(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 772 674**

(51) Int. CI.:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/66 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2006 E 16192149 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3214095**

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

(30) Prioridad:

12.05.2005 US 680374 P
13.04.2006 US 791626 P
26.04.2006 US 795005 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para modular respuestas inmunitarias

Antecedentes de la divulgación

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

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

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

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

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

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

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

Las señales coestimuladoras, particularmente señales coestimuladoras positivas, también desempeñan un papel en la modulación de la actividad de células B. Por ejemplo, la activación de células B y la supervivencia de células B de

centro germinal requieren señales derivadas de células T además de estimulación por antígeno. El contrarreceptor de CD40 presente en la superficie de células T auxiliares interacciona con CD40 en la superficie de células B, y media en muchos de dichos efectos dependientes de células T en células B. Resulta interesante que no se han identificado receptores coestimuladores negativos análogos de CTLA-4 en células B. Esto sugiere que pueden existir diferencias fundamentales en el modo en que se inducen células T y células B para responder a antígeno, lo que tiene implicaciones para mecanismos de autotolerancia así como en la inhibición de funciones efectoras de células B, tales como producción de anticuerpos. Si se encontrara una molécula de tipo CTLA funcional en células B, el hallazgo cambiaría drásticamente el entendimiento de los mecanismos de la estimulación de células B. Además, la identificación de dichos receptores podría proporcionar el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos capaces de modular la activación de células B y producción de anticuerpos, y útiles en la modulación de respuestas inmunológicas.

En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de identificación de miembros de la familia B7 adicionales, sus contrarreceptores y moléculas derivadas de los mismos, que tienen uno o ambos de una actividad coestimuladora de células T y/o una actividad coestimuladora de células B. Esta necesidad se basa en gran medida en su importancia biológica fundamental y el potencial terapéutico de agentes capaces de afectar a su actividad. Dichos agentes capaces de modular las señales coestimuladoras encontrarían un uso significativo en la modulación de las respuestas inmunitarias, y son altamente deseables. Baury B. et al., Biochemcial and Biofysical Research Communications, vol. 309 (1), 12 de septiembre de 2003, páginas 175-182, describen la identificación de isoformas de CD155 secretadas. Nobis P. et al., J.General Virology, vol. 66 (12), 1985, páginas 2563-2670, describen la producción de un anticuerpo monoclonal contra un epítopo en células HELA que es el sitio de unión funcional al poliovirus. En el documento WO 01/94413 se describen ácidos nucleicos y polipéptidos relacionados con B7, y sus usos para la inmunomodulación. Freeman G. et al., J. Experimental Medicine, vol. 192 (7), 2 de octubre de 2000, páginas 1027-1034, informan que la activación del receptor inmunoinhibidor PD-1 por un miembro de la familia B7 conduce a una regulación negativa de la activación de linfocitos. En el documento US 6518033 se describe un método para detectar la presencia de CD155 para el diagnóstico de cáncer y para determinar el tratamiento.

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. La invención proporciona un inhibidor de la unión de zB7R1 con CD155 para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, en el que el cáncer se caracteriza por la presencia de células tumorales que expresan CD155; en donde zB7R1 es el polipéptido de SEQ ID NO: 2, y en donde el inhibidor es un anticuerpo que se une específicamente a los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo. En una realización de la invención, el método para tratar el cáncer comprende además un protocolo de inmunoterapia, quimioterapia y/o radioterapia contra el cáncer.

Descripción detallada

1. Visión de conjunto

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

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

CD155 (PVR) se identificó como la contraestructura para zB7R1. Se ha indicado que CD155 es la contraestructura para al menos otros 2 receptores incluyendo CD226 (DNAM-1) y CD96 (Tactile). Se ha mostrado que CD226 y CD96 son receptores activadores expresados en células T y células NK y CD155 puede desencadenar la activación mediante estas moléculas. Se ha indicado que CD155 se expresa ampliamente en tejidos no hematopoyéticos y puede sobreexpresarse en un gran número de tumores y tipos celulares transformados. El papel de CD155 en respuestas de células T a estos tumores es en su mayoría la interacción con CD155 de zB7R1 que suprime respuestas de células T y NK al tumor. Por lo tanto, un reactivo que bloquea la interacción de zB7R1-CD155,

incluyendo anticuerpos de bloqueo para una de las moléculas, o formas solubles de una de las proteínas, facilitará respuestas de células T y NK al tumor eliminando o minimizando la señal inhibidora mediante zB7R1. Debido al efecto inhibidor demostrado de la interacción de zB7R1 en células T con anticuerpos agonistas como se muestra en el presente documento, los anticuerpos agonistas anti zB7R1 o receptores solubles son candidatos adecuados para suprimir las respuestas de células T en enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias mediadas por células T.

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

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

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

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

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

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

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

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

En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican

polipéptidos de zB7R1, que son útiles en la modulación de la actividad de linfocitos T y en el tratamiento de trastornos inmunitarios, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, inflamación, psoriasis, EII, colitis ulcerosa y LES.

La presente divulgación también proporciona polipéptidos y epítopos aislados que comprenden al menos 15 restos de aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3. Los polipéptidos ilustrativos incluyen polipéptidos que comprenden o consisten en SEQ ID NO: 3, un epítopo antigénico de los mismos, o un fragmento de unión a zB7R1 funcional del mismo. Además, la presente divulgación también proporciona polipéptidos aislados como se ha desvelado anteriormente que son agonistas de, se unen con, bloquean, inhiben, reducen, aumentan, antagonizan o neutralizan la actividad de zB7R1.

La presente divulgación proporciona adicionalmente anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente con dichos polipéptidos. Como ejemplos de anticuerpos se incluyen anticuerpos agonistas, anticuerpos neutralizantes, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos humanizados derivados de anticuerpos monoclonales murinos y anticuerpos monoclonales humanos. Los fragmentos de anticuerpo ilustrativos incluyen $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab', Fab, Fv, scFv, y unidades de reconocimiento mínimas. Preferentemente, los anticuerpos neutralizantes se unen a zB7R1 de modo que su interacción con su contrarreceptor o contrarreceptores se bloquea, inhibe, reduce, antagoniza o neutraliza; la presente divulgación también abarca los anticuerpos neutralizantes anti-zB7R1 de modo que su interacción con su contrarreceptor o contrarreceptores está bloqueada, inhibida, reducida, antagonizada o neutralizada. La presente divulgación incluye además composiciones que comprenden un vehículo y un péptido, polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento.

Por tanto, en una realización de la divulgación, se proporcionan antagonistas de señalización de zB7R1 para aumentar la activación de células T, y posiblemente la activación de linfocitos B. En una realización preferida, dichos antagonistas comprenden agentes de bloqueo capaces de interferir con la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor o sus contrarreceptores, inhibiendo de este modo la señalización negativa mediada por zB7R1 y dando como resultado un aumento de la activación y proliferación de linfocitos y la función efectora.

En una realización alternativa de la divulgación, se proporcionan agonistas de la señalización de zB7R1 para inhibir la activación de células T, y posiblemente la activación de células B. En una realización preferida, dichos agentes bioactivos comprenden agentes miméticos capaces de unirse con zB7R1 e imitar y/o aumentar la interacción natural de zB7R1 con su contrarreceptor o sus contrarreceptores, dando como resultado de este modo la inhibición de la activación de células T (posiblemente células B) y proliferación y función efectora.

En una realización de la divulgación, se proporcionan agentes bioactivos y métodos para aumentar y/o regular positivamente la actividad de células B y T. En una realización preferida, dichos agentes bioactivos comprenden antagonistas de la señalización mediada por zB7R1. En una realización particularmente preferida, dichos agentes bioactivos comprenden agentes de bloqueo como se describen en el presente documento, y en una realización específica, dichos agentes de bloqueo son capaces de interferir con la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor. En una realización adicional, se proporcionan composiciones adyuvantes que utilizan zB7R1 y/o sus agentes de bloqueo de contrarreceptores y otros antagonistas de señalización mediada por zB7R1.

En una realización alternativa de la divulgación se proporcionan agentes bioactivos y métodos para inhibir y/o regular negativamente la actividad de linfocitos B y T. En una realización preferida dichos agentes bioactivos comprenden agonistas de señalización mediada por zB7R1. En una realización particularmente preferida, dichos agentes bioactivos comprenden agentes miméticos como se describe en el presente documento, y en una realización específica, dichos agentes miméticos son capaces de reemplazar y/o incrementar la interacción de zB7R1 y su contrarreceptor. En una realización adicional, se proporcionan composiciones inmunosupresoras que utilizan zB7R1 y/o sus agentes miméticos de contrarreceptores y otros agonistas de la señalización mediada por zB7R1.

En una realización adicional de la divulgación, se proporcionan métodos y composiciones para modular la producción de inmunoglobulina por linfocitos B.

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

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

La presente divulgación también contempla anticuerpos anti idiotípicos, o fragmentos de anticuerpos anti idiotípicos, que se unen específicamente con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente con un

polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 6 o un fragmento de la misma. Un anticuerpo anti idiotípico a modo de ejemplo se une con un anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 3 o 7.

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

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

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

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

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

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

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

De forma similar, pueden seleccionarse agentes de bloqueo de contrarreceptores de zB7R1 o antagonistas adecuados del grupo que comprende o consiste en anticuerpos anti contrarreceptor de zB7R1 capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de un contrarreceptor de zB7R1 (es decir CD155; SEQ ID NO: 22) e interferir con la interacción de un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, moléculas pequeñas inhibidoras de la interacción entre un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1, polipéptidos y proteínas de fusión de contrarreceptor a zB7R1 solubles que tienen secuencias de aminoácidos de contrarreceptor a zB7R1 modificadas para interferir con la

integración de un contrarreceptor de zB7R1 y zB7R1 e incapaces de activar la señalización mediada por zB7R1, y similares. Los antagonistas de contrarreceptores de zB7R1 alternativos incluyen oligonucleótidos antisentido dirigidos a la secuencia de ácido nucleico de contrarreceptor de zB7R1 (es decir CD155; SEQ ID NO: 20), moléculas de ARN inhibidoras, moléculas pequeñas inhibidoras de la expresión de un contrarreceptor de zB7R1, y similares.

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

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

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

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

En una realización específica adicional de la divulgación, se proporcionan métodos para inhibir, atenuar y/o reducir la actividad de linfocitos que comprende poner en contacto un linfocito B o T con un agonista de señalización mediada por zB7R1, seleccionándose dicho agonista del grupo que consiste en polipéptidos de contrarreceptor de zB7R1 solubles y proteínas de fusión de contrarreceptor de zB7R1 capaces de activar la señalización mediada por zB7R1, anticuerpos anti zB7R1 activadores de función capaces de unirse con al menos una parte del dominio extracelular de zB7R1 y estimular la señalización mediada por zB7R1, vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas zB7R1 funcionales intracelularmente, potenciadores de molécula pequeña de expresión de zB7R1 y/o señalización mediada por zB7R1, potenciadores de molécula pequeña de la interacción entre un contrarreceptor zB7R1 y zB7R1, potenciadores de molécula pequeña de la expresión de un contrarreceptor zB7R1, y vectores de terapia génica capaces de producir de forma recombinante moléculas contrarreceptoras funcionales zB7R1 intracelularmente.

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

En un aspecto alternativo, la presente divulgación proporciona agentes bioactivos y métodos para modular la interacción de una célula que expresa contrarreceptor de zB7R1 y un linfocito que expresa zB7R1. En una realización preferida, se proporcionan agentes bioactivos y métodos para interferir con la interacción de células tumorales positivas para contrarreceptor a zB7R1 con células T, dando como resultado la inhibición de la señalización mediada por zB7R1 negativa. En una realización especialmente preferida, la célula T es una célula CD4+ o una célula CD8+. En una realización adicional, la célula T CD4+ es una célula Th1.

En otra realización preferida de la divulgación, se proporcionan agentes bioactivos y métodos para imitar o potenciar la interacción de un contrarreceptor de zB7R1/ células no linfoides no tumorales positivas para CD155 con células T positivas para zB7R1, reduciendo de este modo la actividad de células T. En una realización especialmente preferida, la célula T es una célula T CD4+ o una célula T CD8+. En una realización adicional, la célula T CD4+ es una célula Th1.

La invención proporciona un inhibidor de la unión de zB7R1 con CD155 para su uso en el tratamiento de cánceres caracterizados por la presencia de células tumorales que expresan un contrarreceptor zB7R1 (CD155), como se define en las reivindicaciones. El antagonista de la señalización mediada por zB7R1 como se define en las reivindicaciones se usa solo o junto con protocolos alternativos de inmunoterapia, quimioterapia y/o radioterapia contra el cáncer. En una realización preferida, dicho al menos un antagonista de zB7R1 es capaz de interferir con la interacción de zB7R1 y un contrarreceptor zB7R1 e inhibir la señalización mediada por zB7R1. Preferiblemente, la administración de dichos agentes de bloqueo es eficaz para aumentar la actividad de las células T dirigida contra antígenos tumorales distintos de un contrarreceptor zB7R1 en las células tumorales, y en particular, para aumentar la actividad de las células T citotóxicas. Aún más preferiblemente, la administración de los antagonistas del sujeto es eficaz para inhibir el crecimiento de las células tumorales que expresan el contrarreceptor zB7R1.

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

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

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

Tratamiento de enfermedad autoinmunitaria

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

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

En la presente divulgación también se contemplan enfoques genéticos para enfermedades autoinmunitarias.

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

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

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

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

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

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

En la presente invención también se contempla una terapia de combinación para su uso en el tratamiento del cáncer, como se define en las reivindicaciones.

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

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

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

células T auxiliares receptoras lejos de una respuesta de tipo Th-1 desfavorable y hacia una respuesta de tipo Th-2 más favorable.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un medicamento para uso en trasplante e inmunosupresión.

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

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

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

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

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

Los aspectos de la invención resultarán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada.

2. Definiciones

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

Como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fragmentos generados por cualquiera de ligamiento, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden componerse de monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas α-enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases pirimidínicas o purínicas. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o pueden funcionalizarse azúcares como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar completo puede reemplazarse con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Los ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden unirse por enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato,

fosforoanilotioato, fosforoanilidato, fosforoamidato y similares. La expresión “molécula de ácido nucleico” también incluye los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácido nucleico de origen natural o modificadas unidas a una cadena principal de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

La expresión “complemento de una molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia.

La expresión “secuencia de nucleótidos degradada” indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degradados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degradados contienen tripletes diferentes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

La expresión “gen estructural” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se trascribe a ARN mensajero (ARNm), que después se traduce a una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

Una “construcción de molécula de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico, bien mono o bien bicatenaria, que se ha modificado mediante intervención humana para contener segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición no existente en la naturaleza.

“ADN lineal” indica moléculas de ADN no circular que tienen extremos 5’ y 3’ libres. Puede prepararse ADN lineal a partir de moléculas de ADN circular cerrado, tales como plásmidos, mediante digestión enzimática o rotura física.

