector (por exemplo, um plasmídeo ou vector viral) ou no genoma de uma célula heteróloga ou no genoma de uma célula homóloga numa outra posição que não a localização cromossômica natural. Moléculas de ácido nucleico recombinante e utilizações das mesmas são descritas adicionalmente abaixo.

Certas moléculas de ácido nucleico do invento são moléculas antissentido ou estão transcritas em moléculas antissentido. Estas podem ser utilizadas, por exemplo, para regular de modo descendente a tradução de ARNm de B7-H5 dentro de uma célula. Técnicas associadas com a detecção ou regulação de genes são bem conhecidas dos técnicos competentes e estas técnicas podem ser utilizadas para diagnosticar e/ou tratar perturbações associadas a expressão aberrante de B7-H5. Moléculas de ácido nucleico do invento são adicionalmente descritas abaixo no contexto da sua utilidade terapêutica.

Um gene ou proteína da família B7-H5 pode ser identificado com base na sua similaridade com o gene ou proteína de B7-H5 relevante, respectivamente. Por exemplo, a identificação pode ser baseada na identidade de sequência. O invento apresenta moléculas de ácido nucleico isoladas que são idênticas a, ou são pelo menos 85% (ou 95%, ou 98%) idênticas a: (a) uma molécula de ácido nucleico que codifica o polipéptido da SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3; (b) a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:2 ou da SEQ ID NO:4; ou (c) uma molécula de ácido nucleico que inclui um segmento de pelo menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ou 933 nucleótidos da SEQ ID NO:2 ou pelo menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ou 929 nucleótidos de SEQ ID NO:4.

A determinação da percentagem de identidade entre duas sequências é efectuada utilizando o algoritmo matemático de Karlin e Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5877, 1993. Este algoritmo está incorporado nos programas BLASTN e BLASTP de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410. As pesquisas de nucleótidos BLAST são realizadas com o programa BLASTN, "score" = 100, "wordlength" = 12 para obter sequências de nucleótidos homólogas aos ácidos nucleicos codificando B7-H5. As pesquisas de proteína BLAST são realizadas com o programa BLASTP, "score" = 50, "wordlength" = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas a B7-H5. Para obter alinhamentos com espaços por preencher para efeitos comparativos, utiliza-se Gapped BLAST como descrito em Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402. Quando se utilizam os programas BLAST e Gapped BLAST, utilizam-se os parâmetros por defeito dos programas respectivos (*e.g.*, XBLAST e NBLAST) (ver ncbi.nlm.nih.gov).

Pode-se também utilizar hibridização como uma medida da homologia entre duas sequências de ácido nucleico. Uma sequência de ácido nucleico codificando B7-H5, ou uma sua porção, pode ser utilizada como sonda de hibridização de acordo com técnicas de hibridização padrão. A hibridização de uma sonda de B7-H5 com ADN a partir de uma fonte de teste (*e.g.*, uma célula de mamífero) é uma indicação da presença de ADN de B7-H5 na fonte de teste. As condições de hibridização são conhecidas dos peritos na especialidade e podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991. Condições de hibridização moderadas são definidas como equivalentes a hibridização em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 2x a 30°C, seguida de uma ou mais lavagens em SSC 1x, 0,1% de SDS a 50-60°C. Condições altamente estridentes são definidas como equivalentes a hibridização em cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 6x a 45°C, seguida de uma ou mais lavagens em SSC 0,2x, 0,1% de SDS a 50-65°C.

Os vectores podem abranger: (a) vectores que contêm qualquer das sequências de codificação anteriores relacionadas com B7-H5 e/ou seus complementos (isto é, sequência "antissentido"); (b) vectores de expressão que contêm qualquer das sequências de codificação anteriores

relacionadas com B7-H5 ligadas operavelmente a um ou mais elementos reguladores de transcrição/tradução (exemplos dos quais são apresentados abaixo) que dirigem a expressão das sequências de codificação; (c) vectores de expressão contendo, para além de sequências codificando um polipéptido B7-H5, sequências de ácido nucleico que não estão relacionadas com sequências de ácido nucleico codificando B7-H5, tais como moléculas codificando um repórter, marcador ou um péptido de sinal, e.g., fundidas com B7-H5; e (d) células hospedeiras modificadas por engenharia genética que contêm qualquer dos vectores de expressão anteriores e por esse motivo expressam as moléculas de ácido nucleico do invento.

Moléculas de ácido nucleico recombinante podem conter uma sequência codificando B7-H5 possuindo uma sequência de sinal heteróloga. O polipéptido B7-H5 a todo o comprimento, um domínio de B7-H5 ou um seu fragmento podem estar fundidos com polipéptidos adicionais, como descrito abaixo. Similarmente, as moléculas de ácido nucleico do invento podem codificar a forma madura de B7-H5 ou uma forma que inclui um polipéptido exógeno que facilita a secreção.

Os elementos reguladores da transcrição/tradução referidos acima e que são adicionalmente descritos abaixo, incluem, mas não estão limitados a, promotores induzíveis e não induzíveis, intensificadores, operadores e outros elementos, que são conhecidos dos peritos na especialidade, e que guiam ou de outro modo regulam a expressão génica. Estes elementos reguladores incluem mas não estão limitados ao gene precoce imediato de citomegalovírus, os promotores precoce ou tardio de adenovírus SV40, o sistema lac, o sistema *trp*, o sistema TAC, o sistema TRC, as regiões de operador e promotor principais de fago A, as regiões de controlo de proteína fd coat, o promotor para 3-fosfoglicerato-quinase, os promotores de fosfatase ácida, e os promotores dos factores de acasalamento α de levedura.

Similarmente, o ácido nucleico pode formar parte de um gene híbrido codificando sequências de polipéptido adicionais, por exemplo, sequências que funcionam como um marcador ou repórter. Exemplos de genes de marcador ou repórter incluem β -lactamase, cloranfenicol-acetiltransferase

(CAT), adenosina-desaminase (ADA), aminoglicósido-fosfotransferase (neo^r , G418^r), di-hidrofolato-redutase (DHFR), higromicina-B-fosfotransferase (HPH), timidina-quinase (TK), *lacZ* (codificando β -galactosidase) e xantina-guanina-fosforribosiltransferase (XGPRT). Tal como com muitos dos procedimentos padrão associados com a prática do invento, os técnicos competentes estarão conhecedores de reagentes úteis adicionais, por exemplo, sequências adicionais podem servir a função de um marcador ou repórter. Em geral, o polipéptido híbrido incluirá uma primeira porção e uma segunda porção; a primeira porção sendo um polipéptido B7-H5 (ou qualquer dos fragmentos de um tal polipéptido aqui revelado) e a segunda porção sendo, por exemplo, o repórter descrito acima ou uma região constante de Ig ou parte de uma região constante de Ig, e.g., os domínios CH2 e CH3 de IgG2a.

Os sistemas de expressão que podem ser utilizados para efeitos do invento incluem, mas não estão limitados a, microrganismos tais como bactérias (por exemplo, *E. coli* e *B. subtilis*) transformadas com vectores de expressão de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plasmídeo ou ADN de cosmídeo, contendo as moléculas de ácido nucleico do invento; levedura (por exemplo, *Saccharomyces* e *Pichia*) transformada com vectores de expressão de levedura recombinante contendo as moléculas de ácido nucleico do invento, preferivelmente contendo uma sequência de ácido nucleico (e.g., SEQ ID NO:2 ou 4) codificando um polipéptido B7-H5; sistemas de células de insecto infectadas com vectores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus) contendo as moléculas de ácido nucleico do invento; sistemas de células de plantas infectadas com vectores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e vírus do mosaico do tabaco (TMV)) ou transformadas com vectores de expressão de plasmídeo recombinante (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo sequências de nucleótidos de B7-H5; ou sistemas de células de mamífero (por exemplo, células COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI38 e NIH 3T3) albergando construções de expressão recombinantes contendo promotores derivados do genoma de células de mamífero (por exemplo, o promotor de metalotioneína) ou a partir de vírus de mamífero (por exemplo, o promotor tardio de adenovírus e o promotor 7.5K de vírus vacínia). Células primárias ou secundárias obtidas

directamente a partir de um mamífero transfectado com um vector de plasmídeo ou infectado com um vector viral são também úteis como células de hospedeiro.

Pode-se utilizar uma célula de hospedeiro (e.g., uma célula procariótica ou uma célula eucariótica tal como uma célula COS), por exemplo, para produzir os polipéptidos coestimulantes aqui proporcionados. Em algumas concretizações, pode-se utilizar uma célula de hospedeiro (e.g., uma APC) para expressar os polipéptidos coestimulantes do invento para apresentação a uma célula T.

Polipéptidos e fragmentos de polipéptido

Os polipéptidos do invento incluem B7-H5 e seus fragmentos funcionais. Os polipéptidos aqui revelados incluem também proteínas de fusão que contêm quer B7-H5 a todo o comprimento quer um seu fragmento funcional fundido com uma sequência de aminoácidos não relacionada. As sequências não relacionadas podem ser domínios funcionais adicionais ou péptidos de sinal. Os péptidos de sinal são descritos em maior detalhe e exemplificados abaixo. Os polipéptidos podem também ser quaisquer dos acima descritos mas com uma ou mais substituições conservativas.

Os polipéptidos podem ser purificados a partir de fontes naturais (e.g., sangue, plasma de soro, tecidos ou células tais como células T ou qualquer célula que produz naturalmente B7-H5). Os polipéptidos podem também ser convenientemente sintetizados por meios químicos padrão. Adicionalmente, os polipéptidos podem ser produzidos por técnicas padrão de ADN recombinante *in vitro* e recombinação/recombinação genética *in vivo* (e.g., transgênese), utilizando as sequências de nucleótidos codificando os polipéptidos apropriados. Podem-se utilizar métodos bem conhecidos dos peritos na especialidade para construir vectores de expressão contendo sequências de codificação relevantes e sinais de controlo de transcrição/tradução apropriados. Ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.^a Ed.) (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989) e Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular*

Biology, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989).

Polipéptidos e fragmentos do invento incluem também aqueles descritos acima, mas modificados para utilização *in vivo* pela adição, às extremidades do terminal amino e/ou do terminal carboxilo, de um agente bloqueador para facilitar a sobrevivência do polipéptido relevante *in vivo*. Isto pode ser útil naquelas situações em que os terminais de péptido tendem a ser degradados por proteases antes da absorção celular. Estes agentes bloqueadores podem incluir, sem limitação, sequências peptídicas relacionadas ou não relacionadas adicionais que podem ser ligadas aos resíduos terminais amino e/ou carboxilo do péptido a ser administrado. Isto pode ser efectuado quer quimicamente durante a síntese do péptido quer por tecnologia de ADN recombinante por métodos familiares dos técnicos medianamente competentes.

Alternativamente, agentes bloqueadores tais como ácido piroglutâmico ou outras moléculas conhecidas na especialidade podem ser ligados aos resíduos dos terminais amino e/ou carboxilo, ou o grupo amino no terminal amino ou o grupo carboxilo no terminal carboxilo podem ser substituídos por uma porção diferente. Do mesmo modo, os péptidos podem ser acoplados covalentemente ou não covalentemente a proteínas "transportadoras" farmacologicamente aceitáveis antes da administração.

Os polipéptidos B7-H5 podem ser purificados utilizando, por exemplo, métodos cromatográficos tais como cromatografia de permuta iónica DEAE, filtração em gel e hidroxiapatite. Por exemplo, um polipéptido B7-H5 num sobrenadante de cultura de células ou num extracto citoplásmico pode ser purificado utilizando uma coluna de proteína G. Em algumas concretizações, polipéptidos B7-H5 podem ser "transformados por engenharia" para conterem uma sequência de aminoácidos que permite aos polipéptidos serem capturados sobre uma matriz de afinidade. Por exemplo, um marcador tal como c-myc, glutathione-S-transferase (GST), hemaglutinina, poli-histidina ou Flag™ (Kodak) pode ser utilizado para auxiliar na purificação de polipéptido. Estes marcadores podem ser inseridos em qualquer local dentro do polipéptido, incluindo

em qualquer dos terminais carboxilo ou amino. Pode-se também utilizar cromatografia de imunoafinidade para purificar polipéptidos coestimulantes.

São também de interesse compostos peptidomiméticos que são desenhados com base nas sequências de aminoácidos dos fragmentos de péptido funcionais. Compostos peptidomiméticos são compostos sintéticos possuindo uma conformação tridimensional (*i.e.*, um "motivo peptídico") que é substancialmente a mesma que a conformação tridimensional de um péptido seleccionado. O motivo peptídico proporciona ao composto peptidomimético a capacidade para coestimular células T de um modo qualitativamente idêntico ao do fragmento de péptido funcional B7-H5 a partir do qual o peptidomimético foi derivado. Compostos peptidomiméticos podem ter características adicionais que melhoram a sua utilidade terapêutica, tal como permeabilidade celular aumentada e meia-vida biológica prolongada.

Os peptidomiméticos tipicamente possuem uma espinha dorsal que é parcialmente ou completamente um não péptido, mas com grupos laterais que são idênticos aos grupos laterais dos resíduos aminoácido que ocorrem no péptido no qual o peptidomimético é baseado. Vários tipos de ligações químicas, *e.g.*, ligações éster, tioéster, tioamida, retroamida, carbonilo reduzido, dimetileno e cetometileno, são conhecidos na especialidade como substitutos geralmente úteis para ligações peptídicas na construção de peptidomiméticos resistentes a protease.

Métodos de coestimulação de uma célula T

Os métodos do invento envolvem contacto de uma célula T com um polipéptido B7-H5 do invento, ou um seu fragmento funcional, de modo a coestimular a célula T. Estes polipéptidos ou fragmentos funcionais podem ter sequências de aminoácidos idênticas a sequências do tipo selvagem ou podem conter uma ou mais substituições conservativas. O contacto pode ocorrer antes, durante ou após activação da célula T. Preferivelmente, o contacto da célula T com o polipéptido B7-H5 será substancialmente ao mesmo tempo que a activação. Activação pode ser, por exemplo, por exposição da célula T a

um anticorpo que se liga ao receptor de célula T (TCR) ou a um dos polipéptidos do complexo CD3 que está fisicamente associado ao TCR. Alternativamente, a célula T pode ser exposta quer a um aloantígeno (e.g., um aloantígeno de histocompatibilidade principal (MHC)), por exemplo, sobre uma célula de apresentação de antígeno (APC) (e.g., uma célula dendrítica, um macrófago, um monócito ou uma célula B) quer a um péptido antigénico produzido por processamento de um antígeno de proteína por qualquer das APC anteriores e apresentado à célula T por moléculas de MHC sobre a superfície da APC. A célula T pode ser uma célula T CD4⁺ ou uma célula T CD8⁺. O polipéptido B7-H5 pode ser adicionado à solução contendo as células, ou pode ser expresso sobre a superfície de uma APC, e.g., uma APC apresentando um aloantígeno ou um péptido antigénico ligado a uma molécula de MHC. Alternativamente, se a activação é *in vitro*, o polipéptido B7-H5 pode ser ligado a uma superfície do vaso de cultura relevante, e.g., um poço de uma placa de microtitulação de plástico.

Os métodos são realizados *in vitro*. A aplicação *in vitro* de B7-H5 pode ser útil, por exemplo, em estudos científicos básicos de mecanismos imunitários ou para produção de células T activadas para utilização quer em estudos sobre a função de células T quer, por exemplo, em imunoterapia passiva. Adicionalmente, pode-se adicionar B7-H5 a ensaios *in vitro* (e.g., em ensaios de proliferação de células T) desenhados para testar um antígeno de interesse quanto à imunidade num sujeito a partir do qual as células T foram obtidas. Será de esperar que adição de B7-H5 a estes ensaios resulte numa resposta *in vitro* mais potente e por isso mais facilmente detectável.

Os polipéptidos B7-H5 e seus variantes são geralmente úteis como agentes terapêuticos estimulantes da resposta imunitária. Por exemplo, os polipéptidos do invento podem ser utilizados para tratamento de condições de doença caracterizadas por imunossupressão: e.g., cancro, SIDA ou complexo relacionado com a SIDA, outras condições induzidas por vírus ou pelo ambiente, e certas imunodeficiências congénitas. Os polipéptidos podem também ser utilizados para aumentar a função imunitária que foi prejudicada pela

utilização de radioterapia ou fármacos imunossupressores tais como certos agentes quimioterapêuticos, e por conseguinte são particularmente úteis quando administrados em conjunto com tais fármacos ou radioterapia. Os polipéptidos podem, além disso, ser utilizados para intensificar respostas imunitárias em sujeitos normais.

Abordagens *in vivo*

Numa abordagem *in vivo*, um polipéptido B7-H5 (ou um seu fragmento funcional) é ele próprio administrado ao sujeito. Em geral, os compostos do invento serão suspensos num transportador farmacologicamente aceitável (e.g., solução salina fisiológica) e administrados oralmente ou por perfusão intravenosa, ou injectados subcutaneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intra-rectalmente, intravaginalmente, intranasalmente, intragastricamente, intratraquealmente ou intrapulmonarmente. São preferivelmente entregues directamente a um tecido linfóide apropriado (e.g. baço, nódulo linfático ou tecido linfóide associado a mucosa (MALT, *mucosal-associated lymphoid tissue*)). A dosagem requerida depende da escolha da via de administração, da natureza da formulação, da natureza da doença do paciente, do tamanho, peso, área superficial, idade e sexo do sujeito, de outros fármacos que estão a ser administrados, e do julgamento do médico assistente. Dosagens adequadas estão no intervalo de 0,01-10 mg/kg. São de esperar grandes variações na dosagem necessária em face da variedade de polipéptidos e fragmentos disponíveis e das diferentes eficiências das várias vias de administração. Por exemplo, será de esperar que a administração oral requeira dosagens mais elevadas do que a administração por injeção i.v.. Variações nestes níveis de dosagem podem ser ajustadas utilizando rotinas empíricas padrão para optimização como é bem compreendido na especialidade. As administrações podem ser únicas ou múltiplas (e.g., 2 ou 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 ou mais vezes). A encapsulação do polipéptido num veículo de entrega adequado (e.g., micropartículas poliméricas ou dispositivos implantáveis) podem aumentar a eficiência da entrega, particularmente para entrega oral.

Alternativamente, um polinucleótido contendo uma sequência de ácido nucleico codificando um polipéptido B7-H5 ou um seu fragmento funcional pode ser entregue a uma célula apropriada do animal. A expressão da sequência de codificação será preferivelmente dirigida a tecido linfóide do sujeito, por exemplo, por entrega do polinucleótido ao tecido linfóide. Isto pode ser conseguido, por exemplo, pela utilização de um veículo de entrega polimérico de microcápsula ou micropartícula biodegradável, dimensionado para otimizar a fagocitose por células fagocíticas tais como macrófagos. Por exemplo, podem-se utilizar micropartículas de PLGA (poli-lacto-co-glicólido) com aproximadamente 1-10 μm de diâmetro. O polinucleótido é encapsulado nestas micropartículas, que são incorporadas por macrófagos e gradualmente biodegradadas dentro da célula, libertando por isso o polinucleótido. Uma vez libertado, o ADN é expresso no interior da célula. Um segundo tipo de micropartícula não se destina a ser incorporado directamente por células, mas em vez disso serve principalmente como um reservatório de libertação retardada de ácido nucleico que é incorporado pelas células apenas após libertação a partir das micropartículas por biodegradação. Estas partículas poliméricas deverão por isso ser grandes o suficiente para impossibilitar a fagocitose, *i.e.*, maiores do que 5 μm e preferivelmente maiores do que 20 μm .

Outra forma de conseguir a absorção do ácido nucleico é utilizando lipossomas, preparados por métodos padrão. Os vectores aqui descritos podem ser incorporados sozinhos nestes veículos de entrega ou co-incorporados com anticorpos específicos de tecido. Alternativamente, pode-se preparar um conjugado molecular constituído por um plasmídeo ou outro vector ligado a poli-L-lisina por forças electrostáticas ou covalentes. A poli-L-lisina liga-se a um ligando que se pode ligar a um receptor sobre células alvo (Cristiano *et al.* (1995), *J. Mol. Med.* 73, 479). Alternativamente, o direccionamento específico a tecido linfóide pode ser conseguido pela utilização de elementos reguladores de transcrição (TRE) específicos de tecido linfóide tais como um TRE específico de linfócito B, de linfócito T ou de células dendríticas. Os TREs específicos de tecido linfóide são conhecidos (Thompson *et al.* (1992), *Mol. Cell. Biol.* 12,

1043-1053; Todd *et al.* (1993), *J. Exp. Med.* 177, 1663-1674; Penix *et al.* (1993), *J. Exp. Med.* 178, 1483-1496). A entrega de "ADN nu" (*i.e.*, sem um veículo de entrega) a um local intramuscular, intradérmico ou subcutâneo, é outro meio para conseguir a expressão *in vivo*.

Nos polinucleótidos relevantes (*e.g.*, vectores de expressão) a sequência de ácido nucleico codificando um polipéptido B7-H5 ou fragmento funcional de interesse com um iniciador de metionina e opcionalmente uma sequência de direccionamento é ligada operavelmente a um promotor ou a uma combinação de intensificador-promotor.

Sequências de aminoácido curtas podem actuar como sinais para direccionar proteínas a compartimentos celulares específicos. Por exemplo, péptidos de sinal hidrofóbicos (*e.g.*, MAISGVPVLGFFIIAVLMSAQESWA (SEQ ID NO:7)) são encontrados no terminal amino de proteínas destinadas ao retículo endoplasmático (ER). Enquanto a sequência KFERQ (SEQ ID NO:8) e outras sequências estreitamente relacionadas são conhecidas por direccionarem polipéptidos intracelulares a lisossomas, outras sequências (*e.g.*, MDDQRDLISNNEQLP (SEQ ID NO:9) direccionam polipéptidos a endossomas. Adicionalmente, a sequência peptídica KDEL (SEQ ID NO:10) mostrou actuar como um sinal de retenção para o ER. Cada um destes péptidos de sinal, ou uma sua combinação, pode ser utilizado para conduzir os polipéptidos B7-H5 ou fragmentos funcionais do invento como desejado. ADNs codificando os polipéptidos B7-H5 ou fragmentos funcionais contendo sinais de direccionamento serão gerados por PCR ou outras técnicas padrão de engenharia genética ou de síntese.

Um promotor é um TRE composto de uma região de uma molécula de ADN, tipicamente a menos de 100 pares de base a montante do ponto no qual a transcrição se inicia. Os intensificadores proporcionam especificidade de expressão em termos de tempo, localização e nível. Ao contrário de um promotor, um intensificador pode funcionar quando localizado a distâncias variáveis do local de transcrição, desde que esteja presente um promotor. Um intensificador pode também estar localizado a jusante do local de início da transcrição. Para colocar uma sequência de codificação sob o controlo de

um promotor, é necessário posicionar o local de início da tradução da moldura de leitura de tradução do péptido ou polipéptido entre um e cerca de cinquenta nucleótidos a jusante (3') do promotor. A sequência de codificação do vector de expressão está ligada operavelmente a uma região de terminação da transcrição.