"ADN complementario (ADNc)" es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de un molde de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. normalmente, se emplea un cebador complementario de partes de ARNm para el inicio de la trascripción inversa. Los expertos en la materia también usan el término “ADNc” para hacer referencia a una molécula de ADN bicatenario que consiste en dicha molécula de ADN monocatenario y su cadena de ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de un molde de ARN.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. normalmente, un promotor se localiza en la región no codificante 5’ de un gen, próximo al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de promotores que actúan en el inicio de la transcripción se caracterizan con frecuencia por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSEs; McGehee *et al*., Mol. Endocrinol. 7:551 (1993)), elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta de suero (SREs; Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1: 47 (1990)), elementos de respuesta de glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O’Reilly *et al*., J. Biol. Chem. 267: 19938 (1992)), AP2 (Ye *et al*., J. Biol. Chem. 269: 25728 (1994)), SP1, proteína de unión a elementos de respuesta de AMPc (CREB; Loeken, Gene Expr. 3: 253 (1993)) y factores octaméricos (véase, en general Watson *et al*., eds., Molecular Biology of the Gene, 4ª ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre y Rousseau, Biochem. J. 303: 1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, entonces la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores reprimibles.

Un “promotor central” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función promotora, incluyendo la caja TATA y el inicio de transcripción. Por esta definición, un promotor central puede tener o no actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica de tejido.

Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares que permiten la transcripción exclusiva o preferentemente en células, tejidos u orgánulos particulares. Estos tipos de elementos reguladores están asociados normalmente a genes que se expresan de una manera “específica de célula”, “específica de tejido” o “específica de orgánulo”.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En general, la unión del contrarreceptor con el receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor

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

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

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

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

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

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

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

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

La expresión “par de complemento/anticomplemento” indica restos no idénticos que forman un par estable asociado de forma no covalente en condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros pares de complemento/anticomplemento a modo de

ejemplo incluyen pares de receptor/contrarreceptor, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítopo), pares de polinucleótidos con sentido/antisentido y similares. Cuando sea deseable la disociación posterior del par de complemento/anticomplemento, el par de complemento/anticomplemento preferentemente tiene una afinidad de unión de menos de 10^9 M^{-1}.

Un “anticuerpo antiidiotípico” es un anticuerpo que se une con el dominio de región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo antiidiotípico se une con la región variable de un anticuerpo anti zB7R1, y por lo tanto, un anticuerpo antiidiotípico imita un epítopo de zB7R1.

Un “fragmento de anticuerpo” es una parte de un anticuerpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab’, Fab, y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti zB7R1 se une con un epítopo de zB7R1.

La expresión “fragmento de anticuerpo” también incluye un polipéptido modificado genéticamente o uno sintético que se une con un antígeno específico, tal como polipéptidos que consisten en la región variable de cadena ligera, fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas monocatenarias recombinantes en las que se conectan regiones variables ligera y pesada por un enlazador peptídico ("proteínas scFv"), y unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.

Un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinantes de complementariedad derivadas de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.

Los “anticuerpos humanizados” son proteínas recombinantes en las que se han transferido regiones determinantes de complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal desde cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano. La construcción de anticuerpos humanizados para uso terapéutico en seres humanos que derivan de anticuerpos murinos, tales como los que se unen con o neutralizan una proteína humana, está dentro de la experiencia de un experto en la materia.

Como se usa en el presente documento un “agente terapéutico” es una molécula o un átomo que se conjuga con un resto de anticuerpo para producir un conjugado que es útil para terapia. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes y radioisótopos.

Un “marcador detectable” es una molécula o un átomo que puede conjugarse con un resto de anticuerpo para producir una molécula útil para diagnóstico. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.

La expresión “marcador de afinidad” se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que puede unirse con un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para unión del segundo polipéptido con un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para el que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico puede usarse como un marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen un tramo de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al*., EMBO J. 4: 1075 (1985); Nilsson *et al*., Methods Enzymol. 198: 3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31 (1988)), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp *et al*., Biotechnology 6: 1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina u otro epítopo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al*., Protein Expression and Purification 2: 95 (1991). Están disponibles moléculas de ADN que codifican marcadores de afinidad de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo completo, a diferencia de un fragmento de anticuerpo, que no se conjuga con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como ciertos anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.

Como se usa en el presente documento, la expresión “componente de anticuerpo” incluye tanto un anticuerpo completo como un fragmento de anticuerpo.

Un “inmunoconjugado” es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o un marcador detectable.

Como se usa en el presente documento, la expresión “proteína de fusión de anticuerpo” se refiere a una molécula recombinante que comprende un componente de anticuerpo y un componente polipeptídico de zB7R1. Los ejemplos de una proteína de fusión de anticuerpo incluyen una proteína que comprende un dominio extracelular de zB7R1, y un dominio Fc o una región de unión a antígeno.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La expresión “variante alélica” se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Surge variación alélica de forma natural mediante

mutación, y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente divulgación incluye fragmentos funcionales de genes de zB7R1. Dentro del contexto de la presente

divulgación, “fragmento funcional” de un gen de zB7R1 se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una parte de un polipéptido de zB7R1 que es un dominio descrito en el presente documento o se une al menos específicamente con un anticuerpo anti-zB7R1.

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

3. Producción de polinucleótidos o genes de zB7R1

Pueden obtenerse moléculas de ácido nucleico que codifican un gen de zB7R1 humano explorando una biblioteca de ADNc o genómica humana usando sondas polinucleotídicas basadas en SEQ ID NO: 1 o 5. Estas técnicas son convencionales y bien establecidas, y pueden conseguirse usando kits de clonación disponibles de proveedores comerciales. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al*. (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición, John Wiley & Sons 1995; Wu *et al*., Methods in Gene Biotechnology, CRC Press, Inc. 1997; Aviv y Leder, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 69: 1408 (1972); Huynh *et al*., “Constructing and Screening cDNA Libraries en λgt10 and λ gt11,” en DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I, Glover (ed.), página 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) en las páginas 47-52.

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

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

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

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

Tabla 1

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

(continuación)

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
K	G|T	M	A|C
S	C|G	S	C|G
W	A|T	W	A|T
H	A|C|T	D	A|G|T
B	D|G|T	V	A|C|G
V	A|C|G	B	C|G|T
D	A|G|T	H	A|C|T
N	A|C|G|T	N	A|C|G|T

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

Tabla 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente divulgación también contempla moléculas de ácido nucleico variantes de zB7R1 que pueden

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

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

Tabla 3

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

Los expertos en la materia aprecian que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una variante de zB7R1

potencial. El algoritmo FASTA se describe en Pearson y Lipman, Proc. Acad Nat. Sci. USA 85: 2444 (1988), y en Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990). Brevemente, FASTA caracteriza en primer lugar la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia de consulta (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3) y una secuencia de ensayo que tiene la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup = 2), sin considerar sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos conservativas. Las diez regiones con la mayor densidad de identidades se vuelven a puntuar después comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos y los extremos de las regiones se "recortan" para incluir solamente los restos que contribuyen a la mayor puntuación. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor de "punto de corte" (calculado por una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor ktup), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones de mayor puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970) Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)), que permite inserciones y supresiones de aminoácidos. Son parámetros ilustrativos para análisis de FASTA: ktup=1, penalización de apertura de hueco=10, penalización de extensión de hueco=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

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

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

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

Las proteínas de la presente divulgación también pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, *N*-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, ácido tiazolidincarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y

4-fluorofenilalanina. Se conocen varios métodos en la técnica para incorporar restos de aminoácidos de origen no natural en proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido usando ARNt supresores aminoacilados químicamente. Se conocen en la técnica métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se realiza normalmente en un sistema sin células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson *et al*., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722 (1991), Ellman *et al*., Methods Enzymol. 202: 301 (1991), Chung *et al*., Science 259: 806 (1993), y Chung *et al*., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 10145 (1993).

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

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

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

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

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

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

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

La presente divulgación también incluye “fragmentos funcionales” de polipéptidos de zB7R1 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Pueden realizarse análisis de supresión rutinarios de moléculas de ácido nucleico para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de zB7R1. Como ilustración, las moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 5 pueden digerirse con nucleasa *Bal*31 para obtener una serie de supresiones anidadas. Los fragmentos después se insertan en vectores de expresión en fase de lectura apropiada, y los polipéptidos expresados se aíslan y se ensayan con respecto a la capacidad para unirse con anticuerpos anti zB7R1. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es usar mutagénesis dirigida a oligonucleótido para introducir supresiones o codones de terminación para especificar la producción de un fragmento deseado. Como alternativa, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un gen de zB7R1 usando la reacción en cadena de la polimerasa.

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Producción de polipéptidos de zB7R1 y CD155

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El virus o bácmido recombinante se usa para transfectar células hospedadoras. Las células hospedadoras de insecto adecuadas incluyen líneas celulares derivadas de IPLB-*Sf*-21, una línea celular ovárica de pupa de *Spodoptera frugiperda*, tal como *Sf*9 (ATCC CRL 1711), *Sf*21AE y *Sf*21 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), así como células Schneider-2 de *Drosophila*, y la línea celular HIGH FIVEO (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente de Estados Unidos n.º 5.300.435). Pueden usarse medios sin suero disponibles en el mercado para cultivar y mantener las células. Los medios adecuados son Sf900 II™ (Life Technologies) o ESF 921™ (Expression Systems) para las células Sf9; y ExcellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO™ (Life Technologies) para las células *T. ni*. Cuando se usa virus recombinante, las células se cultivan normalmente a partir de una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10^5 células hasta una densidad de 1-2 x 10^6 células momento en el cual se añade una reserva viral recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más normalmente cerca de 3.

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

También pueden usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura, para expresar los genes descritos en el presente documento. Las especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Los promotores adecuados para expresión en levadura incluyen promotores de *GAL1* (galactosa), *PGK* (fosfoglicerato quinasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *AOX1* (alcohol oxidasa), *HIS4* (histidinol deshidrogenasa) y similares. Se han diseñado muchos vectores de clonación de levadura y están fácilmente disponibles. Estos vectores incluyen vectores basados en YIp, tales como YIp5, vectores de YRp, tales como YRp17, vectores de YEp tales como YEp13 y vectores de YCp, tales como YCp19. Se desvelan métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir del

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente divulgación también abarca métodos para producir polipéptidos de zB7R1 o CD155 multiméricos, preferentemente tetraméricos. Estas proteínas se describen en más detalle en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º 60/60/791.626, presentada el 13 de abril de 2006. Estas proteínas de fusión comprenden un dominio VASP y un dominio de proteína heterólogo, tal como zB7R1 o CD155. Los dominios VASP derivan del gen de VASP presente en muchas especies. Las secuencias se seleccionan por su capacidad anticipada para formar estructura de proteína superenrollada, ya que esta estructura es importante para la capacidad de formar formas proteicas multiméricas. Se desea en particular para la presente divulgación la capacidad de proteínas superenrolladas para producir estructuras proteicas tetraméricas. Una realización particularmente preferida utiliza los aminoácidos 343 a 376 de la secuencia de VASP humana (aminoácidos 5 a 38 de SEQ ID NO: 23). La secuencia de ADN de longitud completa de esta proteína es SEQ ID NO: 24 y la secuencia polipeptídica de longitud completa de esta proteína es SEQ ID NO: 25.

El trabajo con otros tipos de secuencias multimerizantes, por ejemplo, la cremallera de leucina, ha mostrado que pueden tolerarse con frecuencia un número limitado de sustituciones de aminoácidos conservativas (incluso en el resto **d**) en secuencias de cremallera sin la pérdida de capacidad de las moléculas para multimerizar (Landschultz *et al*., (1989), mencionado anteriormente). Por lo tanto, se contemplan cambios conservativos de la secuencia nativa para el dominio VASP dentro del alcance de la divulgación. La Tabla 4 muestra los cambios conservativos que se anticipa que se toleren por la estructura superenrollada.

Tabla 4

Sustituciones de aminoácidos conservativas

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

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

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

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

Un componente adicional de la proteína de fusión puede ser un marcador de afinidad. Dichos marcadores no alteran la actividad biológica de las proteínas de fusión, son altamente antigénicos, y proporcionan un epítopo que puede unirse de forma reversible con una molécula de unión específica, tal como un anticuerpo monoclonal, que permite la detección rápida y purificación de una proteína de fusión expresada. Los marcadores de afinidad también pueden transmitir resistencia a degradación intracelular si se producen proteínas en bacterias, como *E. coli*. Un marcador de afinidad a modo de ejemplo es el Marcador FLAG (SEQ ID NO: 27) o el Marcador HIS_6 (SEQ ID NO: 28). Se describen métodos para producir proteínas de fusión que utilizan este marcador de afinidad para purificación en la

Patente de Estados Unidos n.º 5.011.912.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La divulgación proporciona además vectores recombinantes y células hospedadoras que comprenden polinucleótidos de la divulgación. En general, se aíslan vectores recombinantes y células hospedadoras de la divulgación; sin embargo, una célula hospedadora que comprende un polinucleótido de la divulgación puede ser

parte de un animal modificado genéticamente.

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

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

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

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

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

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

Los ácidos nucleicos objetivo pueden usarse para generar animales no humanos modificados genéticamente o modificaciones génicas específicas de sitio en líneas celulares. Se pretende que el término “transgénico” abarque animales modificados genéticamente que tengan la adición de ADN que codifica la proteína de fusión heteróloga de VASP o que tengan un ADN exógeno que codifique la proteína de fusión heteróloga de VASP que se transmite de forma estable en las células hospedadoras. Pueden realizarse animales transgénicos mediante recombinación homóloga. Como alternativa, se integra aleatoriamente en el genoma una construcción de ácido nucleico. Los

vectores para integración estable incluyen plásmidos, retrovirus y otros virus animales, YAC y similares. Son de interés mamíferos transgénicos, por ejemplo vacas, cerdos, cabras, caballos, etc., y particularmente roedores, por ejemplo ratas, ratones, etc.

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

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

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

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

La actividad biológica de proteínas de fusión heterólogas de VASP recombinantes está mediada por la unión de la proteína de fusión recombinante con una molécula afín, tal como un receptor o receptor cruzado. Una molécula afín se define como una molécula que se une con la proteína de fusión recombinante en una interacción no covalente basada en la conformación apropiada de la proteína de fusión recombinante y la molécula afín. Por ejemplo, para una proteína de fusión recombinante que comprende una región extracelular de un receptor, la molécula afín

comprende un ligando que se une con la región extracelular del receptor. Por el contrario, para una proteína de fusión soluble recombinante que comprende un ligando, la molécula afín comprende un receptor (o proteína de unión) que se une con el ligando.

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

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

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

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

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

Se usan células que expresan receptor funcional dentro de ensayos de cribado. Se conocen en la técnica diversos ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en una célula diana. Uno de dichos ensayos es un ensayo de proliferación celular. Se cultivan células en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo, y se detecta proliferación celular, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o mediante ensayo colorímetro basado en la degradación metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, (1983)). Un formato de ensayo alternativo usa células que se modifican técnicamente adicionalmente para expresar un gen indicador. El gen indicador se une a un elemento promotor que es sensible a la ruta ligada a receptor, y el ensayo detecta activación de la transcripción del gen

indicador. Un elemento promotor preferido a este respecto es un elemento de respuesta de suero o SRE. Véase, por ejemplo, Shaw *et al*., Cell 56: 563-572, (1989). Un gen indicador tal preferido es un gen de luciferasa (de Wet *et al*., Mol. Cell. Biol. 7: 725, (1987)). Se detecta la expresión del gen de luciferasa mediante luminiscencia usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Baumgartner *et al.,* J. Biol. Chem. 269: 29094-29101, (1994); Schenborn y Goiffin, Promega_Notes 41: 11, 1993). Los kits de ensayo de actividad luciferasa están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Promega Corp., Madison, WI. Pueden usarse líneas celulares diana de este tipo para cribar bibliotecas de productos químicos, medios de cultivo acondicionados a las células, caldos fúngicos, muestras de suelo, muestras de agua y similares. Por ejemplo, puede ensayarse un banco de muestras de medio acondicionado a células en una célula diana para identificar células que producen contrarreceptor. Después se usan células positivas para producir una biblioteca de ADNc en un vector de expresión de mamífero, que se divide en grupos, se transfecta a células hospedadoras y se expresa. Después se ensayan muestras de medio de las células transfectadas, con división posterior de grupos, re-transfección, subcultivo y re-ensayo de células positivas para aislar un ADNc clonado que codifica el contrarreceptor.