Vectores de expressão adequados incluem plasmídeos e vectores virais tais como vírus herpes, retrovírus, vírus vacínia, vírus vacínia atenuados, vírus *canary pox*, adenovírus e vírus adeno-associados, entre outros.

Os polinucleótidos podem ser administrados num transportador farmacologicamente aceitável. Transportadores farmacologicamente aceitáveis são veículos biologicamente compatíveis que são adequados para administração a um humano, e.g., solução salina fisiológica. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é uma quantidade do polinucleótido que é capaz de produzir um resultado medicamente desejável (e.g., uma resposta de célula T melhorada) num animal tratado. Como é bem conhecido nas especialidades médicas, a dosagem para um qualquer paciente depende de muitos factores, incluindo o tamanho, área superficial corporal, idade do paciente, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, estado de saúde geral e outros fármacos administrados concorrentemente. As dosagens variarão, mas uma dosagem preferida para administração de polinucleótido é de aproximadamente 10^6 a 10^{12} cópias da molécula de polinucleótido. Esta dose pode ser administrada repetidamente, como necessário. As vias de administração podem ser quaisquer das acima listadas.

Nestas abordagens *in vivo*, incluem-se métodos de coestimulação de uma célula T que envolvem a administração de mais do que uma molécula coestimulante ou seu fragmento funcional. Estas combinações podem ser qualquer combinação de um ou mais polipéptidos coestimulantes, e.g., B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, 4-1BB, OX40 ou HVEM e fragmentos funcionais de quaisquer destes. Podem-se administrar as proteínas ou fragmentos funcionais *per se* ou podem-se administrar ácidos nucleicos (e.g., vectores de expressão) codificando as proteínas ou fragmentos funcionais.

Quando se utilizam vectores de expressão, pode-se administrar um único vector contendo sequências de codificação para dois ou mais dos polipéptidos coestimulantes ou fragmentos funcionais. Alternativamente, podem-se administrar múltiplos vectores individuais (e.g., 2, 3, 4, 5 ou 6), cada um codificando um ou mais (e.g., 2, 3, 4, 5 ou 6) dos polipéptidos coestimulantes ou seus fragmentos funcionais.

Abordagens ex vivo

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) podem ser retiradas do paciente ou de um dador adequado e expostas *ex vivo* a um estímulo de activação (ver acima) e a um polipéptido B7-H5 ou fragmento de polipéptido (quer em forma solúvel quer fixado a um suporte sólido por metodologias padrão). As PBMC contendo células T altamente activadas são depois introduzidas no mesmo paciente ou num paciente diferente.

Uma estratégia alternativa *ex vivo* pode envolver transfecção ou transdução de células obtidas a partir do sujeito com um polinucleótido codificando um polipéptido B7-H5 ou sequências de ácido nucleico codificando um fragmento funcional descritos acima. As células transfectadas ou transduzidas são depois retornadas ao sujeito. Estas células são preferivelmente células hematológicas (e.g., células de medula óssea, macrófagos, monócitos, células dendríticas ou células B), ainda que possam também ser de qualquer de uma ampla variedade de tipos incluindo, sem limitação, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos ou células de músculo no qual actuam como fonte do polipéptido B7-H5 ou seu fragmento funcional enquanto sobreviverem no sujeito. A utilização de células hematológicas que incluem as APC anteriores seria particularmente vantajosa pelo facto de se esperar que estas células se alojem, entre outros, no tecido linfóide (e.g., nódulos linfáticos ou baço) e assim o polipéptido B7-H5 ou fragmento funcional seria produzido em elevada concentração no local onde exerce o seu efeito, *i.e.*, intensificação de uma resposta imunitária. Adicionalmente, se se utilizam APCs, a APC que expressa a molécula B7-H5 exógena pode ser a mesma APC que apresenta um aloantigénio ou péptido

antigénico à célula T relevante. Os polipéptidos B7-H5 podem ser segregados pela APC ou expressos sobre a sua superfície. Antes de devolver as APCs recombinantes ao paciente, estas podem ser opcionalmente expostas a fontes de antigénios ou péptidos antigénicos de interesse, e.g., os de tumores, microrganismos infecciosos ou autoantigénios. As mesmas construções genéticas e sequências de transporte descritas para a abordagem *in vivo* podem ser utilizadas para esta estratégia *ex vivo*. Além disso, células de tumor, preferivelmente obtidas a partir de um paciente, podem ser transfectadas ou transformadas por um vector codificando um polipéptido B7-H5 ou seu fragmento funcional. As células de tumor, preferivelmente tratadas com um agente (e.g., irradiação ionizante) que retira a sua capacidade proliferativa, são depois devolvidas ao paciente onde, devido à sua expressão dos polipéptidos B7-H5 exógenos (sobre a sua superfície celular ou segregados), podem estimular respostas imunitárias de células T tumorícidas melhoradas. É entendido que as células de tumor que, após transfecção ou transformação, são injectadas no paciente podem também ter sido obtidas originalmente a partir de um outro indivíduo que não o paciente.

Os métodos *ex vivo* incluem os passos de colher as células a partir de um sujeito, cultivar as células, transduzir estas com um vector de expressão e manter as células sob condições adequadas para expressão do polipéptido B7-H5 ou fragmento funcional. Estes métodos são conhecidos na especialidade da biologia molecular. O passo de transdução é realizado por quaisquer meios convencionais utilizados para terapia génica *ex vivo*, incluindo fosfato de cálcio, lipofecção, electroporação, infecção viral e transferência génica biolística. Alternativamente, podem-se utilizar lipossomas ou micropartículas poliméricas. Células que foram transduzidas com sucesso são depois seleccionadas, por exemplo, quanto à expressão da sequência de codificação ou de um gene de resistência a um fármaco. As células podem depois ser irradiadas letalmente (se desejado) e injectadas ou implantadas no paciente.

É entendido que nestes procedimentos *ex vivo*, as células a introduzir num sujeito podem ser transfectadas ou

transformadas com um ou mais (e.g., dois, três, quatro, cinco ou seis) vectores de expressão contendo uma ou mais (e.g., duas, três, quatro, cinco ou seis) sequências codificando qualquer das moléculas coestimulantes listadas acima (e.g., B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4 ou B7-H5) ou seus fragmentos funcionais antes da introdução.

Métodos de rastreio para compostos que inibem ou intensificam respostas imunitárias

O invento proporciona métodos para testar compostos (moléculas pequenas ou macromoléculas) que inibem ou intensificam uma resposta imunitária. Um tal método pode envolver, e.g., cultivar um polipéptido B7-H5 do invento (ou um seu fragmento funcional) com células T na presença de um estímulo de célula T (ver acima). A molécula B7-H5 pode estar em solução ou ligada à membrana (e.g., expressa sobre a superfície das células T) e pode ser natural ou recombinante. Adicionalmente, os polipéptidos B7-H5 (ou seus fragmentos funcionais) podem ter sequências de aminoácidos idênticas às sequências do tipo selvagem ou podem ter uma ou mais substituições conservativas. Compostos que inibem a resposta de célula T serão provavelmente compostos que inibem uma resposta imunitária enquanto aqueles que intensificam a resposta de célula T serão provavelmente compostos que melhoram uma resposta imunitária.

O invento refere-se também à utilização de B7-H5 ou seus fragmentos funcionais para rastreio de compostos imunomoduladores que podem interactuar com B7-H5. Um perito na especialidade saberá como utilizar modelação molecular padrão ou outras técnicas para identificar pequenas moléculas que se ligarão a locais de B7-H5 interactivos com células T. Um destes exemplos é proporcionado em Broughton (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 392-398.

Um composto candidato composto pode modular, e.g., inibir ou intensificar, uma resposta imunitária. Um composto candidato que causa uma necessidade de pelo menos 1,5 vezes (e.g., 2 vezes, 4 vezes, 6 vezes, 10 vezes, 150 vezes, 1000 vezes, 10 000 vezes ou 100 000 vezes) mais de B7-H5 de modo a conseguir um nível arbitrário definido de activação de célula

T do que na ausência do composto pode ser útil para inibir uma resposta imunitária. Por outro lado, um composto candidato que causa uma necessidade de pelo menos 1,5 vezes (e.g., 2 vezes, 4 vezes, 6 vezes, 10 vezes, 100 vezes, 1000 vezes, 10 000 vezes ou 100 000 vezes) menos de B7-H5 para conseguir um nível arbitrário definido de activação de célula T do que na ausência do composto pode ser útil para intensificar uma resposta imunitária. Compostos capazes de interferir com ou modular a função de B7-H5 são bons candidatos para agentes immunorreguladores immunossupressores, e.g., para modular uma resposta auto-imune ou suprimir a rejeição de enxertos alogénicos ou xenogénicos.

Anticorpos B7-H5

O invento apresenta anticorpos que se ligam aos polipéptidos B7-H5 ou fragmentos destes polipéptidos. Estes anticorpos podem ser anticorpos policlonais presentes no soro ou plasma de animais (e.g., ratinhos, coelhos, ratos, cobaias, ovelhas, cavalos, cabras, vacas ou porcos) que foram imunizados com o polipéptido B7-H5 ou fragmento de péptido relevante utilizando métodos, e opcionalmente adjuvantes, conhecidos na especialidade. Estes anticorpos policlonais podem ser isolados a partir do soro ou plasma por métodos conhecidos na especialidade. Anticorpos monoclonais que se podem ligar aos polipéptidos ou fragmentos anteriores estão também abrangidos pelo invento, e.g., o anticorpo monoclonal 5H9 ou 1H11 aqui revelados. São bem conhecidos na especialidade métodos de preparação e rastreio de anticorpos monoclonais.

Uma vez seleccionado e clonado o hibridoma desejado produtor de anticorpos, o anticorpo resultante pode ser produzido por qualquer de vários métodos conhecidos na especialidade. Por exemplo, o hibridoma pode ser cultivado *in vitro* num meio adequado durante um intervalo de tempo adequado, seguindo-se a recuperação do anticorpo desejado a partir do sobrenadante. O intervalo de tempo e meio são conhecidos ou podem ser determinados facilmente.

Adicionalmente, anticorpos recombinantes específicos para B7-H5, tais como anticorpos monoclonais quiméricos e

humanizados compreendendo porções tanto humanas como não humanas, estão dentro do âmbito do invento. Estes anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados podem ser produzidos por técnicas de ADN recombinante conhecidas na especialidade, por exemplo, utilizando métodos descritos em Robinson *et al.*, Publicação do Pedido de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira *et al.*, Pedido de Patente Europeia 184 187; Taniguchi, Pedido de Patente Europeia 171 496; Morrison *et al.*, Pedido de Patente Europeia 173 494; Neuberger *et al.*, Pedido de Patente PCT WO 86/01533; Cabilly *et al.*, Patente dos E.U.A. N.º 4 816 567; Cabilly *et al.*, Pedido de Patente Europeia 125 023; Better *et al.* (1988) *Science* 240, 1041-43; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139,3521-26; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 214-18; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47, 999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314, 446-49; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1553-59; Morrison, (1985) *Science* 229, 1202-07; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4, 214; Winter, Patente dos E.U.A. N.º 5 225 539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321, 552-25; Veroeayan *et al.* (1988) *Science* 239, 1534; e Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141, 4053-60.