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

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

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

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

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

Pueden usarse proteínas de fusión de zB7R1 para expresar zB7R1 en un hospedador recombinante, y para aislar el zB7R1 producido. Como se describe posteriormente, las proteínas de fusión de zB7R1 particulares también tienen usos en el diagnóstico y la terapia. Un tipo de proteína de fusión comprende un péptido que guía un polipéptido de zB7R1 de una célula hospedadora recombinante. Para dirigir un polipéptido de zB7R1 a la ruta secretora de una célula hospedadora eucariota, se proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como un péptido señal, una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión de zB7R1. Aunque la secuencia señal secretora puede derivar de zB7R1, una secuencia señal adecuada también puede derivar de otra proteína secretada o sintetizada *de novo*. La secuencia señal secretora está unida operativamente con una secuencia codificante de zB7R1 de modo que las dos secuencias se unen en la fase de lectura correcta y se sitúan para dirigir el polipéptido de nueva síntesis a la ruta secretora de la célula hospedadora. Las secuencias señal secretoras se sitúan habitualmente 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal secretoras pueden situarse en otra parte en la secuencia de nucleótidos de interés (véase, por ejemplo, Welch *et al.,* Patente de Estados Unidos n.º 5.037.743; Holland *et al.,* Patente de Estados Unidos n.º 5.143.830).

Aunque la secuencia señal secretora de zB7R1 u otra proteína producida por células de mamífero (por ejemplo, secuencia señal activadora de plasminógeno de tipo tisular, como se describe, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos n.º 5.641.655) es útil para expresión de zB7R1 en hospedadores de mamífero recombinantes, se prefiere una secuencia señal de levadura para expresión en células de levadura. Son ejemplos de secuencia señal de levadura adecuadas las derivadas de factor α de feromona de apareamiento de levadura (codificada por el gen *MFα1*), invertasa (codificada por el gen *SUC2*) o fosfatasa ácida (codificada por el gen *PHO5*). Véase, por ejemplo, Romanos *et al*., "Expression of Cloned Genes in Yeast", en DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2ª Edición, Glover y Hames (eds.), páginas 123-167 (Oxford University Press 1995).

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

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

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

También pueden usarse polipéptidos de unión a contrarreceptor (es decir CD 155) dentro de otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen análisis de Scatchard para determinación de la afinidad de

unión (véase Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-72, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham *et al.,* Science 253: 545-48, 1991; Cunningham *et al.,* Science 245: 821-25, 1991).

La presente divulgación proporciona además otras diversas fusiones polipeptídicas adicionales y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, puede prepararse un receptor zB7R1 soluble como una fusión con una proteína dimerizante como se desvela en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas dimerizantes preferidas a este respecto incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, IgGγ1, y la cadena ligera κ humana. Pueden expresarse fusiones de zB7R1 soluble-inmunoglobulina en células modificadas por ingeniería genética para producir diversos análogos de receptor zB7R1 multiméricos. Pueden fusionarse dominios auxiliares con el receptor zB7R1 soluble para dirigirlos a células específicas, tejidos o macromoléculas (por ejemplo, colágeno, o células que expresan los contrarreceptores de zB7R1). Un polipéptido de zB7R1 puede fusionarse con dos o más restos, tales como un marcador de afinidad para purificación y un dominio de dirección. Las fusiones polipeptídicas también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan *et al.,* Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996.

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

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

Otra forma de proteína de fusión comprende un polipéptido de zB7R1 y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, normalmente un fragmento F_c que contiene dos o tres dominios de región constante y una región bisagra pero carece de la región variable. Como ilustración, Chang *et al*., Patente de Estados Unidos n.º 5.723.125, describen una proteína de fusión que comprende un interferón humano y un fragmento F_c de inmunoglobulina humana. El extremo C terminal del interferón se une al extremo N terminal del fragmento Fc por un resto de enlazador peptídico. Un ejemplo de un enlazador peptídico es un péptido que comprende principalmente una secuencia inerte de células T que está inmunológicamente inerte. En esta proteína de fusión, un resto Fc ilustrativo es una cadena γ4 humana, que es estable en solución y tiene poca o ninguna actividad activadora del complemento. En consecuencia, la presente divulgación contempla una proteína de fusión de zB7R1 que comprende un resto de zB7R1 y un fragmento Fc humano, en el que el extremo C terminal del resto de zB7R1 se une al extremo N terminal del fragmento Fc mediante un enlazador peptídico. El resto de zB7R1 puede ser una molécula de zB7R1 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender el aminoácido de SEQ ID NO: 3 y un fragmento Fc (por ejemplo, un fragmento Fc humano).

En otra variación, una proteína de fusión de zB7R1 comprende una secuencia de IgG, un resto de zB7R1 unido covalentemente con el extremo amino terminal de la secuencia de IgG, y un péptido señal que está unido covalentemente con el extremo amino terminal del resto de zB7R1, en el que la secuencia de IgG consiste en los siguientes elementos en el siguiente orden: una región bisagra, un dominio CH_2 y un dominio CH_3. En consecuencia, la secuencia de IgG carece de un dominio CH_1. El resto de zB7R1 presenta una actividad de zB7R1, como se describe en el presente documento, tal como la capacidad para unirse con un contrarreceptor de zB7R1. Este enfoque general para producir proteínas de fusión que comprenden partes tanto de anticuerpo como no de anticuerpo se ha descrito en LaRochelle *et al*., documento EP 742830 (WO 95/21258).

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

proteína de fusión con un soporte sólido. Dichos sistemas pueden usarse para identificar agonistas y antagonistas que interfieren con la unión de zB7R1 con su contrarreceptor.

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

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

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

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

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

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

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

La PEGilación por acilación requiere normalmente hacer reaccionar un derivado éster activo de PEG con un polipéptido de zB7R1. Un ejemplo de un éster de PEG activado es PEG esterificado a *N*-hidroxisuccinimida. Como se usa en el presente documento, el término “acilación” incluye los siguientes tipos de enlaces entre zB7R1 y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los métodos para preparar zB7R1 PEGilado por acilación normalmente comprenderán las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido de zB7R1 con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado de aldehído de PEG) en condiciones en las que uno o más grupos de PEG se

unen con zB7R1 y (b) obtener el producto o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y resultados deseados. Por ejemplo, cuanto mayor sea la relación de PEG: zB7R1, mayor será el porcentaje de producto de zB7R1 poliPEGilado.

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

La PEGilación por alquilación generalmente implica hacer reaccionar un derivado de aldehído terminal de PEG con zB7R1 en presencia de un agente reductor. Pueden unirse grupos de PEG con el polipéptido mediante un grupo -CH_2-NH.

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

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

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

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

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

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

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

8. Aislamiento de polipéptidos de zB7R1 o CD155

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

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

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

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

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

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

9. Producción de anticuerpos para proteínas de zB7R1

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

relacionados con ZB7R1.

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

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

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

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

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

Pueden prepararse anticuerpos policlonales para proteína de zB7R1 recombinante o para zB7R1 aislado de fuentes

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

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

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

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

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

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

Para usos particulares, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti zB7R1. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Como ilustración, pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldenberg, patente de Estados Unidos n.º 4.331.647, Nisonoff *et al*., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960), Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman *et al*., en Methods in Enzymology Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967), y en Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

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

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

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

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

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

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

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

Pueden prepararse anticuerpos anti idiotípicos policlonales inmunizando animales con anticuerpos anti zB7R1 o fragmentos de anticuerpo, usando técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Green *et al*., "Production of Polyclonal Antisera", en Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols, Manson (ed.), páginas 1-12 (Humana Press 1992). Además, véase Coligan en las páginas 2.4.1-2.4.7. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti idiotípicos monoclonales usando anticuerpos anti zB7R1 o fragmentos de anticuerpo como

inmunógenos con las técnicas, descritas anteriormente. Como otra alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti idiotípicos humanizados o anticuerpos anti idiotípicos de primates subhumanos usando las técnicas anteriormente descritas. Se describen métodos para producir anticuerpos anti idiotípicos, por ejemplo, en Irie, Patente de Estados Unidos n.º 5.208.146, Greene *et al*., Patente de Estados Unidos n.º 5.637.677, y Varthakavi y Minocha, J. Gen. Virol. 77: 1875 (1996).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente divulgación también contempla kits para realizar un ensayo de diagnóstico inmunológico para expresión génica de zB7R1. Dichos kits comprenden al menos un recipiente que comprende un anticuerpo anti zB7R1, o fragmento de anticuerpo. Un kit también puede comprender un segundo recipiente que comprende uno o más reactivos capaces de indicar la presencia de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de zB7R1. Los ejemplos de dichos reactivos indicadores incluyen marcadores detectables tales como marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente, oro coloidal y similares. Un kit también puede comprender un medio para transmitir al usuario que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de zB7R1 se usan para detectar proteína de zB7R1. Por ejemplo, instrucciones escritas pueden indicar

que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo incluido puede usarse para detectar zB7R1. El material escrito puede aplicarse directamente a un recipiente, o el material escrito puede proporcionarse en forma de un prospecto.

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

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

Pueden usarse anticuerpos para polipéptidos del receptor zB7R1 (por ejemplo, anticuerpos para SEQ ID NO: 2 o 5) o fragmentos de los mismos, tales como epítopos antigénicos para inhibir los efectos inflamatorios de zB7R1 *in vivo*, para uso terapéutico contra artritis reumatoide, psoriasis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, endotoxemia, artritis, asma, EII, colitis, artritis psoriásica u otras afecciones inflamatorias inducidas por B7; marcar células que expresan receptores zB7R1; para aislar polipéptidos de receptores que comprenden zB7R1 solubles mediante purificación de afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar los niveles en circulación de polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1 solubles; para detectar o cuantificar receptores que comprenden zB7R1 solubles como marcador de patología o enfermedad subyacente; en métodos analíticos que emplean FACS; para cribar bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos anti idiotípicos que pueden actuar como agonistas de zB7R1; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para unirse con, bloquear, inhibir, reducir o antagonizar la función del receptor zB7R1, o para unirse, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de zB7R1 *in vitro* e *in vivo*. Los marcadores o las etiquetas directos adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, biotina, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; los marcadores o etiquetas indirectos pueden presentar el uso de biotina-avidina u otros pares de complemento/anticomplemento como intermedios. Los anticuerpos del presente documento también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados usarse para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*. Además, pueden usarse anticuerpos para polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1 solubles, o fragmentos de los mismos, *in vitro* para detectar

polipéptidos de receptor que comprenden zB7R1 no desnaturalizados o desnaturalizados o fragmentos de los mismos en ensayos, por ejemplo, Transferencias de Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

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

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

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

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

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

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

Pueden usarse secuencias de aminoácidos que tienen actividad de zB7R1 soluble para modular el sistema inmunitario uniendo contrarreceptores de zB7R1 tales como CD155, y por lo tanto, prevenir la unión de contrarreceptor de zB7R1 con receptor zB7R1 endógeno. También pueden usarse antagonistas de zB7R1, tales como anticuerpos anti zB7R1, para modular el sistema inmunitario inhibiendo la unión del contrarreceptor de zB7R1 con el receptor zB7R1 endógeno. En consecuencia, la presente divulgación incluye el uso de proteínas, polipéptidos y péptidos que tienen actividad zB7R1 (tales como polipéptidos de zB7R1 solubles, fragmentos de polipéptidos de zB7R1, análogos de zB7R1 (por ejemplo, anticuerpos anti idiotípicos anti zB7R1) y proteínas de fusión de zB7R1) a un sujeto que carece de una cantidad adecuada de este polipéptido, o que produce un exceso de contrarreceptor de zB7R1. Los antagonistas de zB7R1 (por ejemplo, anticuerpos anti-zB7R1) también pueden usarse para tratar un sujeto que produce un exceso de contrarreceptor de zB7R1 o zB7R1. Los sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos. Por ejemplo, dichos polipéptidos de zB7R1 y anticuerpos anti zB7R1 son útiles en la unión, el bloqueo, la inhibición, la reducción, el antagonismo o la neutralización de zB7R1 y CD 155 (bien individualmente o juntos), en el tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias,

artritis psoriásica, artritis, endotoxemia, asma, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis y otras afecciones inflamatorias desveladas en el presente documento.

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

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

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

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

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

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

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

Por lo tanto, las realizaciones particulares de la presente divulgación se dirigen al uso de zB7R1 soluble y anticuerpos anti zB7R1 como agonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunitarias tales como psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, afecciones cutáneas inflamatorias, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, diverticulosis, asma, pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), cáncer pancreático, pancreatitis, enfermedad de Graves, cáncer de colon e intestinal, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, trasplante de órgano o médula ósea; inflamación debida a endotoxemia, traumatismo, cirugía o infección; amiloidosis; esplenomegalia; enfermedad de injerto contra hospedador; y cuando haya inhibición de

inflamación, inmunosupresión, reducción de la proliferación de células hematopoyéticas, inmunitarias, inflamatorias o linfoides, macrófagos, células T (incluyendo células Th1 y Th2), supresión de la respuesta inmunitaria a un patógeno o antígeno, u otros casos en los que se desea inhibición de zB7R1.

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

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

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

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

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

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

1. Artritis

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

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

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

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

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

con colágeno, o en cualquier punto temporal después de la segunda inmunización con colágeno, incluyendo los puntos temporales en los que la enfermedad ya ha progresado), B7R1-Fc o B7R1m -VASP CH6 pueden ser eficaces en la prevención de la artritis reumatoide, así como prevención de su progresión. Otros productos terapéuticos potenciales incluyen polipéptidos de CD155 o anticuerpos anti CD155.

2. Endotoxemia

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

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

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

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

3. Enfermedad Inflamatoria del Intestino. EII

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

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, habitualmente denominado el colon, caracterizada por inflamación y ulceración de la mucosa o el revestimiento interno del colon. Esta inflamación provoca que el colon se vacíe frecuentemente, dando como resultado diarrea. Los síntomas incluyen disgregación de las heces y dolores abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de CU se desconoce, estudios recientes sugieren que las defensas naturales del cuerpo actúan contra proteínas del cuerpo que el cuerpo cree que son ajenas (una “reacción autoinmunitaria”). Quizá porque se asemejan a proteínas bacterianas en el intestino, estas proteínas pueden instigar o estimular el proceso inflamatorio que comienza a destruir el revestimiento del colon. A medida que el revestimiento del colon se destruye, se forman úlceras liberando moco, pus y sangre. La enfermedad comienza habitualmente en el área rectal y puede extenderse con el tiempo por todo el intestino grueso. Episodios repetidos de inflamación conducen a engrosamiento de la pared del intestino y el recto con tejido cicatricial. Con enfermedad grave puede producirse muerte de tejido del colon o septicemia. Los síntomas de colitis ulcerosa varían en su gravedad y su aparición puede ser gradual o repentina. Los ataques pueden estar provocados por muchos factores, incluyendo infecciones respiratorias o tensión.