São também incluídos no âmbito do invento fragmentos e derivados de anticorpo que contêm pelo menos a porção funcional do domínio de ligação de antigénio de um anticorpo que se liga especificamente a B7-H5. Fragmentos de anticorpo que contêm o domínio de ligação da molécula podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, estes fragmentos incluem, mas não estão limitados a: fragmentos F(ab')₂ que podem ser produzidos por digestão com pepsina de moléculas de anticorpo; fragmentos Fab que podem ser gerados por redução das pontes de dissulfureto de fragmentos F(ab')₂; e fragmentos Fab que podem ser gerados por tratamento de moléculas de anticorpo com papaína e um agente de redução. Ver, e.g., National Institutes of Health, 1 Current Protocols In Immunology, Coligan *et al.*, ed. 2.8, 2.10 (Wiley Interscience, 1991). Fragmentos de anticorpo incluem também fragmentos Fv (e.g., Fv de cadeia simples (scFv)), i.e., produtos de anticorpo nos quais não existem quaisquer resíduos de aminoácido da região constante. Estes fragmentos podem ser produzidos, por exemplo, como descrito na Patente dos E.U.A. N.º 4 642 334.

Estrutura de moléculas da família B7-CD28

Todas as moléculas semelhantes a B7, *e.g.*, B7-H5, e seus receptores são glicoproteínas transmembrana de tipo I e são membros da superfamília de imunoglobulina (Ig). Os membros da família B7 partilham 20-35% de identidade nas suas sequências de aminoácido. Apesar desta baixa homologia em composição de aminoácidos primários, estas moléculas partilham uma estrutura secundária similar: domínio extracelular tipo IgC e IgV único. Quatro resíduos cisteína, que estão envolvidos na formação das ligações dissulfureto dos domínios IgV e IgC, estão bem conservados. Os receptores para a família B7 são membros da família CD28, e possuem um domínio extracelular tipo IgV único. As suas caudas citoplásmicas contêm motivos SH2 e SH3 putativos que se pensa estarem envolvidos em transdução de sinal.

As estruturas terciárias para ligandos e receptores da superfamília B7-CD28 têm sido determinadas por cristalografia e modelação molecular. As interações de pares receptor-ligando são mediadas predominantemente através de resíduos nos seus domínios IgV. Em geral, os domínios IgV são descritos como cadeias β em duas camadas com folhas "frontal" e "traseira". As folhas frontal e traseira do domínio IgV de CTLA-4 consistem de cadeias A'GFCC' e ABEDC", respectivamente, enquanto as folhas frontal e traseira dos domínios IgV de B7-1/B7-2 são compostas de cadeias AGFCC'C" e BED, respectivamente. As faces de ligação entre CTLA-4/CD28 e B7-1/B7-2 são dominadas pela interação da laçada análoga CDR3 de CTLA-4/CD28, centrada no motivo MYPPPY, com a superfície formada predominantemente por resíduos conservados entre B7-1 e B7-2 nas cadeias G, F, C, C' e C". O motivo MYPPPY não é conservado em moléculas coestimulantes induzíveis (ICOS), mas uma sequência FDPPPF relacionada na posição análoga está identificada como um determinante principal para ligação de ICOS a B7-H2. Ainda que a localização dos locais de ligação de PD-1 em B7-H1/B7-DC corresponda aos locais de ligação de CTLA-4/CD28 em B7-1/B7-2, B7-H1 e B7-DC utilizam resíduos não conservados na sua face A'GFCC'C" para se ligarem a PD-1. Estruturas cristalinas de complexos CTLA-4/B7 contêm homodímeros bivalentes de CTLA-4 com locais de ligação de B7 localizados distalmente em

relação à interface do dímero de CTLA-4, o que sugere que o homodímero de CTLA-4 se pode ligar a homodímeros não covalentes de B7-1 ou B7-2 para formar uma malha de interações CTLA-4/B7. Pensa-se que a formação de uma tal malha desencadeia a formação de complexos de sinalização estáveis como parte da sinapse imunológica. Um perito na especialidade reconhecerá que a estrutura tridimensional de moléculas B7-H5 é provavelmente similar à de outros membros da família B7.

O exemplo seguinte pretende ilustrar, não limitar, o invento.

EXEMPLO

Um ADNc de B7-H5 de humano (Fig. 1; SEQ ID NO:5) foi identificado a partir da base de dados NCBI com base em homologia com outras moléculas da família B7, incluindo B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H1 (PD-L1), B7-H2 (B7h/B7RP-1), B7-H3, B7-DC (PD-L2) e B7-H4 (B7x). ADNc de B7-H5 de humano a todo o comprimento (Fig. 9; SEQ ID NO:2) foi amplificado por PCR com polimerase PFU (Stratagene, CA) a partir de ADNc de placenta de humano (Clontech, CA), clonado no vector pcDNA™3.1⁻ (Invitrogen, CA) e confirmado por sequenciação de ADN. Um ADNc de B7-H5 de ratinho (Fig. 2, SEQ ID NO:6) foi identificado a partir das bases de dados NCBI e Celera com base na homologia com as mesmas moléculas da família B7. Para isolar o homólogo de B7-H5 de ratinho, utilizaram-se vários conjuntos de iniciadores com base em sequências EST de ratinho e humano para amplificar ADNc de B7-H5 de ratinho (Fig. 10; SEQ ID NO:4) a partir de ADNc de baço de um ratinho C57BL/6 (B6). ADNc de B7-H5 de ratinho a todo o comprimento foi clonado similarmente em vector pcDNA™3.1⁻ e confirmado por sequenciação de ADN.

Modelos moleculares dos domínios V N terminais de B7-H5 de humano (Fig. 5) e B7-H5 de ratinho foram construídos por modelação de homologia com base nas estruturas de raios X de CD80 e CD86 de humano (Stamper *et al.*, 2001, *Nature* 410:08-611; Schwartz *et al.*, 2001, *Nature* 410:604-608) utilizando MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Quebec, Canada). Inserções e deleções em B7-H5 de

ratinho e de humano em relação ao(s) modelo(s) estrutural(is) foram modelados utilizando um procedimento de emparelhamento de segmentos de uma base de dados de proteína (Levitt, 1992, *J. Mol. Biol.* 226:07-533; Fechteler et al., 1995, *J. Mol. Biol.* 253:114-131) implementado em MOE. Substituições de cadeia lateral foram realizadas utilizando uma biblioteca de rotâmeros (Ponder e Pichards, 1987, *J. Mol. Biol.* 193:775-791) extraída a partir de estruturas de base de dados de proteína de alta resolução (Berman et al., 2000, *Nucleic Acids Res.* 28:235-242). Os contactos intramoleculares e a estereoquímica dos modelos foram otimizados por minimização de energia limitada utilizando parâmetros de campo de força de proteína (Engh e Huber, 1991, *Acta Crystallogr.* A47:392-400). Realizaram-se estudos de mapeamento de resíduos e análise gráfica de computador com InsightII (MSI, CA). Foi previsto que ambos os polipéptidos B7-H5 de humano e ratinho contêm um domínio tipo IgV, que está envolvido na interacção de moléculas B7 com os seus receptores cognatos. É também previsto que os polipéptidos B7-H5 de humano e ratinho contêm um domínio transmembrana único, uma cisteína que se prevê estar envolvida em dimerização, e.g., heterodimerização, e uma tirosina no domínio citoplásmico que se prevê ser fosforilada durante a sinalização. Duas cisteínas estruturais, como indicado na Fig. 3, contribuem muito provavelmente para a formação do domínio IgV. Aminoácidos adicionais podem formar uma região tipo domínio constante de imunoglobulina não típica como indicado na Fig. 5.

A Fig. 6 mostra um alinhamento das sequências de domínio V da superfamília de imunoglobulina (IgSF) da família B7 (h: humano, m: ratinho), incluindo B7-H5. Resíduos de consenso do conjunto V de IgSF foram definidos de acordo com Williams e Barclay (1998, *Annu. Rev. Immunol.* 6:381-405) e Bork et al. (1994, *J. Mol. Biol.* 242:309-320), e são apresentados sobre um fundo a preto. As posições de resíduos de consenso estão marcadas com resíduos de IgSF invariantes ou carácter de resíduo conservado (h: hidrofóbico, p: polar). As posições de resíduo mostradas sobre um fundo cinzento são resíduos de assinatura da família B7 fora das posições de consenso de IgSF. As cadeias beta do domínio V são designadas de acordo com as convenções de IgSF (A', B, C, C', C'', D, F, G). As

posições de resíduo assinalados com # estão envolvidas na dimerização de CD80/CD86 nas suas estruturas cristalinas e os resíduos assinalados com asteriscos participam na ligação de proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (CTLA4).

Com base neste alinhamento, em ambos os B7-H5 de humano e ratinho, são conservados 14/16 resíduos de consenso do conjunto V de IgSF e 12/13 resíduos de assinatura de B7. Isto é uma forte evidência de que estas proteínas possuem domínios B7 tipo V.

As características mais originais nestes domínios são inserções invulgares nas laçadas A'-B e C-D, incluindo cisteínas livres. Estas laçadas estão espacialmente adjacentes na região C-terminal do domínio V, na sua interface com regiões subseqüentes. Os resíduos cisteína estarão disponíveis para formação de ligações dissulfureto interlaçadas ou, alternativamente, interacções covalentes com domínios adjacentes. Considerando estas inserções, a região C-terminal do domínio V de B7-H5 não seria provavelmente capaz de formar a interface com o domínio de IgSF do tipo C subseqüente, como se observa na estrutura cristalina de CD80.

Prepararam-se construções de proteína de fusão de polipéptido B7-H5 de humano (Fig. 3; SEQ ID NO:1) e de polipéptido de ratinho B7-H5 (Fig. 4; SEQ ID NO:3) por clonagem do domínio extracelular de B7-H5 em sequência (*in frame*) com o domínio de charneira-CH2-CH3 quer de IgG1 de humano quer de IgG2a de ratinho (Chapoval *et al.*, 2002, *Mol. Biotechnol.* 21:259-264). Para intensificar a secreção de proteína de fusão, o péptido de sinal nativo de B7-H5 foi substituído pelo péptido de sinal de pré-pró-tripsina e pela sequência FLAG derivada do vector pCMV-FLAG™ (Sigma, MO). Para produzir as proteínas de fusão B7-H5Ig, células 293T foram transfectadas com 10 µg de construções B7-H5Ig de ratinho ou humano pelo método do fosfato de cálcio, e as B7-H5Igs foram purificadas a partir do sobrenadante de cultura em coluna de proteína G, como anteriormente descrito (Dong *et al.*, 1999, *Nature Med.* 5:1365-1369). Linhas de células CHO estáveis expressando B7-H5 de humano ou linhas transfectadas em falso foram preparadas por cotransfecção de vector pCDNA™ contendo ADNc de B7-H5 de humano com pLXSHD, um plasmídeo

codificando um gene de resistência a histidinol (Miller et al., 1993, *Methods Enzymol.* 217:581-599). Clones estáveis foram seleccionados com histidinol 20 mM (Sigma, MO). Clones expressando B7-H5 foram rastreados quanto a ligação com anticorpo monoclonal (mAb) B7-H5 de humano.