Aunque no existe en la actualidad ninguna cura para CU disponible, los tratamientos se centran en suprimir el proceso inflamatorio anómalo en el revestimiento del colon. Están disponibles para tratar la enfermedad tratamientos

incluyendo corticosteroides inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos. Sin embargo, el uso a largo plazo de inmunosupresores tales como corticosteroides y azatioprina puede dar como resultado efectos secundarios graves incluyendo debilitamiento de los huesos, cataratas, infección y efectos en el hígado y la médula ósea. En los pacientes en los que las terapias actuales no son exitosas, la cirugía es una opción. La cirugía implica la retirada del colon completo y el recto.

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

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

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

4. Psoriasis

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

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

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

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

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

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

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

Además, la psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica que se asocia a queratinocitos epidérmicos hiperplásicos y células mononucleares de infiltración, incluyendo células T de memoria CD4+, neutrófilos y macrófagos (Christophers, Int. Arch. Allergy Immunol., 110: 199, 1996). Se creen en la actualidad que los antígenos ambientales desempeñan un papel significativo en el inicio y la contribución a la patología de la enfermedad. Sin embargo, es la pérdida de tolerancia a auto-antígenos lo que se cree que media en la patología de la psoriasis. Se cree que las células dendríticas y células T $CD4^+$ desempeñan un papel importante en la presentación de antígeno y reconocimiento que median en la respuesta inmunitaria que conduce a la patología. Se ha desarrollado recientemente un modelo de psoriasis basado en el modelo de transferencia CD4+CD45RB (Davenport *et al*.,

Internat. Immunopharmacol., 2: 653-672). Se administran anticuerpos anti-zB7R1 de la presente invención, o zB7R1 soluble, a los ratones. La inhibición de las puntuaciones de enfermedad (lesiones cutáneas, citocinas inflamatorias) indica la eficacia de antagonistas de zB7R1 en psoriasis, por ejemplo, anticuerpos anti-zB7R1 o receptores solubles de zB7R1, u otros antagonistas tales como anticuerpos contra el contrarreceptor de zB7R1.

5. Dermatitis atópica

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

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

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

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

La administración de zB7R1 soluble o anticuerpos anti-zB7R1 a un sujeto puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, por perfusión a través de un catéter regional o por

inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas por inyección, la administración puede ser por infusión continua o por emboladas individuales o múltiples.

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

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

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

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

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

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

de liposomas menores por las células del sistema reticuloendotelial se ha usado para suministrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

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

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

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

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

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

Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Se preparan microesferas a partir de polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres), polímeros de etilenvinilacetato no biodegradables, en los que las proteínas se inmovilizan en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem. 6: 332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", en Protein Delivery*:* Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus *et al*., Science 281: 1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también puede proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref *et al.,* Pharm. Biotechnol. 10: 167 (1997)).

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

Pueden idearse otras formas de dosificación por los expertos en la materia, como se muestra, por ejemplo, en Ansel y Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5ª Edición (Lea y Febiger 1990), Gennaro

(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995), y en Ranade y Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996).

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

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

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

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

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

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

colesterol (Ch) se dirige al hígado (Shimizu *et al.,* Biol Pharm. Bull. 20: 881 (1997)).

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

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

Pueden encapsularse anticuerpos neutralizantes anti-zB7R1 y compañeros de unión con actividad de unión a zB7R1, o receptor soluble de zB7R1, dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson *et al*., Infect Immun., 31: 1099 (1981), Anderson *et al*., Cancer Res. 50: 1853 (1990), y Cohen *et al*., Biochim, Biophys Acta 1063: 95 (1991), Alving *et al*., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," en Liposome Technology, 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al*., Meth. Enzymol. 149: 124 (1987)). Como se ha observado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen *et al*., Biochim, Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).

Se han diseñado microesferas de polímeros degradables para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli (lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres), polímeros de etilvinilacetato no biodegradables, en los que las proteínas están inmovilizadas en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem., Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995), Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus *et al*., Science 281: 1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref *et al*., Pharm. Biol., 10: 167 (1997)).

La presente divulgación también contempla anticuerpo anti zB7R1 modificado químicamente o compañero de unión, por ejemplo anticuerpos anti zB7R1 o receptor soluble de zB7R1, unido con un polímero, como se ha analizado anteriormente.

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

La presente divulgación contempla composiciones de anticuerpos anti zB7R1 y métodos y usos terapéuticos que comprenden un anticuerpo, péptido o polipéptido descrito en el presente documento. Dichas composiciones pueden comprender además un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Los ejemplos de vehículos incluyen agua, solución de tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

12. Producción de ratones transgénicos

También pueden usarse ácidos nucleicos que codifican zB7R1 o formas modificadas del mismo para generar animales transgénicos o animales "nuligénicos" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el el cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, habiéndose introducido dicho transgén en el animal o un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo, uno embrionario. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, puede usarse ADNc que codifica una proteína de zB7R1 para clonar ADN genómico que codifica una proteína de zB7R1 de acuerdo con técnicas establecidas y las

secuencias genómicas usadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan el ADN deseado. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han hecho convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.736.866 y 4.870.009.

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

La invención se define en las reivindicaciones y se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Construcción de expresión de zB7R1 murina

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

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

La recombinación se realizó usando el kit de Clonación de PCR BD In-Fusion™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La mezcla del fragmento de PCR y el vector digerido en 10 µl se añadió a los reactivos de clonación liofilizados y se incubó a 37 ºC durante 15 minutos y 50 ºC durante 15 minutos. La reacción estuvo lista para transformación. Se transformaron 2 µl de reacción de recombinación en Células Competentes Químicas TOP10 One Shot (Invitrogen, Carlbad, CA); La transformación se incubó en hielo durante 10 minutos y se sometió a choque térmico a 42 ºC durante 30 segundos. La reacción se incubó en hielo durante 2 minutos (ayudando a las células transformadas a recuperarse). Después de los 2 minutos de incubación, se añadieron 300 µl de SOC (Triptona Bacto™ 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, y $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) y la transformación se incubó a 37 ºC con agitador durante una hora. La transformación completa se sembró en una placa de LB AMP (caldo de cultivo LB (Lennox), Agar Bacto™ 1,8 % (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

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

Ejemplo 2

zB7R1mFc2pZMP21 de ratón

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

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

La recombinación se realizó usando el kit de Clonación de PCR BD In-Fusion™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La mezcla del fragmento de PCR y el vector digerido en 10 µl se añadió a los reactivos de clonación liofilizados y se incubó a 37 ºC durante 15 minutos y 50 ºC durante 15 minutos. La reacción estuvo lista para transformación. Se transformaron 2 µl de reacción de recombinación en Células Competentes Químicas TOP10 One Shot (Invitrogen, Carlbad, CA); La transformación se incubó en hielo durante 10 minutos y se sometió a choque térmico a 42 ºC durante 30 segundos. La reacción se incubó en hielo durante 2 minutos (lo que ayuda a las células transformadas a recuperarse). Después de los 2 minutos de incubación, se añadieron 300 µl de SOC (Triptona Bacto™ 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) y la transformación se incubó a 37 ºC con agitador durante una hora. La transformación completa se sembró en una placa de LB AMP (caldo de cultivo LB (Lennox), Agar Bacto™ 1,8 % (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

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

Ejemplo 3

Construcciones de expresión B7/mFc2

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

Este fragmento de PCR se generó usando los cebadores zc48914 (SEQ ID NO: 35) y zc48908 (SEQ ID NO: 36) mediante amplificación a partir de una biblioteca de ADNc de placenta humana. Las condiciones de reacción de PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 ºC durante 1 minuto, 60 ºC durante 1 minuto y 72 ºC durante 2 minutos; 1 ciclo a 72 ºC durante 10 minutos; seguido de una inmersión a 4 ºC. Se generó un fragmento de 699 pares de bases por PCR que contenía los dominios constante 2 y constante 3 de la función efectora menos BALB-C IgG gamma 2a (mFc2). Este fragmento de PCR se generó usando los cebadores zc48911 y ac48915 mediante amplificación a partir de un vector de expresión que contenía mFc2 (mTACI/mFc2 construcción n.º 998). Las condiciones de reacción de PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 ºC durante 1 minuto, 60 ºC durante 1 minuto y 72 ºC durante 2 minutos; 1 ciclo a 72 ºC durante 10 minutos; seguido de una inmersión a 4 ºC. El fragmento de zB7R1 de 734 pares de bases y el fragmento mFc2 de 699 pares de bases se purificaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % y purificación de

bandas usando un kit de extracción en gel QiaQuick (Qiagen: 28704). 1/5º y 1/25º del total de las bandas purificadas para cada uno del zB7R1 y los fragmentos de mFc2, respectivamente, se recombinaron en pZMP21 que se había linealizado por digestión con BglII y purificado por purificación de bandas, como se ha descrito anteriormente, usando la cepa de levadura SF838-9Dalfa. La levadura que fue capaz de crecer a partir de placas de agar deficientes en uracilo se lisó y se extrajo ADN mediante precipitación con etanol. Se electroporaron 2 µl de la mezcla de ligamiento en 37 µl de *E. coli* electrocompetente DH10B (Gibco 18297-010) según las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se diluyeron en 400 µl de medio LB y se sembraron en placas de LB que contenían ampicilina 100 µg/ml. Los clones se analizaron por digestiones de restricción y se enviaron clones positivos para secuenciación de ADN para confirmar la precisión de la PCR.

El vector de expresión, pZMP21 hB7R1/mfc2, descrito anteriormente, se usó después para construir una serie de proteínas quiméricas solubles mFc2. zB7R1/mFc2 se construyó mediante PCR de un fragmento de 438 pares de bases usando oligos zc50136 (SEQ ID NO: 37) y zc50138 (SEC ID Nº 38) con clonetrack n.º 101632 como molde. El producto de PCR resultante se purificó en bandas, como se ha descrito anteriormente, y se digirió con EcoRI y BglII. El producto resultante se purificó de nuevo por bandas. También se digirió PZMP21 hB7R1/mFc2 con EcoRI y BglII y se aisló la cadena principal del vector de 9721 pares de bases más mFc2. 1/50º del producto de pZMP21 hB7R1/mFc2 se ligó a 3/50º del fragmento de 438 pares de bases usando ADN ligasa T4. Se introdujeron por electroporación 2 µl de la mezcla de ligamiento en 37 µl de *E. coli* electrocompetentes DH10B (Gibco 18297-010) de acuerdo con las directrices del fabricante. Las células transformadas se diluyeron en 400 µl de medio LB y se sembraron en placas de LB que contenían ampicilina 100 µg/ml. Los clones se analizaron por digestiones de restricción y se enviaron clones positivos para secuenciación de ADN para confirmar la precisión de la PCR. Se digirieron tres conjuntos de 200 µg de la construcción de pZMP21 hB7R1/mFc2 cada uno con 200 unidades de Pvu I a 37 ºC durante tres horas y después se precipitaron con IPA y se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se retiró por decantación del sedimento, y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70 % y se permitió que incubara durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a 14.000 RPM y el sobrenadante se retiró por decantación del sedimento. Después el sedimento se resuspendió en 750 µl de medio PF-CHO en un ambiente estéril, se permitió que se incubara a 60 ºC durante 30 minutos, y se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Se sedimentaron por centrifugación células 5E6 APFDXB11 en cada uno de tres tubos y se resuspendieron usando la solución de ADN-medio. Las mezclas de ADN/célula se colocaron en una cubeta de hueco de 0,4 cm y se sometieron a electroporación usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitación y 300 V. Después los contenidos de las cubetas se retiraron, se agruparon y se diluyeron hasta 25 ml con medio PF-CHO y se colocaron en un matraz de agitación de 125 ml. El matraz se colocó en un incubador en un agitador a 37 ºC, CO_2 6 %, y se agitó a 120 rpm. La línea celular se sometió a selección de nutrientes seguido de amplificación por etapas a metotrexato (MTX) 200 nM, y después a MTX 500 nM. La expresión se confirmó por transferencia de Western, y la línea celular se aumentó de escala y se siguió de purificación de proteínas.

Ejemplo 4

zB7R1Avi-HIS TagpZMP21 de ratón

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

La mezcla de reacción de PCR se procesa en un gel de agarosa al 2 % y se extrae en gel una banda correspondiente al tamaño del inserto usando un kit de extracción en gel QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA). El plásmido pZMP21 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor de MPSV, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación, un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40; y secuencias de URA3 y CEN-ARS requeridas para selección y replicación en *S. cerevisiae*. Se construye a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el n.º de Referencia 77145), un elemento de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) de poliovirus y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C terminal del dominio transmembrana. Se digirió el plásmido pZMP21AviHIS con EcoR1 y se usó para recombinación con el inserto de PCR.

La recombinación se realizó usando el kit de clonación de PCR BD In-Fusion™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La mezcla del fragmento de PCR y el vector digerido en 10 µl se añadió a los reactivos de clonación liofilizados y se incubó a 37 ºC durante 15 minutos y 50 ºC durante 15 minutos. La reacción estuvo lista para transformación. Se transformaron 2 µl de reacción de recombinación en Células Competentes Químicas One Shot

TOP10 (Invitrogen, Carlbad, CA); la transformación se incubó en hielo durante 10 minutos y se sometió a choque térmico a 42 ºC durante 30 segundos. La reacción se incubó en hielo durante 2 minutos (ayudando a las células transformadas a recuperarse). Después de 2 minutos de incubación, se añadieron 300 µl de SOC (Triptona Bacto™ 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) y la transformación se incubó a 37 ºC con agitador durante una hora. La transformación completa se sembró en una placa LB AMP (caldo de cultivo LB (Lennox), Agar Bacto™ 1,8 % (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

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

Ejemplo 5

zB7R1Avi-HIS TagpZMP21 humano

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

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

La recombinación se realizó usando el kit de clonación de PCR BD In-Fusion™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La mezcla del fragmento de PCR y el vector digerido en 10 µl se añadió a los reactivos de clonación liofilizados y se incubó a 37 ºC durante 15 minutos y 50 ºC durante 15 minutos. La reacción estuvo lista para transformación. Se transformaron 2 µl de reacción de recombinación en Células Competentes Químicas One Shot TOP10 (Invitrogen, Carlbad, CA); La transformación se incubó en hielo durante 10 minutos y se sometió a choque térmico a 42 ºC durante 30 segundos. La reacción se incubó en hielo durante 2 minutos (ayudando a las células transformadas a recuperarse). Después de 2 minutos de incubación, se añadieron 300 µl de SOC (Triptona Bacto™ 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) y la transformación se incubó a 37 ºC con agitador durante una hora. La transformación completa se sembró en una placa de LB AMP (caldo de cultivo de LB (Lennox), Agar Bacto™ 1,8 % (Difco), Ampicilina 100 mg/l).

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

Ejemplo 6

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

A. Introducción

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

B. Métodos

1) Aislamiento de médula ósea

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

(i) Generación de cultivos de células BMDC Flt3L

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

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

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

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

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

2) Análisis de FACS

Se realizaron todas las tinciones y diluciones en tampón de lavado de FACS (PBS, BSA 1 %, NaN_3 0,1 %). Antes de la tinción, se añadió FcBlock (0,25 µg/10^6 células) a las células y se incubó aproximadamente 5-10 minutos. Las células se cotiñeron con CD11c y B220. Todos los datos se adquirieron en BD FACSCalibur.