Anticorpos monoclonais para B7-H5 de humano foram gerados por imunização de um ratinho BALB/c por métodos de imunização descritos anteriormente (Wilcox et al., 2002, *J. Clin. Invest.* 109:651-659). Foram gerados dois hibridomas, 5H9 e 1H11, que segregam IgG1 de ratinho contra B7-H5 de humano (ver Figs. 8A e 8B). Os anticorpos monoclonais produzidos pelos dois hibridomas foram purificados por cromatografia em coluna de afinidade de IgG. A especificidade do mAb foi determinada por coloração negativa de vários transfectantes expressando moléculas da família B7 incluindo B7-1, B7-2, B7-H1, B7-DC, B7-H2 e B7-H3. A IgG1 de ratinho de controlo foi comprada na Rockland (Gilbertville, PA).

Investigou-se a actividade de B7-H5 de humano para estimular a proliferação de células T. Placas de 96 poços de fundo plano foram revestidas com concentrações variáveis de mAb anti-CD3 (Dong et al., 1999, *Nature Med.* 5:1365-1369), lavadas extensivamente e revestidas com 10 µg/ml de B7-H5Ig ou mIg de controlo durante 2 horas a 37°C. Células T CD3+ humanas purificadas em lâ de nylon a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de dadores saudáveis foram cultivadas na presença do mAb anti-CD3 pré-revestido com 3×10^5 células/poço. Setenta e duas horas mais tarde, pulsaram-se os poços com 1 µCi de ³H-timidina (TdR) e determinou-se a proliferação de células T por incorporação de TdR. A proteína de fusão B7-H5Ig estimulou a proliferação de células T para concentrações tão baixas quanto 0,6 µg/ml (Fig. 7). Isto demonstra que o polipéptido B7-H5 pode coestimular células T.

Lisboa, 2013-05-07

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido isolado possuindo uma sequência de aminoácidos codificada por um ácido nucleico que é pelo menos 85% idêntica a

(a) uma molécula de ácido nucleico que codifica o polipéptido da SEQ ID NO:1 ou da SEQ ID NO:3,

(b) a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:2 ou da SEQ ID NO:4; ou

(c) uma molécula de ácido nucleico que inclui um segmento de pelo menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ou 933 nucleótidos da SEQ ID NO:2 ou pelo menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ou 929 nucleótidos da SEQ ID NO:4,

para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, onde o polipéptido tem a capacidade para coestimular uma célula T.

2. Polipéptido da reivindicação 1, onde a sequência de aminoácidos compreende:

do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1; ou

do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3.

3. Polipéptido da reivindicação 1, onde o polipéptido compreende:

do resíduo aminoácido 30 até ao resíduo aminoácido 190, em particular do resíduo aminoácido 47 até ao resíduo aminoácido 150 da SEQ ID NO:1; ou

do resíduo aminoácido 47 até ao resíduo aminoácido 149 da SEQ ID NO:3.

4. Polipéptido da reivindicação 1, onde o polipéptido compreende do resíduo aminoácido 30 até ao resíduo aminoácido 170 da SEQ ID NO:1.

5. Proteína de fusão compreendendo:

um primeiro domínio que compreende o polipéptido de qualquer das reivindicações 1-4; e

pelo menos um domínio adicional, para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero.

6. Proteína de fusão da reivindicação 5, onde o pelo menos um domínio adicional compreende um marcador, um repórter, uma região constante de imunoglobulina (Ig), parte de uma região constante de Ig, uma sequência líder ou de direccionamento heteróloga, ou um marcador que facilita a purificação, detecção ou solubilidade da proteína de fusão.

7. Proteína de fusão da reivindicação 6, onde o marcador é poli-histidina.

8. Método de coestimulação de uma célula T, o método compreendendo:

contacto de uma célula T *in vitro* com um polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3 ou 4, ou com um polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO: ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, onde o polipéptido tem a capacidade para coestimular uma célula T.

9. Polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 1 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, ou um ácido nucleico que codifica um polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3 ou 4, ou um polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, onde o polipéptido tem a capacidade para coestimular uma célula T.

10. Célula recombinante para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, onde a referida célula recombinante expressa um polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3 ou 4, ou um polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, onde a referida célula recombinante tem origem numa célula do referido mamífero ou na progenitura dessa célula, onde a célula recombinante compreende um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que

codifica o polipéptido, onde o polipéptido tem a capacidade para coestimular uma célula T,

onde nem a referida célula recombinante nem a referida célula do referido mamífero nem a referida progenitura dessa célula é uma célula estaminal embrionária de humano.

11. Célula recombinante da reivindicação 10, onde a célula é uma célula de apresentação de antigénio (APC).

12. Célula recombinante da reivindicação 11, onde a APC é uma APC pulsada com antigénio, especialmente com péptido antigénico.

13. Proteína de fusão para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, onde a proteína de fusão compreende:

(a) um primeiro domínio que compreende a SEQ ID NO:1 ou a SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos; e

(b) pelo menos um domínio adicional.

14. Polipéptido, a célula recombinante ou a proteína de fusão de qualquer das reivindicações 1 a 4 e 9-13 para utilização no tratamento de uma doença de imunodeficiência, uma condição inflamatória, uma doença auto-imune, imunossupressão, uma condição induzida por vírus, uma imunodeficiência congénita ou uma função imunitária afectada num mamífero.

15. Método da reivindicação 8, onde a célula T é uma célula T auxiliar, especialmente uma célula T auxiliar que auxilia uma resposta de linfócito T citotóxico ou de anticorpo de célula B.

16. Método de identificação de um composto que modula uma resposta imunitária, o método compreendendo:

proporcionar um composto de teste;

cultivar em conjunto, um polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3 ou 4, ou um polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, uma célula T e uma molécula que entrega um sinal de activação a uma célula T; e

determinar se o composto de teste modula a resposta da célula T à molécula,

onde um composto de teste que modula a resposta da célula T à molécula é um composto que modula uma resposta imunitária, e

onde o polipéptido tem a capacidade para coestimular uma célula T.

17. Método da reivindicação 16, onde um composto de teste que inibe a resposta da célula T à molécula é um composto que inibe uma resposta imunitária.

18. Método da reivindicação 16, onde um composto de teste que intensifica a resposta da célula T à molécula é um composto que intensifica uma resposta imunitária.

19. Método de qualquer das reivindicações 16-18, onde a molécula é um anticorpo que se liga a um receptor de célula T ou a um polipéptido CD3.

20. Método de qualquer das reivindicações 16-18, onde a molécula é um aloantigénio ou um péptido antigénico ligado a uma molécula de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) sobre a superfície da célula de apresentação de antigénio (APC).

21. Método da reivindicação 20, onde a APC expressa o polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3 ou 4, ou o polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos sobre a superfície da APC.

22. Método da reivindicação 21, onde o polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3 ou 4, ou o polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende do resíduo do aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 311 da SEQ ID NO:1 ou do resíduo aminoácido 40 até ao resíduo aminoácido 309 da SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos é expressa a partir de um ácido nucleico recombinante.

23. Polipéptido, a célula recombinante ou a proteína de fusão de qualquer das reivindicações 9-13 para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero, ou o método de qualquer das reivindicações 16-22, onde o polipéptido, ou o primeiro domínio da proteína de fusão é codificado por um ácido nucleico cuja sequência de ácido nucleico é a SEQ ID NO:2 ou a SEQ ID NO:4 ou um segmento de pelo menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ou 933 nucleótidos da SEQ ID NO:2 ou pelo menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ou 929 nucleótidos da SEQ ID NO:4.

24. Formulação farmacologicamente aceitável compreendendo um polipéptido de acordo com a SEQ ID NO:1 ou de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 numa quantidade eficaz para coestimular uma célula T e um transportador farmacologicamente aceitável para utilização em terapia de estimulação da resposta imunitária num mamífero.

25. Formulação da reivindicação 24, onde o polipéptido é codificado por um ácido nucleico de acordo com as SEQ ID NOs:2 ou 4 ou um segmento de pelo menos 100, 125, 150, 175,

200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932 ou 933 nucleótidos da SEQ ID NO:2 ou pelo menos 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 910, 915, 920, 925, 926, 927, 928 ou 929 nucleótidos da SEQ ID NO:4.

26. Formulação de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-25 para utilização no tratamento de uma doença de imunodeficiência, uma condição inflamatória, uma doença auto-imune, imunossupressão, uma condição induzida por vírus, uma imunodeficiência congénita ou uma função imunitária afectada num mamífero.

27. Anticorpo ou fragmento de um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido cuja sequência de aminoácidos compreende a SEQ ID NO:1 ou a SEQ ID NO:3 com 0 a 20 inserções, deleções ou substituições de aminoácidos para utilização em terapia de modulação imunitária num mamífero, onde o polipéptido tem a capacidade para coestimular uma célula T.

28. Anticorpo ou fragmento de um anticorpo para utilização em terapia de modulação imunitária num mamífero, onde o anticorpo ou fragmento do anticorpo se liga especificamente ao polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4.