C. Estimulación de cultivos celulares:

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

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

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

BMDC Flt3L

(i) B7-1

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

(ii) B7-2

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

(iii) B7-H1

A las 24 h las células no estimuladas no expresan B7-H1, pero LPS, IFNγ y la mezcla de ligandos de TLR sí inducen expresión. Las células no estimuladas comienzan a expresar bajos niveles de B7-H1 a las 48 h, y LPS, IFNγ y la

mezcla de ligandos de TLR continúan mostrando regulación positiva del B7-H1 en relación con el control no estimulado. El tratamiento de CD40L no tuvo ningún efecto en la expresión de B7-H1 en relación con células no estimuladas.

(iv) B7-H2

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

(v) PD-1

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

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

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

BMDC GM-CSF/IL-4

(I) B7-1

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

(ii) B7-2

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

(iii) B7-H1

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

(iv) B7-H2

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

(v) B7-DC

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

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

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

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

Se cultivaron células como se ha descrito anteriormente, sin embargo las condiciones de estimulación se modificaron a (i) LPS 100 ng/ml, (ii) CD40L (1 µg/ml) e IFNγ (20 ng/ml) y (iii) cóctel de ligandos de TLR, con algunas modificaciones (se omitió LPS, y se usó CpG ODN 2395 en lugar de CpG ODN 1826 (ambos ligandos de TLR 9

murinos) y se usó ácido Poliuridílico en lugar de R848 (ambos ligandos de TLR 7/8)). Se ensayaron células con respecto a la unión con las proteínas de fusión de Fc disponibles de interés a las 48 h por citometría de flujo.

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

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

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

D. Conclusión

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

Ejemplo 7

Identificación de células que expresan zB7R1

A. Introducción

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

B. Procedimiento

Se recogió un bazo de ratón DO11.10 transgénico para un TCR específico para el péptido de Ova 323-339 y se trituró entre portaobjetos de vidrio esmerilado para obtener una suspensión celular individual. Los glóbulos rojos de la suspensión se lisaron usando tampón de lisis ACK. La suspensión celular resultante se ajustó a 1 x 10^6 células por pocillo en el medio (RPMI + FBS 10 %, glutamina, piruvato, pen-strep y 2-mercaptoetanol a $5X10^{-5}$ M) y se incubó con péptido de OVA 323-339 1 µM a 37 ºC. Las células se recogieron para análisis por citometría de flujo en los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas.

La proteína de fusión de zB7R1-mIgGFc2a se marcó directamente con PE usando el kit de marcaje de IgG2a de ratón de R-Ficoeritrina Zenon™ (Molecular Probes, Eugene Oregon, nº de cat Z25155) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron células recogidas en cada punto temporal en tampón de Facs (PBS + BSA 2 % + NaN_3 0,02 %) con 5 µg/ml de ZB7R1-mFc2a marcado con PE Zenon™. En algunos casos, estos experimentos de unión también se realizaron en presencia de exceso de 40 veces de zB7R1-mFc2a no marcado (bloqueante específico) o exceso de 40 veces de pB7H4L-mFc2a (bloqueante no específico). Se incubaron pocillos de control con el reactivo de marcaje de Zenon™ solo o con una proteína de fusión de Fc irrelevante marcada de la misma manera. Las células se incubaron simultáneamente con anticuerpos para los siguientes antígenos: CD11c-APC, CD11b-PerCP-CY5, CD49b-APC-CY7, CD3-PeCy7 CD19-FITC (BD Pharmingen), CD8-PE-Texas Red y CD4-A405 (Caltag) a diluciones apropiadas en tampón de FACS en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces (añadiendo tampón de Facs a 4X el volumen de marcaje y centrifugando las células a 300Xg durante 5 minutos, decantando el sobrenadante para cada lavado), después se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS durante 20 minutos. Las células se centrifugaron a 300Xg durante 5 minutos y se resuspendieron en 200 µl de tampón de FACs por cada $2X10^5$ células y se almacenaron a 4 ºC durante hasta 5 días. Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo (FACSAria, Becton Dickenson) y software FACS Diva.

C. Resultados

Las células viables se seleccionaron usando representaciones de puntos de dispersión frontales y laterales. Después se analizaron las células viables con respecto a expresión de CD11b y CD11c, así como con respecto a los otros marcadores de superficie en la combinación de tinción. En un experimento, se observó unión de zB7R1-mFc2a en células CD11c en todos los puntos temporales. En el mismo experimento, la unión de zB7R1-mFc2a en células

doble positivas para CD11b CD11c fue detectable solamente a las 48 y 72 horas. En otro experimento, se observó unión de zB7R1-mFc2a en células CD11c y células doble positivas para CD11c CD11b a las 48 y 72 horas. Las células positivas para CD11b pero negativas para CD11c no se unieron con zB7R1 significativamente más que las células teñidas con el reactivo de marcaje solamente o con una proteína de fusión de Fc irrelevante en todos los puntos temporales en ambos experimentos. Las células con un fenotipo de superficie $CD11c^{+}$ $CD11b^{+/-}$ se unieron con zB7R1 con una fluorescencia media de 1952 canales frente a 660 para el control. La muestra bloqueada específicamente con exceso de zB7R1-mFc2a no marcado tuvo una fluorescencia de canal media de 781 en comparación con 1682 para la muestra no bloqueada específicamente con exceso de pB7H4L-mFc2a.

D. Conclusión

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

Ejemplo 8

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

A. Procedimiento

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

B. Resultados

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

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

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

El ARNm de Zb7r1 aumentó en tejidos del modelo de EAE en comparación con tejidos de controles no enfermos. El ARNm de Zb7r1 aumentó 16,87 veces en el cerebro de animales desde la aparición temprana de enfermedad y 5,63 veces en animales con puntuaciones de enfermedad grave. El ARNm de Zb7r1 aumentó 4,15 veces en la médula espinal de animales de la aparición temprana de enfermedad y 6,93 veces en animales con puntuaciones de enfermedad grave.

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

cutáneo adyacente a la lesión psoriásica.

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

Ejemplo 9

Clonación y Construcción de vector de expresión de VASP

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

El ADN amplificado se fraccionó en gel de agarosa 1,5 % y después se aisló usando un kit de aislamiento en gel Qiagen según el protocolo del fabricante (Qiagen, Valiencia, CA). El ADN aislado se insertó en vector pzmp21 escindido con *Bgl*II mediante recombinación de levadura. La secuenciación de ADN confirmó la secuencia esperada del vector, que se designó pzmp21VASP-His_6.

El dominio extracelular de zB7R1 humano se generó mediante digestión con enzimas de restricción de zB7R1mFc2 humano (SEQ ID NO: 61). Se realizó una digestión doble con EcoRI y BglII (Roche Indianápolis, IN) para obtener el dominio extracelular. El fragmento se fraccionó en gel de agarosa al 2 % (Invitrogen Carlsbad, CA) y después se aisló usando un kit de aislamiento en gel Qiagen según el protocolo del fabricante (Qiagen Valencia CA). El fragmento aislado se insertó en vector pZMP21VASP-His_6 escindido con EcoRI/BglII mediante ligamiento (Fast Link Ligase EPICENTER Madison, WI). La construcción se designó hzB7R1VASPpZMP21 (SEQ ID NO: 62).

El dominio extracelular de zB7R1 de ratón se generó por digestión con enzimas de restricción de zB7R1mFc2 de ratón SEQ ID NO: 63. Se realizó una digestión doble con EcoRI y BglII (Roche Indianápolis, IN) para obtener el dominio extracelular. El fragmento se fraccionó en gel de agarosa al 2 % (Invitrogen Carlsbad, CA) y después se aisló usando un kit de aislamiento en gel Qiagen según el protocolo del fabricante (Qiagen Valencia CA). El fragmento aislado se insertó en vector pZMP21VASP-His_6 escindido por EcoRI/BglII mediante ligamiento (Fast Link Ligase EPICENTER Madison, WI). La construcción se designó mzB7R1VASPpZMP21 SEQ ID NO: 64.

Estos vectores incluyen la secuencia codificante para el dominio extracelular de zB7R1 (incluyendo la secuencia señal nativa) que comprende los aminoácidos 1 a 140 del gen de longitud completa (aminoácidos 1-140 de SEQ ID NO: 2), el enlazador flexible GSGG (SEQ ID NO: 27), el dominio de tetramerización VASP (aminoácidos 5 a 38 de SEQ ID NO: 54), el enlazador flexible GSGG (SEQ ID NO: 27) y los restos de aminoácidos del marcador de His_6 (aminoácidos 43 a 48 de SEQ ID NO: 54).

Ejemplo 10

Expresión y purificación de B7R1VASP-HIS_6

El vector pzmp21B7R1VASP-His_6 se transfectó en células BHK570 usando Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los cultivos se seleccionaron para resistencia de transfectantes a metotrexato 10 µM. Se transfirieron colonias resistentes a placas de cultivo tisular, se expandieron y se analizaron con respecto a secreción de B7R1VASP-His_6 mediante análisis de transferencia de western con anticuerpo anti His (C terminal) (Invitrogen, Carlsbad, CA). La línea celular resultante, BHK.B7R1VASP-His_6.2, se expandió.

A. Purificación de B7R1VASP-His_6 de células BHK

La purificación se realizó a 4 ºC. Se concentraron aproximadamente 2 l de medio acondicionado de BHK: B7R1VASP-His_6.2 hasta 0,2 l usando filtros de 5 k Pellicon-2 (Millipore, Bedford, MA), después se intercambió el tampón diez veces con $NaPO_4$ 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 15 mM, pH 7,5. La muestra final de 0,2 l se pasó a través de un filtro de 0,2 mm (Millipore, Bedford, MA).

Se empaquetó una columna Talon (BD Biosciences, San Diego, CA) con un volumen de lecho de 20 ml y se equilibró con NaPi 20 mM, Imidazol 15 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. El medio se cargó en la columna a un caudal de 0,2-0,4 ml/min, después se lavó con 5-6 VC del tampón de equilibrado. Se eluyó B7R1VASP-His_6 de la columna con $NaPO_4$ 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 0,5 M, pH 7,5 a un caudal de 4 ml/min. Se recogieron fracciones de 10 ml y se analizaron con respecto a la presencia de B7R1VASP-His_6 mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie.

Un grupo combinado de eluatos de Talon obtenidos de tres procesamientos idénticos como se ha descrito anteriormente se concentró de 60 ml a 3 ml usando un filtro de centrífuga 5 k Amicon Ultra (Millipore, Bedford, MA). Se equilibró una columna Superdex 200 con un volumen de lecho de 318 ml con NaPi 50 mM, NaCl 110 mM, pH 7,3 y se inyectó la muestra de 3 ml en la columna a un caudal de 0,5 ml/min. Se observaron dos picos de absorbancia a 280 nm eluyendo desde la columna, uno a 0,38 VC y el otro a 0,44 VC. Las fracciones que eluían aproximadamente 0,44 VC, que se creía que contenían B7R1VASP-His_6 tetramérico se agruparon y concentraron, se esterilizaron por filtración a través de un filtro de Acrodisc de 0,2 mm (Pall Corporation, East Hills, NY) y se almacenaron a -80 ºC. La concentración de la muestra final se determinó mediante BCA (Pierce, Rockford, IL).

B. Análisis por SEC-MALS de B7R1VASP-CH_6

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

Ejemplo 11

CD155 se une con zB7R1 soluble

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

Ejemplo 12

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

Se digirieron tres conjuntos de 50 µg de la construcción de proteína de fusión mzB7R1/Vasp cada uno digerido con 50 unidades de Pvu I a 37 ºC durante tres horas y después se precipitaron con IPA y se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se retiró por decantación del sedimento, y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70 % y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a 14.000 RPM y el sobrenadante se retiró por decantación de sedimento. El sedimento se resuspendió después en 750 µl de medio PF-CHO en un ambiente estéril, se dejó incubar a 60 ºC durante 30 minutos, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las células 5E6 APFDXB11 se centrifugaron en cada uno de tres tubos y se resuspendieron usando la solución de medio-ADN. Las mezclas de ADN/células se colocaron en una cubeta de hueco de 0,4 cm y se sometieron a electroporación usando los siguientes parámetros: 950 µF, alta capacitación y 300 V. Después los contenidos de las cubetas se retiraron, se agruparon y se diluyeron hasta 25 ml con medio PF-CHO y se colocaron en un matraz de agitación de 125 ml. El matraz se colocó en un incubador en un agitador a 37 ºC, CO_2 6 % y agitación a 120 RPM.

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

Ejemplo 13

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

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

A) Cribado de la biblioteca de mBMDC:

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

B) Transfecciones de células COS

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

C) Ensayo de trampa de secreción

La trampa de secreción se realizó de la siguiente manera: se aspiró medio de los pocillos y después las células se fijaron durante 15 minutos con formaldehído 1,8 % en PBS. Las células se lavaron después con TNT (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y Tween-20 0,05 % en H_2O), y se permeabilizaron con Triton-X 0,1 % en PBS durante 15 minutos y se lavaron de nuevo con TNT. Las células se bloquearon durante 1 hora con TNB (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y Reactivo de Bloqueo 0,5 % (Kit NEN Renaissance TSA-Direct) en H_2O) y se lavó de nuevo con TNT. Las células se incubaron durante 1 hora con proteína de fusión de receptor soluble mzB7R1/Vasp-biotina 2 µg/ml. Las células se lavaron después con TNT. Las células se fijaron una segunda vez durante 15 minutos con formaldehído 1,8 % en PBS. Después de lavar con TNT, las células se incubaron durante otra hora con estreptavidina HRP diluida 1:1000. De nuevo las células se lavaron con TNT.

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

Ejemplo 14

Actividad biológica de la proteína de fusión VASP-zB7R1

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

Ejemplo 15

Anticuerpos monoclonales de zB7R1

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

Se recogieron esplenocitos de un ratón de alta titulación y se fusionaron con células de mieloma P3-X63-Ag8/ATCC (ratón) en un protocolo de fusión mediado por PEG optimizado (Rockland Immunochemicals). Después de 9 días de cultivo postfusión, se identificaron grupos de hibridoma productores de anticuerpos específicos mediante ELISA usando 500 ng/ml de cada uno de la proteína de fusión recombinante purificada zB7R1-mFc2 como la diana de anticuerpo específica y una proteína de fusión pTACI mFc2 como una diana de anticuerpo no específica. Para

comprobar la reactividad cruzada, las muestras también se comprobaron frente a zB7R1 de ratón. Los grupos de hibridoma positivos para la diana de anticuerpo específica solamente se analizaron adicionalmente con respecto a capacidad para unirse mediante análisis de FACS con células p815/zB7R1 como diana de anticuerpo.

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

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

Ejemplo 16

Bioensayos para la detección de anticuerpos de señalización anti zB7R1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se descongelaron en hielo células de levadura competentes de la cepa SF838-9D. Se mezcló un µl de vector pZMP21Z digerido con BglII mediante métodos de digestión de restricción convencionales con 6 µl de producto de PCR purificado h.zB7r1-m.GCSFR o 6 µl de tampón TE como un control negativo. La mezcla de ADN se añadió a 45

µl de células de levadura, se mezcló y se transfirió a dos cámaras de electroporación desechables de 2 mm (VWR, West Chester, PA). Las células se sometieron a electroporación usando un Biorad Genepulser™ (Herpes, CA) ajustado a 750 V, 25 µFD, resistencia infinita. Se añadieron inmediatamente 600 µl de sorbitol 1,2 M frío a cada cámara. Se sembraron 150 µl y 300 µl de cada cámara en placas de agar-URA DS y se incubaron durante 72 horas a 30 ºC. Se suspendieron colonias de levadura de cada placa en 1 ml de H_2O y se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación y se retiró el sobrenadante. Se transfirió una cantidad equivalente a 50 µl de levadura empaquetada de cada muestra a otro tubo eppendorf de 1,5 ml y se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis de levadura (Triton X 25, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). A cada tubo se añadieron 2 µl (10 U) de zimolasa (Zymo Research, Cat n.º E1001/E1002) seguido de una incubación de 30 minutos a 37 ºC. Las células lisadas se procesaron en minipreps añadiendo 150 µs de tampón P1 (Qiagen) y después continuando con el Kit de Miniprep de Centrifugación QIAprep en la etapa 2. El ADN plasmídico purificado de este modo de levadura se introdujo por electroporación en células DH10b Electormax (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los clones se aislaron, se secuenciaron y se preformaron aislamientos de plásmidos a gran escala usando métodos convencionales.

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

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

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

Se prepararon células BaF3/KZ134 para electroporación lavando dos veces en medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) y después resuspendiendo en RPMI a una densidad celular de 10^7 células/ml. Se mezcló un ml de células BaF3 resuspendidas con 30 µg del ADN del plásmido pZPMPZ/h.zB7r1-m.GCSFr y se transfirieron a cámaras de electroporación desechables separadas (Gibco-BRL). Después se dieron a las células dos choques en serie (800 1 Fad/300 V, 1180 1 Fad/300 V) suministrados por un aparato de electroporación (CELL-PORATOR™, Gibco-BRL, Bethesda, MD). Las células electroporadas se transfirieron posteriormente a 20 ml de medio completo que contenía Puromicina 2 µg/ml (Clontech, PaloAlto, CA) y se colocaron en un incubador durante 24 horas (37 ºC, CO_2 5 %). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 20 ml de medio completo que contenía Puromicina µg/ml y selección de Zeocina 240 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un matraz T75 para aislar el grupo resistente a Zeocina. La línea celular estable resultante se denominó BaF3/KZ134/h.zB7r1-m.GCSFr.

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

Los anticuerpos ensayados en las células BaF3/KZ134/h.B7r1-m.GCSFr fueron: anticuerpos de ratón anti zB7r1 humano 318.4.1.1 (E9310), 318.28.2.1 (E9296), 318.39.1.1 (E9311), 318.59. 3.1 (E9400). Estos anticuerpos se acoplaron a Dynabeads M-450 Tosilactivadas, (Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega) de la siguiente manera: se lavaron 50 µl ($2x10^7$ perlas) por muestra una vez con 1 ml de tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4-8,0 en un tubo eppendorf de 2,0 ml. El tubo se colocó en un imán durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante. Las perlas se resuspendieron en el volumen original usando el tampón de fosfato sódico. Se combinaron 10 µg de cada anticuerpo con 50 µl de perlas lavadas en tubos eppendorf de 2,0 ml. Se incluyó un control solamente con perlas (sin anticuerpo). Los tubos se colocaron en un mezclador Clay Adams Nutator (Bectin-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a temperatura ambiente durante 48 horas. Los tubos se colocaron después en un imán durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante. Las perlas recubiertas se lavaron después 4 veces con 1 ml de PBS (sin Ca2+ y Mg2+), BSA 0,1 % (p/v) y EDTA 2 mM, pH 7,4.

Al preparar el ensayo celular, las perlas recubiertas y un control solamente con perlas se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en U Falcon (Bectin-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a concentraciones de 480.000, 240.000, 120.000, 60.000, 30.000, 15.000 y 7500 por pocillo en 100 µl. También se sembró anticuerpo no unido a concentraciones de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,6 y 0,3 µg/ml en 100 µl. Cada muestra se sembró en placas por triplicado. Como un control positivo para señalización de STAT, se incluyeron diluciones de IL3 de ratón a concentraciones de 2, 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,6 y 0,3 pg/ml en 100 µl.

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

El ensayo se incubó a 37 ºC, CO_2 5 % durante 24 horas momento en el cual las células BaF3 se sedimentaron por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, el medio se aspiró y se añadieron 25 µl de tampón de lisis (Promega). Después de dejar 10 minutos para lisis celular a temperatura ambiente, las placas se midieron con respecto a activación de la construcción indicadora de STAT leyéndolas en un luminómetro (EG&G Berthold, modelo Microlumat Plus LB 96V) que añadió 40 µl de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) y midió la luz generada en los 10 segundos después de la adición de sustrato.

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

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

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

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

Ejemplo 17

Expresión de zB7R1 en PBMNC humanas

Para cultivar las células, se separó sangre de donantes internos normales en un gradiente de ficol, y la interfaz de PBMNC se recogió y se lavó en PBS. Las células se contaron y se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a $2x10^5$ células/pocillo en 200 µl de medio de cultivo con LPS a 100 ng/ml o con mab anti CD3 + anti CD28 (50 ng/ml y 1 µg/ml respectivamente). Algunas células se reservaron para el punto temporal 0. Las células se recogieron para tinción en los tiempos 24, 48 y 72 horas.

En cada punto temporal, se centrifugaron células en placas de 96 pocillos, el medio se retiró por sacudidas y se añadió una combinación de anticuerpos conjugados con flúor para marcadores de linaje de superficie en 50 µl de tampón de tinción Facs (CD56-A488, CD19-PE, CD45RA-Cychrome, CD45RO-PE-Cy7, CD4-A405, CD8-A700 y CD14-A750). La combinación incluyó mab anti B7R1 (318.4.1) acoplado al colorante A647, o un mab de control acoplado de forma similar. En algunos experimentos, la unión de mab anti B7R1 compitió con exceso de 20 veces (g/g) de receptor mB7R1. Cada condición se tiñó en pocillos por triplicado. Las células se incubaron con un combo de tinción durante 30 minutos en hielo, después se lavaron 1,5X con tampón de Facs y se fijaron con

paraformaldehído 2 %, 100 µl/pocillo, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Las placas se centrifugaron, el paraformaldehído se retiró por sacudidas, y las células se resuspendieron en 200 µl de tampón de Facs y se almacenaron a 4 ºC cubiertas en papel metálico hasta que se leyeron en el LSRII.

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

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

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

Ejemplo 18

La proliferación de células T está inhibida por anticuerpos de zB7R1

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

Se usaron perlas tosilactivadas como una plataforma de fase sólida para presentar anti CD3 y anti zB7r1 a células T. Se recogieron PBMC humanas de voluntarios sanos mediante gradiente de densidad de Ficoll-Paque (GE Healthcare). Se purificaron CD4 y CD8 a partir de PBMC mediante columnas de perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). Las células T se marcaron con CFSE (Invitrogen) para evaluar la proliferación por citometría de flujo. Se sembraron $1x10^5$ células T marcadas con CFSE y $1x10^5$ perlas por pocillo. Los cultivos se mantuvieron durante 1 día para evaluar los marcadores de activación temprana o 3 días para evaluar la proliferación en incubadores humidificados a CO_2 5 %. La proliferación de CD4 y CD8 se midió en un LSRII (Becton Dickinson).

Anti zB7r1 inhibió células T sin tratamiento previo y de memoria CD4 de forma equivalente. Específicamente, las células T CD4 se purificaron como antes y después se clasificaron en poblaciones CD45RA alto (sin tratamiento previo) y CD45RA bajo (de memoria) mediante clasificación celular en el FACSAria (BD Biosciences). Las células se cultivaron como anteriormente, y después se evaluaron con respecto a proliferación a las 72 h. Se valoró anti CD3 en combinación con cantidad fija de zb7r1, control o anti CTLA4. Se inhibieron células de memoria y sin tratamiento previo CD4 en proliferación hasta un grado equivalente.

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

Ejemplo 19

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

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

Para iniciar GVHD, se inyectan 75 millones de células del bazo de ratones C57B1/6 por suministro intravenoso en ratones DBA2 X C57B1/6 F1 (BDF1) el día 0. Los ratones se tratan con 150 µg de proteína B7R1-VASP por vía intraperitoneal cada dos días comenzando el día antes de la transferencia celular y continuando durante toda la duración del experimento. El peso corporal se supervisa diariamente y los ratones se sacrifican el día 12 después de la transferencia del bazo. Se recogen los bazos para análisis de FACS y se recoge sangre para suero.

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

Ejemplo 20

Hipersensibilidad de tipo retardado en ratones tratados con zB7R1-Fc

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

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

Tabla 5

zB7R1 inhibe la reacción de Hipersensibilidad de Tipo Retardado (DTH) cuando se administró en el momento de exposición o en la fase de sensibilización de la respuesta

			CAMBIO EN EL GROSOR DE LA OREJA (x 10^{-3} pulg)		
EXPT N.º	**TRATAMIENTO**	**TIEMPO/VÍA DE TRATAMIENTO**	**OÍDO IZQUIERDO (PBS)**	**OÍDO DERECHO (OVA)**	**Valor de *p* frente a control**
			24 h	**24 h**	
	Plásmido de control	Sensibilización (d-1)	10,67 +/- 20,32	170,69 +/- 26,42	-
1	mCTLA-4-Fc	i.v.	12,70 +/- 16,00	180,59 +/- 68,33	0,7484
(n= 6)	mB7R1-Fc		30,23+/-13,72	112,78 +/- 21,84	0,002
	Plásmido de control	Exposición (d6)	2,03 +/- 16,76	254+/-46,74	-
	mCTLA-4-Fc	i.v.	13,97 +/- 2,03	150,88 +/-19,81	0,0006
	mB7R1-Fc		16,51 +/- 15,75	179,83 +/- 32,51	0,0099
			48 h	**48 h**	
	Plásmido de control	Sensibilización (d-1)	5,08 +/- 13,72	150,11 +/-33,02	-

(continuación)

zB7R1 inhibe la reacción de Hipersensibilidad de Tipo Retardado (DTH) cuando se administró en el momento de exposición o en la fase de sensibilización de la respuesta					
			CAMBIO EN EL GROSOR DE LA OREJA (x 10^{-3} pulg)		
EXPT N.º	**TRATAMIENTO**	**TIEMPO/VÍA DE TRATAMIENTO**	**OÍDO IZQUIERDO (PBS)**	**OÍDO DERECHO (OVA)**	**Valor de *p* frente a control**
			24 h	**24 h**	
1	mCTLA-4-Fc	i.v.	16,76 +/- 10,16	195,33 +/- 68,33	0,1758
(n= 6)	mB7R1-Fc		23,88 +/- 22,35	160,78 +/- 28,45	0,5650
	Plásmido de control	Exposición (d6)	13,97 +/- 15,75	289,05 +/- 67,82	-
	mCTLA-4-Fc	i.v.	1,27 +/- 2,03	177,04 +/- 32,00	0,0045
	mB7R1-Fc		1,27 +/-3,30	160,02 +/- 24,38	0,0014

Ejemplo 21

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

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

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

Ejemplo 22

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

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

Supervisión de la enfermedad: los animales pueden comenzar a mostrar signos de inflamación de la pata poco después de la segunda inyección de colágeno, y algunos animales pueden incluso comenzar a tener signos de inflamación de los dedos antes de la segunda inyección de colágeno. La mayoría de los animales desarrollan artritis en un periodo de 1-3 semanas desde la inyección de refuerzo, pero algunos pueden requerir un periodo de tiempo más largo. La incidencia de enfermedad en este modelo es normalmente del 95-100 % y se ven normalmente 0-2 que no responden (determinados después de 6 semanas de observación) en un estudio en que se usan 40 animales. Obsérvese que a medida que comienza la inflamación, puede producirse una aparición transitoria común de inflamación de la pata o los dedos de bajo grado variable. Por esta razón, no se considera que un animal tenga enfermedad establecida hasta que se ha desarrollado una hinchazón de la pata persistente, notable.

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

Puntuación clínica:

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZYMOGENETICS, INC.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MODULAR RESPUESTAS INMUNITARIAS

<130> P31357EP-D3-PCT

<140> EP 11171236.0
<141> 12-05-2006

<150> 60/680.374
<151> 12-05-2005

<150> 60/791.626
<151> 13-04-2006

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

<160> 69

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

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

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

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

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

<400> 1

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

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

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

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

cag gac cag ctt ctg gcc att tgt aat gct gac ttg ggg tgg cac atc   241
Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile
```

```
                65                  70                  75

tcc cca tcc ttc aag gat cga gtg gcc cca ggt ccc ggc ctg ggc ctn   289
Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu
         80                  85                  90

acc ctc cag tcg ctg acc gtg aac gat aca ggg gag tac ttc tgc atc   337
Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile
     95                 100                 105

tat cac acc tac cct gat ggg ncg tac act ggg aga atc ttc ctg gag   385
Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Xaa Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu
110                 115                 120                 125

gtc cta gaa agc tca gtg gct gag cac ggt gcc agg ttc cag att cca   433
Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
                130                 135                 140

ttg ctt gga gcc atg gcc gcg acg ctg gtg gtc atc tgc aca gca gtc   481
Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val
            145                 150                 155

atc gtg gtg gtc gcg ttg act aga aag aag aaa gcc ctc aga atc cat   529
Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His
        160                 165                 170

tct gtg gaa ggt gac ctc agg aga aaa tca gct gga cag gag gaa tgg   577
Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp
    175                 180                 185

agc ccc agt gct ccc tca ccc cca gga agc tgt gtc cag gca gaa gct   625
Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala
190                 195                 200                 205

gca cct gct ggg ctc tgt gga gag cag cgg gga gag gac tgt gcc gag   673
Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu
                210                 215                 220

ctg cat gac tac ttc aat gtc ctg agt tac aga agc ctg ggt aac tgc   721
Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys
            225                 230                 235

agc ttc ttc aca gag act ggt tag caaccagagg catcttctgg aagatacact  775
Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly  *
        240

tttgtctttg ctattataga tgaatatata agcagctgta ctctccatca gtgctgcgtg 835
tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtgtgtgtg tgttcagttg agtgaataaa tgtcatcctc 895
ttctcca                                                           902
```

<210> 2
<211> 244
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> VARIANTE
<222> (117)...(117)
<223> Xaa = Thr o Ala

<400> 2

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

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

<400> 3

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

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

<400> 4

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

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

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

<400> 5

```
aaactatttg agggtagggg ctgtgattat ttactctcat atcctcagag cctggtgttg 60
aggttggtgc tttgtaggca cccagggact ttcaaatgaa tgaagggagg gagggaggaa 120
agaaggatgg gtccatagta ggacctggtg atgggctggg agctccaggc aaatgtcaac 180
caatccctct cctgggtcag ctcccagggg ctcacccttc tttgcatttc cagctctcat 240
gaggtcattg tgcacaggaa agctctctcc tctaatctcc tctgatccta ctgcaccaga 300
gaaatcaagc cagaattcaa caaagtctca gtccagataa acaagacaaa agaaataaga 360
ttcgagtaga agatctcctt caagggaaag ttgctgtgtt tgtccaagac ctttgtccca 420
tccatgtatc atcccccaag taaacacttc ttgttcacct gttcattaga tttcaagtgc 480
agtccctggc ctgtaagtcc ctacaatgat aagtttctct tatcattgca cattcttcat 540
caggaggatg ccagaggagc tcagccaaca gttcctcatc agtagcagat tcttcagaat 600
cttgggcact acacagatgc ccttgagctc tttgaataaa ggctgatttt tagaaaaaac 660
attaagacag aacttaaaaa caatagattg actataatcc aaagacgagt gtacctctaa 720
ccacaatttt catttatttt taaatgtttc cttc atg gcc ttt ctt gtg gct cac 775
                                      Met Ala Phe Leu Val Ala His
                                       1               5