Lisboa, 2013-05-07

Fig. 1

CCGGCCGCGTCCCGCCGCTCCCGGACCAGAAGTTCTCTGCGCGTCCGACGGCGACATGGGGGTCCCCAGGCCCTGGAG
GGCCGGCAGCTGGCGCTGGGGATCCCTGCTCTTCGCTCTCTTCCTGGCTGGCTCCCTAGGTCCGGTGGCAGCCTTCAAGGTC
GCCACGCCCTATTCCCTGTATGTCTCTCCGAGGGCAGAACTTCAACCTCACTGCAGGCTCTTGGGCCCTGGGACAAAG
GGCAGATGTGACCTTCTACAAGACGTGGTACCGCAGCTCGAGGGCGAGGTGCAGACCTGCTCAGAGCGCCGGCCATCCG
CAACCTCAGTTCAGGACCTTCACTGCACCATGGAGGCCACAGGCTGCCAACACACAGCCACGACCTGGCTCAGCGCCAC
GGCTGGAGTCCGCCCTCCGACCACCATGGCAACTTCTCCATCACCATGGCAACCTGACCTGTGGATAGGGCCCTCTACT
GCTGCCTGGTGGTGGAGATCAGGCACCACCCTCGGAGCACAGGGTCCATGGTGGCCATGGAGCTGCAGGTGCAGACAGGCAA
AGATGCACCATCCAACCTGTGTGGTGTACCCATCCCTCCAGGAGAGTAAAAACATCACGGCTGCAGCCCTGGCTACGGGT
GCCTGCATCGTAGGAATCCTCTGCTCCCTCATCTGCTCTCTGGTCTACAAGCAAAGGCAGGCAGCCTCCAACCGCCGTG
CCCAGGAGCTGGTCCGATGGACAGCAACATTCAAGGATTGAAAACCCCGCTTGAAGCTCACACCTGCCAGGGCTGGCTCTGT
ACCCAGGCGCAAAGTCAGGCACCCCTGTCTATGTGGCCAGCGCAGCCTTCTGAGTCTGGGGCGCATCTGCTTCCGGAG
CCCAGCACCCCTGTCTCCTCCAGGCCCGGAGACGCTTCTTCCCATCCCTGGACCTGTCCCTGACTCTCCAACTTTG
AGGTCTATAGCCAGCTGGGGACAGTGGGCTGTGTGGCTGGGTCTGGGGCAGGTGCATTTGAGCCAGGGCTGGCTCTGT
GAGTGGCTCCTTGGCTCCGCCCTGGTTCCTCCCTCTGCTCTGGGCTCAGATACTGTGACATCCAGAAAGCCAGCCCC
TCAACCCCTCTGGATGCTACATGGGGATGGTGGACGGCTCAGCCCCCTTCCAAGGATTTGGGGTGGCTGAGATCTCCCT
AGAGACCTGAAATTCACAGCTACAGATGCCAAATGACTTACATCTTAAGAAAGTCTCAGAACCTCCAGCCCTCAGCAGCTC
TCGTTCTGAGACATGAGCCTTGGATGTGGCAGCATCAGTGGGCAAGATGGACACTGGGCCACCCCTCCAGGCACGACA
CAGGGCACGGTGGAGAGACTTCTCCCGGTGGCCGCTTGGCTCCCCGTTTGGCCGAGGCTGCTCTTGTGTAGACTTCC
TCTTTGTACCACAGTGGCTCTGGGGCAGGCCCTGCCTGCCACTGGCCATGCCACCTTACCAGCTGCCTCTACCAGCAG
TTTCTCTGAAGATCTGTCAACAGGTTAAGTCAATCTGGGGCTTCCACTGCCTGCATTCAGTCCCCAGAGCTGGTGGTCCC
GAAACGGGAAGTACATATTGGGCATGGTGGCTCCGTGAGCAATGGTGTCTTGGGCAATCTGAGCCAGGACAGATGTTG
CCCCACCCACTGGAGATGGTCTGAGGGAGGTGGTGGGGCTTCTGGGAAGGTGAGTGGAGAGGGGCACTGCCCCCGCC
CTCCCATCCCTACTCCACTGCTCAGCGCGGCCATTGCAAGGGTGCACACAATGTCTTGTCCACCCTGGGACACTTCT
GAGTATGAAGCGGATGCTATTAAAACTACATGGGAAACAGGTGCAAAACCTGGAGATGGATTGTAAGAGCCAGTTAAA
TCTGCACTCTGCTGCTCCTCCCCACCCCACTTCACTCCATACAATCTGGGCTGGTGGAGTCTTCCCTCAGAGCCAT
TCGGCCAGGTCCGGGTGATGTTCCATCTCCTGCTTGTGGGCATGCCCTGGCTTTGTTTTATACACATAGGCAAGTGAT
CCTCTGTGGAATGTGATGAAGGATTTAAAGCAGGGAGGAGAGTAGGGGCTCTCTGTACACTTGGGGTAAACAG
GGAAAGCAGTGCCTGAGCATGGGACAGGTGAGGTGGGCTGGGCAGACCCCTGTAGCGTTTACGAGGATGGGGCCCCAG
GTACTGTGGAGAGCATAGTCCAGCCTGGGCATTTGCTCCTAGCAGCCTACACTGGCTCTGCTGAGCTGGGCTGGGTGCTG
AAAGCAGGATTTGGGCTAGGGCGGGAAGATGTTCCGCCAAATGCTTGGGGGTGGGGGATGGAAAAGGGGAGCACCTCT
AGGCTGCCGSCAGCAGTGCCTGGGCTGTGGCTACAGCCAGGGAACCCCACTGGACACATGGCCCTGCTCTAAGCC
CCCCAGTTAGGCCCAAAGGAATGGTCCACTGAGGGCTCCTGCTGCTGGCTGGGCTGGGCGAGGGCTTTGAGGAGAGGGTAA
ACATAGGCCCGGAGATGGGCTGACACTCGAGTGGCCAGAAATATGCCAAACCCCGGCTTCTCCCTGTCCCTAGGCAGAG
GGGGTCCCTCTTTGTTCCCTCTGGTACCACAATGCTTGTATGCCAGCTGCCATAGGAAGAGGGTCTGGCTGGCCATGG
TGGCACACCTGCTCCTCCAGCACTTTGAGGGCTGAGGTGGAAGGACCCGTTAAGCCAGGTGTTCAAGGCTGCTGTGAG
CTGTGTCGAGCCACTACACTCCAGCCTGGGACGGAGCAAACTTTGCTCAAAACAAATTTAAAGAAAGAAAGAAAGG
AAAGAGGATATGTTTTCAAAATTCATGGGGCTGCATGGCAGGATGGGGACAGGACACTGCTGTTCTGGAGTCGAAG
GACAAAGCCACAGCCAGATTCGGTCTCCCACTCAGGAAGAGCATGCCCTGCCCTCTGGGGAGGCTGGCTGGCCCGAG
CCCTCAGCTGCTGACCTTGGGACAGAGCAACTTCAAGAAATTTGGCTGCCAGACCCAGGCCCTGGCTGCTGTGTGGAG
AGGGAGGGCGCCCGCGCAGAAACAGCCACCGCACTTCTCCTCAGCTTCTCTGGTGGCGCCCTGCCCTCTCTCTGGAC
CCTTTTACAACCTGAACGCATCTGGCTTGTGGTTCCTGTTTTACAGGAAATTTACTCTGAGCTCCAGTTCATCTTCAT
CCATGGCCACAGGCCCTGCTTACAAACGCACTAGGGAGCTCCCTCCCTGCTGCTGCTGGGAGGGGCGAGGCTGCTGGAGCCGC
CCTCTGAGTTGCCCCGGATGGTAGTCTGATGCCAGCCCTGGTGGCTGTGGGCTGGGGTGGATGGGAGAGCTGGGTGG
AGAACATGGCGCTCCAGGGGGCGGAGGAGCACTAGGGCTGGGGCAGGAGGCTCCTGGAGCGCTGGATTCTGTGGCAGT
CTGAGGCCCTGAGAGGAAATCCATGCTTTAAGAATAATTCATTTGTTAGGAGATCAATCAGGAATTAGGGCCATCTTAC
CTATCTCCTGACATTCACAGTTAATAGAGACTTCTGCTTTATTCCTCCAGGGAGAGGCTGAAGGAATGGAATGAAA
GCACCATTTGGAGGTTTGTGTACACAGCGGGACCGCTCAGCACTCCCTAAAAACACACCAAGGAGCCACTGGTGACTG
CTGGTGGGCAAGCTGGCCCTGCTGGGGAGTCCGTGGCAGTGGGCGCTGGGGTGGAGGTGCAGGAGCCCAAGGACCTGCT
TTCAAAAGACTTCTGCTGACAGAGCTCCCACTACATGCAGTGGCCCAAGGCGAGGGGCTGATACATGGCCTTTTTCAG
GGGTCTCCTCGGGGTGGACTTGGAGTGTGCAAGTGGACAGGGGCTGCAGGGTCTGCAACCAACCGAGCCAACTT
GGCCCTGGGGTCTGCCCCATGAATGAGGCTTCCCAGGGCTGGCTGACTGTCTGGGGCTGGGTTAACGTTTTCTCA
GGAAACCAAAATGCAGAAAGAGGAACTGGGGTGTCTAACAGGATGCTGGGAAACAAAGGCTTGAAGCCAGCCACAGC
CCAGCTGAGCATGAGGCCAGCCATAGACGGCACAGGCCACTGGCCATTCCTGGGCAATTCCTGCTTTGCATTTGCTG
TTCTCTTCAACCCATGGAGGCTATGTCAACCTAATATCTGGAATGTGTTGAGAGGATTCGAAATGATCAATATAGCTTG
GTGAGACAGTGCAGATAGATAGCCTGCTGCTTGGCAAGGAGAGGGAAAGTGGCAGCATGCATGCTGTTCTTGGCC
TTTTCTGTTAGAATACTTGGTGTCTTCAACACACTTTCACATGTGTTGTAAGTGTGATCCACCCCTTCCCTGAAAT
CCTGGGAGTTTTATTGCTGCCATTAACACAGAGGCAATAGAGTCTGAAAGGTCTGTGCTTGTCAAACAAAGTAAAC
GGTGGAACTACGACT (SEQ ID NO:5)