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

gtt ttt gcc aaa ctt ggt ttt tcc gag acc gtc ttt tct cag agg ctc   871
Val Phe Ala Lys Leu Gly Phe Ser Glu Thr Val Phe Ser Gln Arg Leu
     25                  30                  35

agt ttt acc gtc cta tct gca gtc ggc tac ttt cag tgg cag aag agg   919
Ser Phe Thr Val Leu Ser Ala Val Gly Tyr Phe Gln Trp Gln Lys Arg
 40                  45                  50                  55

cca cat ctg ctt cct gta ggc cct ctg ggc aga agc atg cgc tgg tgt   967
Pro His Leu Leu Pro Val Gly Pro Leu Gly Arg Ser Met Arg Trp Cys
                 60                  65                  70
```

```
ctc ctc ctg atc tgg gcc cag ggg ctg agg cag gct ccc ctc gcc tca   1015
Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala Pro Leu Ala Ser
             75                  80                  85

gga atg atg aca ggc aca ata gaa aca acg ggg aac att tct gca gag   1063
Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu
         90                  95                 100

aaa ggt ggc tct atc atc tta caa tgt cac ctc tcc tcc acc acg gca   1111
Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala
    105                 110                 115

caa gtg acc cag gtc aac tgg gag cag cag gac cag ctt ctg gcc att   1159
Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile
120                 125                 130                 135

tgt aat gct gac ttg ggg tgg cac atc tcc cca tcc ttc aag gat cga   1207
Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg
                140                 145                 150

gtg gcc cca ggt ccc ggc ctg ggc ctc acc ctc cag tcg ctg acc gtg   1255
Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val
            155                 160                 165

aac gat aca ggg gag tac ttc tgc atc tat cac acc tac cct gat ggg   1303
Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly
        170                 175                 180

acg tac act ggg aga atc ttc ctg gag gtc cta gaa agc tca gtg gct   1351
Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala
    185                 190                 195

gag cac ggt gcc agg ttc cag att cca ttg ctt gga gcc atg gcc gcg   1399
Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala
200                 205                 210                 215

acg ctg gtg gtc atc tgc aca gca gtc atc gtg gtg gtc gcg ttg act   1447
Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr
                220                 225                 230

aga aag aag aaa gcc ctc aga atc cat tct gtg gaa ggt gac ctc agg   1495
Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg
            235                 240                 245

aga aaa tca gct gga cag gag gaa tgg agc ccc agt gct ccc tca ccc   1543
Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro
        250                 255                 260

cca gga agc tgt gtc cag gca gaa gct gca cct gct ggg ctc tgt gga   1591
Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly
    265                 270                 275

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

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

tag caaccagagg catcttctgg a                                      1711
 *
```

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

<400> 6

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

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

<400> 7

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

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

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

<400> 8

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

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

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

tcc tct gac aca gct gaa gtg acc caa gtc gac tgg aag cag cag gac   192
Ser Ser Asp Thr Ala Glu Val Thr Gln Val Asp Trp Lys Gln Gln Asp
    50                  55                  60

cag ctt ctg gcc att tat agt gtt gac ctg ggg tgg cat gtc gct tca   240
Gln Leu Leu Ala Ile Tyr Ser Val Asp Leu Gly Trp His Val Ala Ser
65                  70                  75                  80

gtc ttc agt gat cgg gtg gtc cca ggc ccc agc cta ggc ctc acc ttc   288
Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro Ser Leu Gly Leu Thr Phe
                85                  90                  95

cag tct ctg aca atg aat gac acg gga gag tac ttc tgt acc tat cat   336
Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His
            100                 105                 110

acg tat cct ggt ggg att tac aag ggg aga ata ttc ctg aag gtc caa   384
Thr Tyr Pro Gly Gly Ile Tyr Lys Gly Arg Ile Phe Leu Lys Val Gln
        115                 120                 125
gaa agc tca gtg gct cag ttc cag act gcc ccg ctt gga gga acc atg   432
Glu Ser Ser Val Ala Gln Phe Gln Thr Ala Pro Leu Gly Gly Thr Met
    130                 135                 140

gct gct gtg ctg gga ctc att tgc tta atg gtc aca gga gtg act gta   480
Ala Ala Val Leu Gly Leu Ile Cys Leu Met Val Thr Gly Val Thr Val
145                 150                 155                 160

ctg gct aga aag aag tct att aga atg cat tct ata gaa agt ggc ctt   528
Leu Ala Arg Lys Lys Ser Ile Arg Met His Ser Ile Glu Ser Gly Leu
                165                 170                 175

ggg aga aca gaa gcg gag cca cag gaa tgg aac ctg agg agt ctc tca   576
Gly Arg Thr Glu Ala Glu Pro Gln Glu Trp Asn Leu Arg Ser Leu Ser
            180                 185                 190

tcc cct gga agc cct gtc cag aca caa act gcc cct gct ggt ccc tgt   624
Ser Pro Gly Ser Pro Val Gln Thr Gln Thr Ala Pro Ala Gly Pro Cys
        195                 200                 205

gga gag cag gca gaa gat gac tat gct gac cca cag gaa tac ttt aat   672
Gly Glu Gln Ala Glu Asp Asp Tyr Ala Asp Pro Gln Glu Tyr Phe Asn
    210                 215                 220

gtc ctg agc tac aga agc cta gag agc ttc att gct gta tcg aag act   720
Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Ser Phe Ile Ala Val Ser Lys Thr
225                 230                 235                 240

ggc taa                                                          726
Gly  *
```

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

<400> 9

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

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

<400> 10

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

<210> 11
<211> 140
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

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

<400> 12

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

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

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

<400> 13

```
ggctccggtg gctccgacct acagagggtg aaacaggagc ttctggaaga ggtgaagaag 60
gaattgcaga aagtgaaaga ggaaatcatt gaagccttcg tccaggagct gaggggttcc 120
ggtggccatc accatcacca tcactga                                     147
```

<210> 14
<211> 48
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 14

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

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

<220>
<223> Enlazador

<400> 15

```
Gly Ser Gly Gly
 1
```

<210> 16

<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 16

His His His His His His
1 5

<210> 17
<211> 3200
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<223> CD155 humano

<400> 17

```
cttgaagaag tgggtattcc ccttcccacc ccaggcactg gaggagcggc cccccgggga 60
ttccaggacc tgagctccgg gagctggact cgcagcgacc gcggcagagc gagctggcgc 120
cgggaagcga ggagacgccc gcgggaggcc cagctgctcg gagcaactgg catggcccga 180
gcc atg gcc gcc gcg tgg ccg ctg ctg ctg gtg gcg cta ctg gtg ctg   228
    Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu
     1               5                  10                  15

tcc tgg cca ccc cca gga acc ggg gac gtc gtc gtg cag gcg ccc acc   276
Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr
                 20                  25                  30

cag gtg ccc ggc ttc ttg ggc gac tcc gtg acg ctg ccc tgc tac cta   324
Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu
             35                  40                  45

cag gtg ccc aac atg gag gtg acg cat gtg tca cag ctg act tgg gcg   372
Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala
         50                  55                  60

cgg cat ggt gaa tct ggc agc atg gcc gtc ttc cac caa acg cag ggc   420
Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly
     65                  70                  75

ccc agc tat tcg gag tcc aaa cgg ctg gaa ttc gtg gca gcc aga ctg   468
Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu
 80                  85                  90                  95

ggc gcg gag ctg cgg aat gcc tcg ctg agg atg ttc ggg ttg cgc gta   516
Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val
                100                 105                 110

gag gat gaa ggc aac tac acc tgc ctg ttc gtc acg ttc ccg cag ggc   564
```

```
Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly
            115                 120                 125

agc agg agc gtg gat atc tgg ctc cga gtg ctt gcc aag ccc cag aac   612
Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn
        130                 135                 140

aca gct gag gtt cag aag gtc cag ctc act gga gag cca gtg ccc atg   660
Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met
    145                 150                 155

gcc cgc tgc gtc tcc aca ggg ggt cgc ccg cca gcc caa atc acc tgg   708
Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp
160                 165                 170                 175

cac tca gac ctg ggc ggg atg ccc aat acg agc cag gtg cca ggg ttc   756
His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe
                180                 185                 190

ctg tct ggc aca gtc act gtc acc agc ctc tgg ata ttg gtg ccc tca   804
Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser
            195                 200                 205

agc cag gtg gac ggc aag aat gtg acc tgc aag gtg gag cac gag agc   852
Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser
        210                 215                 220

ttt gag aag cct cag ctg ctg act gtg aac ctc acc gtg tac tac ccc   900
Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro
    225                 230                 235

cca gag gta tcc atc tct ggc tat gat aac aac tgg tac ctt ggc cag   948
Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln
240                 245                 250                 255

aat gag gcc acc ctg acc tgc gat gct cgc agc aac cca gag ccc aca   996
Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr
                260                 265                 270

ggc tat aat tgg agc acg acc atg ggt ccc ctg cca ccc ttt gct gtg   1044
Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val
            275                 280                 285

gcc cag ggc gcc cag ctc ctg atc cgt cct gtg gac aaa cca atc aac   1092
Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn
        290                 295                 300

aca act tta atc tgc aac gtc acc aat gcc cta gga gct cgc cag gca   1140
Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala
    305                 310                 315

gaa ctg acc gtc cag gtc aaa gag gga cct ccc agt gag cac tca ggc   1188
Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly
320                 325                 330                 335

atg tcc cgt aac gcc atc atc ttc ctg gtt ctg gga atc ctg gtt ttt   1236
Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Val Phe
                340                 345                 350

ctg atc ctg ctg ggg atc ggg att tat ttc tat tgg tcc aaa tgt tcc   1284
Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser Lys Cys Ser
            355                 360                 365
```

```
cgt gag gtc ctt tgg cac tgt cat ctg tgt ccc tcg agt aca gag cat   1332
Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser Thr Glu His
        370                 375                 380

gcc agc gcc tca gct aat ggg cat gtc tcc tat tca gct gtg agc aga   1380
Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg
    385                 390                 395

gag aac agc tct tcc cag gat cca cag aca gag ggc aca agg tga       1425
Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg  *
400                 405                 410

cagcgtcggg actgagaggg gagagagact ggagctggca aggacgtggg cctccagagt 1485
tggacccgac cccaatggat gaagaccccc tccaaagaga ccagcctccc tccctgtgcc 1545
agacctcaaa acgacggggg caggtgcaag ttcataggtc tccaagacca ccctcctttc 1605
atttgctaga aggactcact agactcagga aagctgttag gctcacagtt acagtttatt 1665
acagtaaaag gacagagatt aagatcagca aagggaggag gtgcacagca cacgttccac 1725
gacagatgag gcgacggctt ccatctgccc tctcccagtg gagccatata ggcagcacct 1785
gattctcaca gcaacatgtg acaacatgca agaagtactg ccaatactgc caaccagagc 1845
agctcactcg agatctttgt gtccagagtt ttttgtttgt cttgagacag ggtctggctc 1905
tgttggcaga ctagagtaca gtggtgagat cacagttcat tgcagccttg acttctcaac 1965
gccaagtcat cctcccacct cagcctcctg agtagctatg actacaggta tgtgccacca 2025
cgtctggcta atctttttat tatttgtaaa gtcgaggttt ccctgtgttg cccaggctgg 2085
tcttgaactc ttggctccaa gtgatacttc tgccttggcc tcccaaagtg ctgaattaag 2145
cagctcacca tccacacggc tgacctcata catcaagcca ataccgtgtg gcccaagacc 2205
cccaccataa atcacatcat tagcatgaac cacccagagt ggcccaagac tcccagatca 2265
gctaccaggc aggatattcc aagggcttag agatgaatgc ccaggagctg aggataaagg 2325
gcccgatctt tctttgggca aggttaagcc tttactgcat agcagaccac acagaagggt 2385
gtgggccacc agagaatttt ggtaaaaatt tggcctctgg ccttgagctt ctaaatctct 2445
gtatccgtca gatctctgtg gttacaagaa acagccactg accctggtca ccagaggctg 2505
caattcaggc cgcaagcagc tgcctagggg gtgtccaagg agcagagaaa actactagat 2565
gtgaacttga agaaggttgt cagctgcagc cactttctgc cagcatctgc agccactttc 2625
tgccagcatc tgcagccagc aagctgggac tggcaggaaa taacccacaa aagaagcaaa 2685
tgcaatttcc aacacaaggg ggaagggatg caggggggagg cagcgctgca gttgctcagg 2745
acacgctcct ataggaccaa gatggatgcg acccaagacc caggaggccc agctgctcag 2805
tgcaactgac aagttaaaaa ggtctatgat cttgagggca gacagcagaa ttcctcttat 2865
aaagaaaact gtttgggaaa atacgttgag ggagagaaga ccttgggcca agatgctaaa 2925
tgggaatgca aagcttgagc tgctctgcaa gagaaaataa gcaggacaga ggatttgctc 2985
tggacagaga tggaagagcc gggaacagag aagtgtgggg aagagatagg aaccagcagg 3045
atggcagggg caaagggctc aagggtgagg aggccagtgg gaccccacag agttggggag 3105
ataaaggaac attggttgct ttggtggcac gtaagctcct tgtctgtctc cagcacccag 3165
aatctcatta aagcttattt attgtacctc caaaa                           3200
```

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

<220>
<223> CD155 humano

<400> 18

```
Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser
 1               5                  10                  15
Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln
            20                  25                  30
Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln
        35                  40                  45
Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg
    50                  55                  60
His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro
65                  70                  75                  80
Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly
                85                  90                  95
Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu
            100                 105                 110
Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser
        115                 120                 125
Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr
    130                 135                 140
Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala
145                 150                 155                 160
Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His
                165                 170                 175
Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu
            180                 185                 190
Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser
        195                 200                 205
Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe
    210                 215                 220
Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro
225                 230                 235                 240
Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn
                245                 250                 255
Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly
            260                 265                 270
Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala
        275                 280                 285
Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr
    290                 295                 300
Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu
305                 310                 315                 320
Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met
                325                 330                 335
Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Val Phe Leu
            340                 345                 350
Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser Lys Cys Ser Arg
        355                 360                 365
Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser Thr Glu His Ala
    370                 375                 380
Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg Glu
385                 390                 395                 400
Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg
                405                 410
```

<210> 19
<211> 316
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD155 humano

<400> 19

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

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

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

<400> 20

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

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

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

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

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

cac ccc aag aag ggg ccc aac atc aaa gag cca gag agg gtg aaa ttc   349
```

```
His Pro Lys Lys Gly Pro Asn Ile Lys Glu Pro Glu Arg Val Lys Phe
                 85                  90                  95