Fig. 2

GAGCATTCACTCTAGCGAGCGAGCGGGCTGTACAGCCGGCTCCCTGGGCTCCTGGAGTCCCCTTGGCTCCAAGCGCACTCCAG
CAGTCTCTTTCTGCTCTTGCOCGGCTCGACCGCGACATGGGTGTCCOCGGGTCCCAGAGGCCAGCAGCCCGCGCTGGGGAAC
CCTGCTCCTTGGCTATTTTCTGGCTGCATCCAGAGGTTCTGGTAGCAGCCCTCAAGGTCACCACTCCATATTTCTCTATGTGT
GTCCCGAGGGACAGAATGCCACCCTCACCTGAGGATTTCTGGCCCGGTTCCAAAGGGCCAGATGTGACCATCTACAAGAGCG
TGGTACTCTCAGCTCACGAGGGCGAGGTCCAGATGTGCAAAGAACACCGGCCCATACGCAACTTCACATTCGAGCACCTTCAGCA
CCACGGAGCCACTGAAAGCCACGCCAGCCATGACCAGCCCGAAGCATGGGCTAGAGCTAGCTTCTGACCACCACGGTA
ACTTCTCTATCACCCCTGCGCAATGTGACCCCAAGGGACAGCGGCTCTACTGTCTGTCTAGTGATAGAATTA AAAAACCCACCAC
CCAGAACACCGTTCCTACGGTCCATGGAGCTACAGGTACAGGCAGGCAAGGCTCGGGGTCCACATGCATGGCGTCTAATGA
GCAGGACAGTGACAGCATCACGGCTGCGGCCCTGGCCACCGCGGCTGCATCGTGGGAATCCTCTGCCCTCCCTTATCCTGTG
TGCTGTCTATAAGCAGAGACAGGTGGCTCTCACCGCGTGCACAGGAGTTGGTGAGGATGGACAGCAGCAACCCCAAGGA
ATCGAAAACCCAGGCTTCGAGACCCTCCACCCTCCAGGGGATGCTGAGGCCAAGACCAGGCCCGCCACTGTCTATGTGGC
CCAGCGCAACCTTCGGAGTCAGGACGGTACCTGCTCTGACCCAGCACACCTCTGTGCGCTCCAGGCCCTGGGACGTCT
TTTTCCCATCCCTAGATCCAGTCCCTGACTCCCTAACTCTGAAGCCATCTAAACAGCTGGGAAACCATGAACCATGGTACC
TGGGTCAGGATATGTGCATTTGATCTATGGCTGGCCCTGGACAGTCTTTTAGGCACTGACTCCAGCTTCTCTCTCTGTCT
CTGAGCTTAGACTCTGCTTTTACAAGATGCACAGACCTCCCTATCTCTTTCAGACGCTACTGGGGGGCAGAGAGATG
TTGGATTGCTCATTGCTGTTCTCAAGATCTTGGGATGCTGAGTTCTCCCTAGAGACTTGACTTCGACAGCCACAGATGTCAGA
TGACCTGCATCTATGAACGTCOCGGCTTGGCAAGAGCCCTTCTTCAATGGAACCCAGTAGCCCGGAGGGATGAGGTAGGCACC
TTGCCACCTCCCGGAGAGAGACACAAGATGTGAGAGACTCCTGCTCACTGTGGGGTGTGGCTGGCTGTTGTTGCCTG
AGGATGCTCCTCTGTGGACTGACTCTATCCCTGGATTCTGGAGCTTGGCTGGCCATATGTCACCACAGAGGACATCTCAG
CAGCCTTCCACCAGCAACCTGAGGGCTGCCAGCTTGTGGCTCTGGGCTCTCATTACCTGTATGGCCGTCCACAGAGCTCAG
TGGCCAGAGGCTTTGAAACAGGAAGTACATGTCAAGTTCAGGAACCACTGTGAGCTCATTAGTGTCTTGAGCAATGTGAGGCC
TGSACCAAGTGACACGAGGGAGGGTGGCGAGAGGATGATGGGATGATGAGGGAAACACGCTCCCTTCTGTCTGTGCATC
CACCACTACCATAATTCAGTGTGGAGCAGTGGCAAAGGTGACCGACCTCCACAATGTCCTAGTGATGCTGGACCAATTTCTAAG
TGTGAAGAGATGCTATTA AAAACAGTATGTGGCAATGGCTGCCAACAGCTGAGTGGACTGGAGGCATGGCTTTAAGGCCCT
GGAGGTGACGGGCCGATATGGGATGGGATGGGATGGGATTTCACTGAGGGCTTAGGGATCACTCCGCTTCTGACCACTTTCTT
CTGAGCCTCACCTCAGGGTACCTTCAGGCACACAGAAGAGCTTGCCTGGTCCGATACTACTCTTGGCTCTCATCTCCAGG
GTTTGGCATGACCTGGGCACACAGGGGAGTCTTCAGAAAGGATTTAAAGCATGAAAGAAAGGGTAGTTCTTGTGAGGTAG
GGATGGGCAGCTGATGTTGAGAGTGGAGGGGATACGGCTGGGCAGATCACTCTCCAGTCTCTAGAGGGAAAGTAGCTCTAA
GTCTGGGAGAGCAGCAGCCCACTGGTACCATATGTCTTCTGACAGCTTCCACTGGCTGGCTGAACTGGCCATGGGTAGGAAA
GCTCCTGTTCTGGGCTGCAGCCAGGGAGAACCCATTCACTTCCCTGAGGACAGATGGGTTGGGAGAGAGAGAGATTTGAG
GCCGGAAAGCAGCAATAAGCTATGTCTGGGACCCAGACAAGTTGTCTGATGAGGTCCAAGATGTTGGATGGCCAGTATATACC
TGGGCTTGGGGATCCTTAGAGGCTTTGTATCATCATCATAGGAGTGTGCGGGTGGCCAGGGCATCAAAGCCATGACCCCTGT
TTTATCCTCAGGGTCCACTCTTCTGCACCATCCATTGCTCTAGATCTATGCAGTTACTATAGACAGAATGTGTTGTTCTGTTT
GGCTTTGGGATATAGCTTGGCCAGTGCAGCTGTTCACTGGGAGCTGACTGTCTCCAGCCCTAAGCTTCAGACTCACTCAGATG
ACTTCTAAGAAATTTGCTGTGGGAGCCCTGCATGGCTGCAGCTCCGTGGAAAGGAGAGGAGGCCCCCAGCAGAAAGAACCACT
CGCTCCTGCCACBCTTCTCCTGTAGGGCTCTAAGTCTCTTCTTCTGGGACCCCTGCAAGCAAAGGCATGTACAGCTTGGTGG
TTTTCTGTTTTGGGTGAAGTTTTGTGTTGGTCCGGSTTCTGTCTACATCCATGAACTGGGGTGTACACCTTGTCTGTCTGCTG
TAGAGACAGCTGCAGGATCTTAGGGTGGAAAATGGAGGTGCCCTGAGGTGCTAGCCCTTGGGGCAAAGATGGGTGGCAATG
AGACACAGTGGGAACCTGATTTCCCAAGAGGAGGAGGAGCCCTGTAGCCTCAAGGGCCATATGGGTTCTGGTACAGCA
AAGCCCTAGAGAGCGAAGTCTGTATTTTGGAGGTAATTTGATCCTTACGGAATCCATCAGAAATTTGGAGCGGGTGTCTTAT
CTATCTCTGGAGGGTCTCTACCTATCTCCGATGAAGCTTCCCTGGGCTGGGATGGGAGAAACAGGAGGAAAAGGTGTCTGA
TAAAGCAGGGCTTCTTGACAAGCCAAAGGGCACTGGTAGCTGTGTGGACCGAGCTGACCCCTGCTGAAGTATTTGTAGTGTG
CCTTGGACCAACTTCTCAAAGAGCAACCCCGGGCTACCCACTTCTGCCAGGAAGAGCGGAGAAAGGGCTGAGAGGCCCTG
GAAGGGCTAGCTCCTTCTTGAAGTGTCTCCCGAGGACTTGGAGGAGGCGCTAGGCTACGGCTGCTGAGGGCCCTTT
GTCTTTCCTAACCTGGGCACTGTTAGGATGCTCCCTCCTGGAAAAGGCTTCTCTGGTGTGAGCTAGAGCAGTGTCCATGCCA
GGCTGAACCTGCCATGGTGGAGCTGAACATAAAATTTCTCAGGGAACATAAAATAGGCAAAAGCAGGAACTGGGGAGGAGGG
TGCCAGGCAGGATGGGGGAAAGGAGGGCAGTGCAAAAGTCTCTTGAACACAGACAGCCAGCTGAGTGCCAGTCCCAGATC
ACAGAGAATAAGGCTCATCTGGCTCATGTTCTGCATGCTGTGCTGCTTTACCCCTGGCACTTCTCTCTCACCATGAGTGGAG
TCTTGGGAGTCTGGGAGGTTGAGGATTAATGCCAGCTGGGAGCAGATAGCTGACAGAGTCTTGGGTAACGGCTTGAAC
CAGGACCTCAGGATCCACTCTGGGATCTAGCTTTGTCTGGCCAGTGAAGATCTCTATAATGGCCATTTATGCCAGGGGATA
AACATTTCACTGGGTTCTGATCTGTGGGTGTGGCTTCCCTGGAAAATATGGTGAGAGGAATTTGCTAAGGATCAGTTGATA
AGAAAATTTCTGAGATTGATTAGTAATGCTGCTTGGACTCAGGAAGGGAAGTGGCAGTATGAATGCCATGTCTTAATCATTT
TGGTTAAAATATGCTTCCCAAAGATTTCCACGTGTGTTCTGTTTATTTGACATCTGTCTCCATATCAGTCTTGAAGCCCTT
TCTGTGTATATATATGATGTTTGGTGTATATATGTTTTTGTGTGTGCATATGGAAGTCAGAAATCACTGGGTGTCTTCCCT
CCATTCCTTTGCAATGTATGTTTTTTTTTTTTTACGATTTATTTACTATATGAATGTTTTGCTGAATACATGCAATAGGTGT
CACGTACATGCTGCTGGAAAGCTTGGAACTGGAGTTACAGGTGGCTATGAGCTACAGTGTGAGCACTGGGAATCAAACCTGG
GTCTTCTGCAAGAGCAAAATTA AAAAGTCAAGCTTAACTACTTGAGCTATTTTCCCACTCC (SEQ ID NO: 6)

Fig. 3

MGVPTALEAGSWRWGSLFLAASLGPVAAFKVATPYSLYVC
PEGQNVTLTCRLLGPVDKGDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSE
IRNLTFQDLHLHHGCHQAANTSHDLAQRHGLEASDHHGNFSIT
MRNLTLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPS
NCVVYPSSSQESENITAAALATGACIVGILCLPLILLLVYKQRQ
AASNRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHPLS
YVAQRQPSESGRHLLSEPSTPLSPPGPGDVFFPSLDPVDPSPNF
EVI (SEQ ID NO:1)

Fig. 4

MGVPAVPEASSPRWGTL~~LL~~LAIFLAASRGLVAAF~~KV~~TPYSL
YVCPEGQ~~NATL~~TCRILGPVSKGHDVTIYKTWYLS~~SR~~GEVQM
CKEHRPIR~~NFTL~~QH~~LQ~~HGSHLKANASHDQ~~PQ~~KHGLELASD
HHGNFSITLRNVTPR~~DS~~GLYCCLVIELKNHHPEQRFYGSME
LQVQAGKGS~~ST~~CMASNEQDSDSITAAALATGACIVGILCL
PL~~IL~~LVYKQ~~RQ~~VASH~~RR~~AQELVRMDSSNTQGIENPGFETT
PPFQGMPEAKTRPPLS~~Y~~VAQ~~RQ~~PSESGR~~Y~~LLSDPSTPLSPP
GPGDVFFPSLDPVPDSPNSEAI (SEQ ID NO:3)

Fig. 5

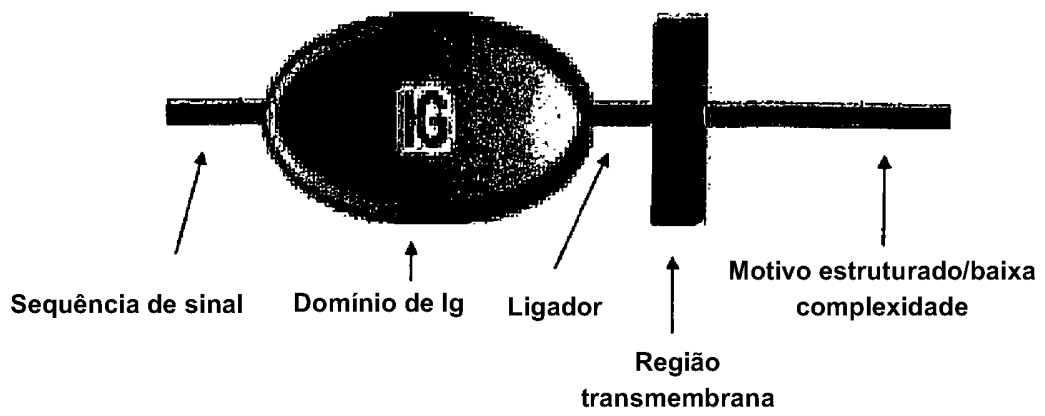


Fig. 6

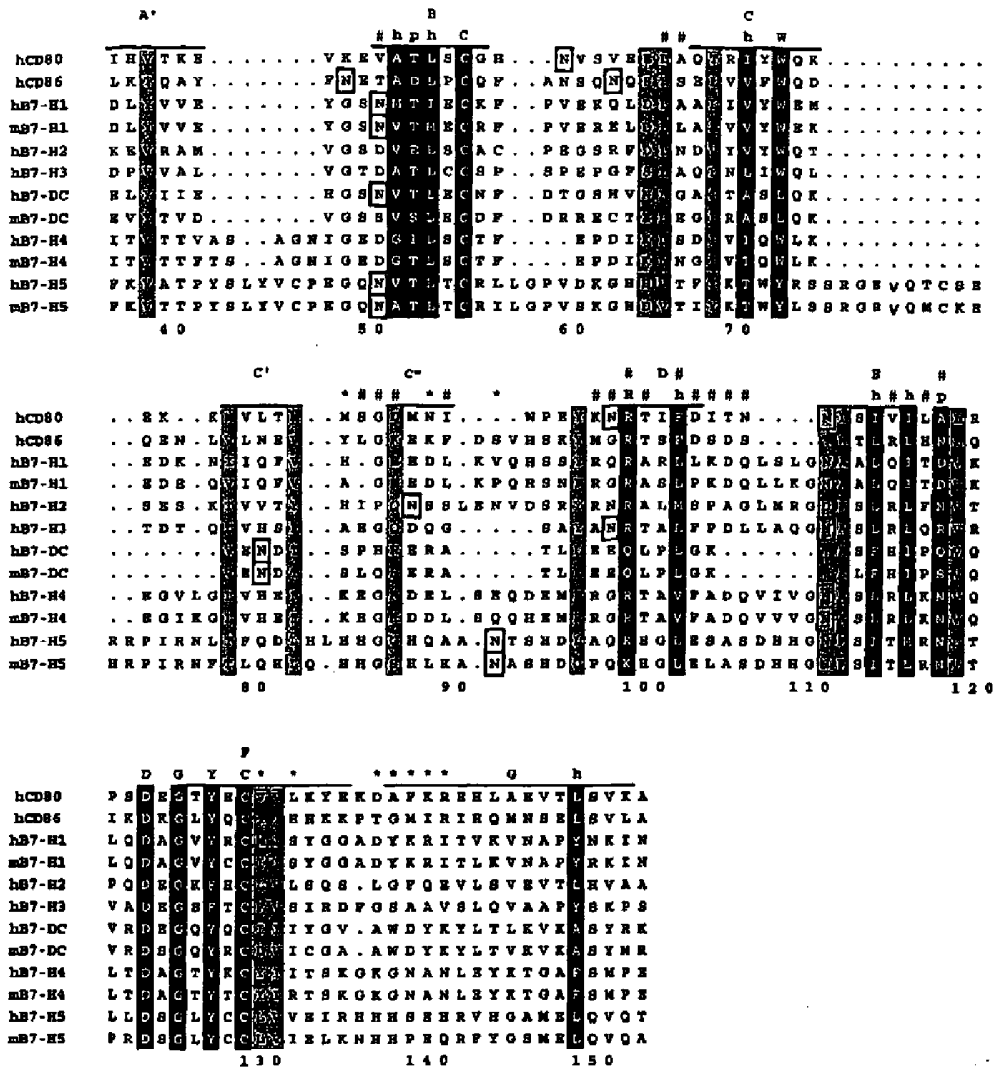
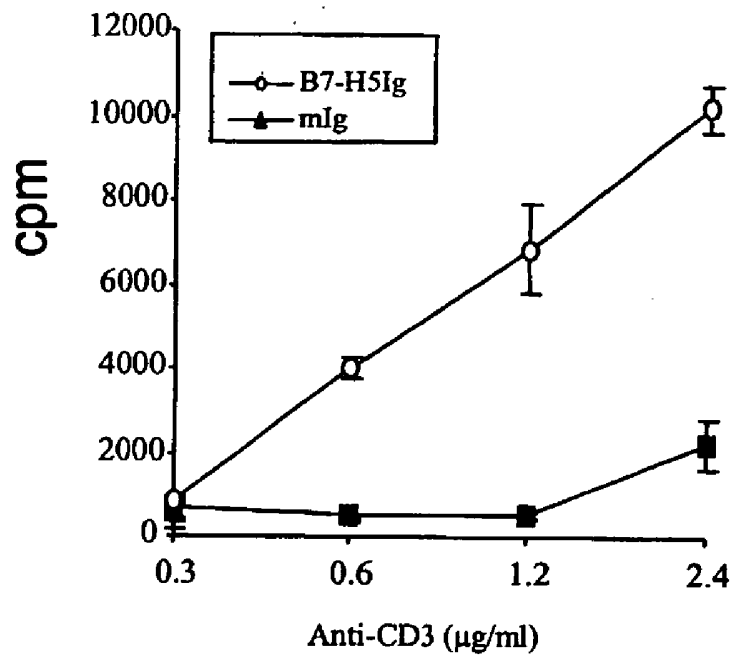


Fig. 7



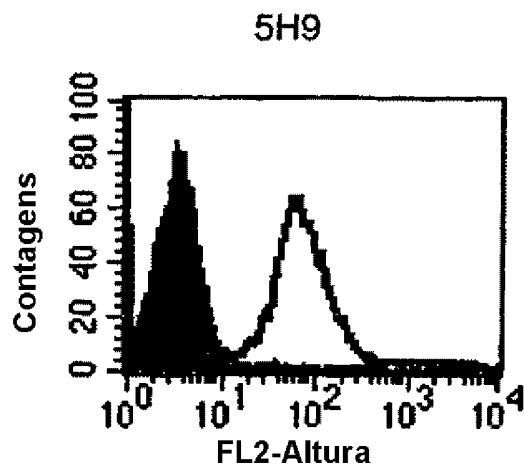


Fig. 8A

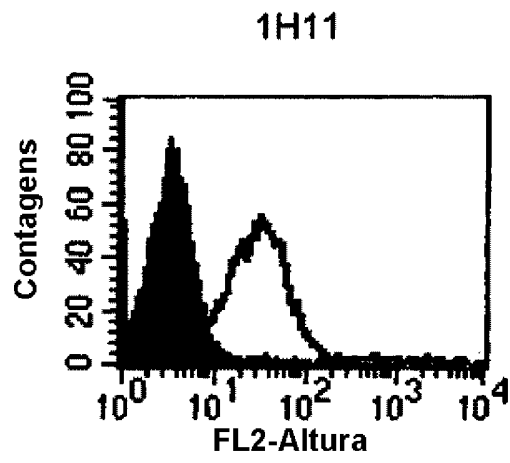


Fig. 8B

Fig. 9

(SEQ ID NO:2)

```

                15                30                45
ATGGGCGTCCCCACGGCCCTGGAGGCCGGCAGCTGGCGCTGGGGA
M G V P T A L E A G S W R W G>

                60                75                90
TCCCTGCTCTTCGCTCTCTTCCTGGCTGCGTCCCTAGGTCCGGTG
S L L F A L F L A A S L G P V>

                105               120               135
GCAGCCTTCAAGGTCGCCACGCCGTATTCCTGTATGTCTGTCCC
A A F K V A T P Y S L Y V C P>

                150               165               180
GAGGGCAGAACGTCACCCTCACCTGCAGGCTCTTGGGCCCTGTG
E G Q N V T L T C R L L G P V>

                195               210               225
GACAAAGGGCACGATGTGACCTTCTACAAGACGTGGTACCGCAGC
D K G H D V T F Y K T W Y R S>

                240               255               270
TCGAGGGGCGAGGTGCAGACCTGCTCAGAGCGCCGGCCCATCCGC
S R G E V Q T C S E R R P I R>

                285               300               315
AACCTCACGTTCCAGGACCTTCACCTGCACCATGGAGGCCACCAG
N L T F Q D L H L H H G G H Q>

                330               345               360
GCTGCCAACACCAGCCACGACCTGGCTCAGCGCCACGGGCTGGAG
A A N T S H D L A Q R H G L E>

                375               390               405
TCGGCCTCCGACCACCATGGCAACTTCTCCATCACCATGCGCAAC
S A S D H H G N F S I T M R N>

                420               435               450
CTGACCCTGCTGGATAGCGGCCTCTACTGCTGCCTGGTGGTGGAG
L T L L D S G L Y C C L V V E>

                465               480               495
ATCAGGCACCACCACTCGGAGCACAGGGTCCATGGTGCCATGGAG
I R H H H S E H R V H G A M E>

```

510 525 540
CTGCAGGTGCAGACAGGCAAAGATGCACCATCCAACCTGTGTGGTG
L Q V Q T G K D A P S N C V V>

555 570 585
TACCCATCCTCCTCCCAGGAGAGTGAAAACATCACGGCTGCAGCC
Y P S S S Q E S E N I T A A A>

600 615 630
CTGGCTACGGGTGCCTGCATCGTAGGAATCCTCTGCCTCCCCCTC
L A T G A C I V G I L C L P L>

645 660 675
ATCCTGCTCCTGGTCTACAAGCAAAGGCAGGCAGCCTCCAACCGC
I L L L V Y K Q R Q A A S N R>

690 705 720
CGTGCCAGGAGCTGGTGCGGATGGACAGCAACATTCAAGGGATT
R A Q E L V R M D S N I Q G I>

735 750 765
GAAAACCCCGGCTTTGAAGCCTCACCACCTGCCAGGGGATAACCC
E N P G F E A S P P A Q G I P>

780 795 810
GAGGCCAAAGTCAGGCACCCCCTGTCCTATGTGGCCCAGCGGCAG
E A K V R H P L S Y V A Q R Q>

825 840 855
CCTTCTGAGTCTGGGCGGCATCTGCTTTCGGAGCCCAGCACCCCC
P S E S G R H L L S E P S T P>

870 885 900
CTGTCTCCTCCAGGCCCGGAGACGTCTTCTTCCCATCCCTGGAC
L S P P G P G D V F F P S L D>

915 930
CCTGTCCCTGACTCTCCAAACTTTGAGGTCATCTAG
P V P D S P N F E V I *>

Fig. 10

(SEQ ID NO:4)

```

                15                30                45
ATGGGTGTCCCCGCGGTCCCAGAGGCCAGCAGCCCCGCGCTGGGGA
M G V P A V P E A S S P R W G>

                60                75                90
ACCCTGCTCCTTGCTATTTTCCTGGCTGCATCCAGAGGTCTGGTA
T L L L A I F L A A S R G L V>

                105               120               135
GCAGCCTTCAAGGTCACCACTCCATATTCTCTCTATGTGTGTCCC
A A F K V T T P Y S L Y V C P>

                150               165               180
GAGGGACAGAATGCCACCTCACCTGCAGGATTCTGGGCCCCGTG
E G Q N A T L T C R I L G P V>

                195               210               225
TCCAAAGGGCACGATGTGACCATCTACAAGACGTGGTACCTCAGC
S K G H D V T I Y K T W Y L S>

                240               255               270
TCACGAGGCGAGGTCCAGATGTGCAAAGAACACCGGCCCATACGC
S R G E V Q M C K E H R P I R>

                285               300               315
AACTTCACATTGCAGCACCTTCAGCACCGGAAGCCACCTGAAA
N F T L Q H L Q H H G S H L K>

                330               345               360
GCCAACGCCAGCCATGACCAGCCCCAGAAGCATGGGCTAGAGCTA
A N A S H D Q P Q K H G L E L>

                375               390               405
GCTTCTGACCACCACGGTAACTTCTCTATCACCTGCGCAATGTG
A S D H H G N F S I T L R N V>

                420               435               450
ACCCAAGGGACAGCGGCTCTACTGCTGTCTAGTGATAGAATTA
T P R D S G L Y C C L V I E L>

                465               480               495
AAAACCACCACCAGAACACGGTTCTACGGGTCCATGGAGCTA
K N H H P E Q R F Y G S M E L>

```

510 525 540
CAGGTACAGGCAGGCAAAGGCTCGGGGTCCACATGCATGGCGTCT
Q V Q A G K G S G S T C M A S>

555 570 585
AATGAGCAGGACAGTGACAGCATCACGGCTGCGGCCCTGGCCACC
N E Q D S D S I T A A A L A T>

600 615 630
GGCGCCTGCATCGTGGGAATCCTCTGCCTCCCCCTTATCCTGCTG
G A C I V G I L C L P L I L L>

645 660 675
CTGGTCTATAAGCAGAGACAGGTGGCCTCTCACCGCCGTGCCAG
L V Y K Q R Q V A S H R R A Q>

690 705 720
GAGTTGGTGAGGATGGACAGCAGCAACACCCAAGGAATCGAAAAC
E L V R M D S S N T Q G I E N>

735 750 765
CCAGGCTTCGAGACCACTCCACCCTTCCAGGGGATGCCTGAGGCC
P G F E T T P P F Q G M P E A>

780 795 810
AAGACCAGGCCCACTGTCCTATGTGGCCAGCGGCAACCTTCG
K T R P P L S Y V A Q R Q P S>

825 840 855
GAGTCAGGACGGTACCTGCTCTCTGACCCCAGCACACCTCTGTGC
E S G R Y L L S D P S T P L S>

870 885 900
CCTCCAGGCCCTGGGGACGTCTTTTCCCATCCCTAGATCCAGTC
P P G P G D V F F P S L D P V>

915 930
CCTGACTCCCCTAACTCTGAAGCCATCTAA
P D S P N S E A I *>