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

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

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

cct aag aac act gca gag gcc ctg gag ccc tct ccc acc ttg ata ctg   541
Pro Lys Asn Thr Ala Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Thr Leu Ile Leu
145                 150                 155                 160

cag gat gtg gct aaa tgc atc tct gcc aat ggt cac cct cct gga cga   589
Gln Asp Val Ala Lys Cys Ile Ser Ala Asn Gly His Pro Pro Gly Arg
                165                 170                 175

atc tct tgg ccc tcg aat gtg aat gga agt cac cgt gaa atg aag gaa   637
Ile Ser Trp Pro Ser Asn Val Asn Gly Ser His Arg Glu Met Lys Glu
            180                 185                 190

cca ggg tcc cag ccg ggc acc acc aca gtt acc agc tac ctc tcc atg   685
Pro Gly Ser Gln Pro Gly Thr Thr Thr Val Thr Ser Tyr Leu Ser Met
        195                 200                 205

gta cct tct cgc cag gca gac ggc aag aac atc acc tgc acg gtg gag   733
Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr Cys Thr Val Glu
    210                 215                 220

cat gaa agc tta cag gag ctg gac cag ctg ctg gtg acc ctt tcc caa   781
His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val Thr Leu Ser Gln
225                 230                 235                 240

ccc tat cca cct gaa aac gtg tcc atc tct ggc tat gac ggc aac tgg   829
Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Gly Asn Trp
                245                 250                 255

tat gtt ggc ctc act aac ttg acc ctg acc tgt gaa gct cac agc aaa   877
Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala His Ser Lys
            260                 265                 270

cca gcg cct gac atg gct gga tat aac tgg agc acg aac acg ggt gac   925
Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Asn Thr Gly Asp
        275                 280                 285

ttt ccc aac tct gtt aag cgc cag ggc aat atg ctt cta atc tcc acc   973
Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu Leu Ile Ser Thr
    290                 295                 300

gta gag gat ggt ctc aat aac acg gtc att gtg tgc gaa gtc acc aat   1021
Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys Glu Val Thr Asn
305                 310                 315                 320

gcc cta ggg tct ggg cag ggc caa gtg cac atc att gtt aaa gag aaa   1069
Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile Val Lys Glu Lys
                325                 330                 335
```

```
cct gag aat atg cag caa aat aca aga tta cac cta ggc tac atc ttt   1117
Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His Leu Gly Tyr Ile Phe
            340                 345                 350

ctt atc gtc ttt gtc ctc gct gta gtc atc atc atc gca gca cta tac   1165
Leu Ile Val Phe Val Leu Ala Val Val Ile Ile Ile Ala Ala Leu Tyr
        355                 360                 365

act ata cga aga tgc agg cat ggt cgt gct ctg cag tcc aat ccc tca   1213
Thr Ile Arg Arg Cys Arg His Gly Arg Ala Leu Gln Ser Asn Pro Ser
    370                 375                 380

gag agg gag aac gtc cag tat tca tct gtg aac ggc gac tgt aga ctg   1261
Glu Arg Glu Asn Val Gln Tyr Ser Ser Val Asn Gly Asp Cys Arg Leu
385                 390                 395                 400

aac atg gag cca aac agc aca agg tga cggtgctggg tagacagaac         1308
Asn Met Glu Pro Asn Ser Thr Arg  *
                405

taaggaactt gaaggcatag caactggaac cctactctca taaatgaaga agcctccaga 1368
gagactggct gctcagtgtg atgagcatag caagtttggg gggtctccca ggatgctgcc 1428
gaattccacg ttgtcaaaag gacccatgga ggccagtgtg ttggctcact cttgacatct 1488
cagcaagctg gggggggggg ggggagcata aagcgaggtt gagtctagct tgggctatag 1548
agcaaagccc tgtccataca caaacaagct aaggggcttt gagacggtca gaaactgaag 1608
tcttgctttg ggtaaggtaa atcctctacc gcatgtatgt gctagacttg aaagacttcc 1668
acacagacct ctttataagt tgactccatt ggggctatcc cctcctctct ggacaaggtc 1728
tctgtatgta gccaaggcta ggctcaaact cacagagata tgtctgcttc tacctcccca 1788
gtgctagagt tgaaagtatt tgtgccactg cacttttcta ggtcttcttt taatgaagta 1848
aagtatatat ttataaaaag ctatttagtt atatatatat atatttttga gactatttca 1908
tagagcccaa gctaacctca aacttactat gtagccaaga gtgatggtaa actaatttat 1968
tttaatttat ttgtcttcaa ttttaaccat cacccaaccc ctgctccctt ccatatcttc 2028
tttcaatcca tttcattgtc tttttcttcc cagacactat tctgacttac gtctccatta 2088
caaacatttt attgaactac ataaaaatgt gtgaaccaca aaaaaaaaat gtatttgtca 2148
aaattgtagt tgtctttctg aggctgacct gagttctctg ataccattct ctccagttgt 2208
atccagtttc ctgtaaacaa tgtgactttg tttttctcag tagctaaaac atcccaatta 2268
tgtgagtgta cactttcttt actcattcct ctgtgggcca ccagctgggt tggttccata 2328
tctgagctat tgtgcatgga attgtctctg tggtgggttt agtaaactcc caggaatgcc 2388
tgtacatgtt tgtagaggcc agaagaaggc acaaaatctt gagccaggct tacatgcact 2448
tgtgagtagc cccacatagg tgctaagaac ccagttcagg tcctctgctg tgggatggtg 2508
ggctgtgcac agaaagcctg gtcccggtct agcaaaggtc tggaactccg gagccggtgg 2568
gctgtgattt acaccagcat gggatggaag gagttggacc tcgcctcctg ggcacctggc 2628
tcctgtcaca tagctacagc ctcccacagc ccccctatag ggaggtatgc agcatcaatc 2688
acatagtagc tgcactaagc cctcccacat gcaaataagg tttccccaaa ctctcagtcc 2748
aagccaatga aaagtacctg ctgtcaaacc ctaaatcatc cccaaaactc tgtaagtcct 2808
atcagggaat aaaatgtgtg tgaaaactaa                                  2838
```

<210> 21
<211> 408
<212> PRT
<213> Murina

<400> 21

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

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

<400> 22

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

<210> 23
<211> 48
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 23

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

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

<400> 24

cccttcctg tggggttcat tggggcatcc cctttctgct gcaggaacct ctcatcagac 60
cgcctgaggg aagcggcgcc cggagacccg ccccggcccg gtccacattc tccccaggaa 120
gccggactct atggggcggg accctggggg agcctgagcc gagcccggag ccagccccga 180
acccctgaac ctccagccag gggcgccccg ggagcagcca gcccgtgggc gagccgcccg 240
cccgccgagc agccatgagc gagacggtca tctgttccag ccgggccact gtgatgcttt 300
atgatgatgg caacaagcga tggctccctg ctggcacggg tccccaggcc ttcagccgcg 360
tccagatcta ccacaacccc acggccaatt cctttcgcgt cgtgggccgg aagatgcagc 420
ccgaccagca ggtggtcatc aactgtgcca tcgtccgggg tgtcaagtat aaccaggcca 480
cccccaactt ccatcagtgg cgcgacgctc gccaggtctg gggcctcaac ttcggcagca 540
aggaggatgc ggcccagttt gccgccggca tggccagtgc cctagaggcg ttggaaggag 600
gtgggccccc tccacccccа gcacttccca cctggtcggt cccgaacggc ccctccccgg 660
aggaggtgga gcagcagaaa aggcagcagc ccggcccgtc ggagcacata gagcgccggg 720
tctccaatgc aggaggccca cctgctcccc ccgctggggg tccaccccca ccaccaggac 780
ctccccctcc tccaggtccc cccccacccc caggtttgcc cccttcgggg gtcccagctg 840
cagcgcacgg agcaggggga ggaccacccc ctgcaccccc tctcccggca gcacagggcc 900
ctggtggtgg gggagctggg gccccaggcc tggccgcagc tattgctgga gccaaactca 960
ggaaagtcag caagcaggag gaggcctcag gggggcccac agcccccaaa gctgagagtg 1020
gtcgaagcgg aggtggggga ctcatggaag agatgaacgc catgctggcc cggagaagga 1080
aagccacgca agttggggag aaaaccccca aggatgaatc tgccaatcag gaggagccag 1140
aggccagagt cccggcccag agtgaatctg tgcggagacc ctgggagaag aacagcacaa 1200
ccttgccaag gatgaagtcg tcttcttcgg tgaccacttc cgagacccaa ccctgcacgc 1260
ccagctccag tgattactcg gacctacaga gggtgaaaca ggagcttctg gaagaggtga 1320
agaaggaatt gcagaaagtg aaagaggaaa tcattgaagc cttcgtccag gagctgagga 1380
agcggggttc tccctgacca cagggaccca gaagacccgc ttctcctttc cgcacacccg 1440
gcctgtcacc ctgctttccc tgcctctact tgacttggaa ttggctgaag acacaggaat 1500
gcatcgttcc cactccccat cccacttgga aaactccaag ggggtgtggc ttccctgctc 1560
acacccacac tggctgctga ttggctgggg aggcccccgc ccttttctcc ctttggtcct 1620
tcccctctgc catccccttg gggccggtcc ctctgctggg gatgcaccaa tgaaccccac 1680
aggaaggggg aaggaaggag ggaatttcac attcccttgt tctagattca ctttaacgct 1740
taatgccttc aaagttttgg ttttttaag aaaaaaaaat atatatatat ttgggttttg 1800
ggggaaaagg gaaatttttt tttctctttg gttttgataa aatgggatgt gggagttttt 1860
aaatgctata gccctgggct tgccccattt ggggcagcta tttaagggga ggggatgtct 1920
caccgggctg ggggtgagat atccccccac cccagggact ccccttccct ctggctcctt 1980
ccccttttct atgaggaaat aagatgctgt aacttttgg aacctcagtt ttttgatttt 2040
ttatttgggt aggttttggg gtccaggcca ttttttttac cccttggagg aaataagatg 2100
agggagaaag gagaagggga ggaaacttct cccctcccac cttcaccttt agcttcttga 2160
aaatgggccc ctgcagaata aatctgccag tttttataaa aaaaaaa 2207

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

<400> 25

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

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

<220>
<223> Enlazador

<400> 26

```
Gly Ser Gly Gly
 1
```

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

<220>
<223> Marcador

<400> 27

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

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

<220>
<223> Marcador

<400> 28

His His His His His His
1 5

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

<400> 29

atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tggggtggca tgtcgcttca 240
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgccccgctt 420
ggaggaacca tggctgctgt gctgggactc atttgcttaa tggtcacagg agtgactgta 480
ctggctagaa agaagtctat tagaatgcat tctatagaaa gtggccttgg gagaacagaa 540
gcggagccac aggaatggaa cctgaggagt ctctcatccc ctggaagccc tgtccagaca 600
caaactgccc ctgctggtcc ctgtggagag caggcagaag atgactatgc tgacccacag 660
gaatacttta atgtcctgag ctacagaagc ctagagagct tcattgctgt atcgaagact 720
ggctaa 726

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

<220>
<223> Cebador

<400> 30
tccacaggtg tccagggaat tcaccatgca tggctggctg ctc 43

<210> 31
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 31
aggcgcgcct ctagattagc cagtcttcga tacagc 36

<210> 32
<211> 414
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 32
atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tggggtggca tgtcgcttca 240
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgcc 414

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

<220>
<223> Cebador

<400> 33
tccacaggtg tccagggaat tcaccatgca tggctggctg ctc 43

<210> 34
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 34
agggcttgat tgtgggagat ctgggctcgg cagtctggaa ctgagc 46

<210> 35
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 35
ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca gggaattcgc aagatgagga tatttgctgt 60
c 61

<210> 36
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 36
gcatggagga cagggcttga ttgtgggaga tctgggctct tcatttggag gatgtgc 57

<210> 37
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 37
gcatgaattc gcaagatgcg ctggtgtctc ctc 33

<210> 38
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 38
atgcagatct gggctcaatc tggaacctgg cacc 34

<210> 39
<211> 414
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 39

atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc ttcctcgct 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tggggtggca tgtcgcttca 240
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgcc 414

<210> 40
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 40
ccacaggtgt ccagggaatt cgcaagatgc atggctggct gctc 44

<210> 41
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 41
ctccaccaga tcccttgcgg gcagtctgga actgagc 37

<210> 42
<211> 420
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 42

atgcgctggt gtctcctcct gatctgggcc caggggctga ggcaggctcc cctcgcctca 60
ggaatgatga caggcacaat agaaacaacg gggaacattt ctgcagagaa aggtggctct 120
atcatcttac aatgtcacct ctcctccacc acggcacaag tgacccaggt caactgggag 180
cagcaggacc agcttctggc catttgtaat gctgacttgg ggtggcacat ctccccatcc 240
ttcaaggatc gagtggcccc aggtcccggc ctgggcctca ccctccagtc gctgaccgtg 300
aacgatacag gggagtactt ctgcatctat cacacctacc ctgatgggac gtacactggg 360
agaatcttcc tggaggtcct agaaagctca gtggctgagc acggtgccag gttccagatt 420

<210> 43
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador

<400> 43
ggtctgaacg acatcttcga agctcagaaa atcgaatggc acgaa 45

<210> 44
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador

<400> 44
catcaccatc accatcac 18

<210> 45
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 45
cacaggtgtc cagggaattc gcaagatgcg ctggtgtctc ctc 43

<210> 46
<211> 123
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 46

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

<210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 47
ggagtgactg tactggctag aaagaag 27

<210> 48
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 48
gagactcctc aggttccatt cct 23

<210> 49
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 49
agctcagtgg ctgagcacgg tgc 23

<210> 50
<211> 103
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 50

acgcttccgt agatctggtt ccggaggctc cggtggctcc gacctacaga gggtgaaaca 60
ggagcttctg gaagaggtga agaaggaatt gcagaagtga aag 103

<210> 51
<211> 103
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 51

aaggcgcgcc tctagatcag tgatggtgat ggtgatggcc accggaaccc ctcagctcct 60
ggacgaaggc ttcaatgatt tcctctttca ctttctgcaa ttc 103

<210> 52

<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 52
ctcagccagg aaatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gatctgg 47

<210> 53
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 53
ggggtggggt acaaccccag agctgtttta aggcgcgcct ctagatc 47

<210> 54
<211> 290
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Dominio de tetramerización VASP

<400> 54

Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Met	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Leu
1				5				10					15		

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

<210> 55
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 55

```
caggtgtcca gggaattcat ataggccggc caccatgcgc tggtgtctcc tcctgatctg 60
ggcc                                                               64
```

<210> 56
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 56

```
agtctgatgg tgggggcgaa cctggcaccg tgc                               33
```

<210> 57
<211> 33

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 57
gcacggtgcc aggttcgccc ccaccatcag act 33

<210> 58
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 58

aaccccagag ctgttttaag gcgcgcctct agactagaaa ccccttgtt cttcaactcc 60
atg 63

<210> 59
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 59

caggtgtcca gggaattcat ataggccggc caccatgcgc tggtgtctcc tcctgatctg 60
ggcc 64

<210> 60
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 60

aaccccagag ctgttttaag gcgcgcctct agactagaaa ccccttgtt cttcaactcc 60
atg 63

<210> 61
<211> 1133
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> zB7R1mFc2 humano

<400> 61

gaattcgcaa gatgcgctgg tgtctcctcc tgatctgggc ccaggggctg aggcaggctc 60
ccctcgcctc aggaatgatg acaggcacaa tagaaacaac ggggaacatt tctgcagaga 120
aaggtggctc tatcatctta caatgtcacc tctcctccac cacggcacaa gtgacccagg 180
tcaactggga gcagcaggac cagcttctgg ccatttgtaa tgctgacttg gggtggcaca 240
tctccccatc cttcaaggat cgagtggccc caggtcccgg cctgggcctc accctccagt 300
cgctgaccgt gaacgataca ggggagtact tctgcatcta tcacacctac cctgatggga 360
cgtacactgg gagaatcttc ctggaggtcc tagaaagctc agtggctgag cacggtgcca 420
ggttccagat tgagcccaga tctcccacaa tcaagccctg tcctccatgc aaatgcccag 480
cacctaacct cgagggtgga ccatccgtct tcatcttccc tccaaagatc aaggatgtac 540

tcatgatctc cctgagcccc atagtcacat gtgtggtggt ggatgtgagc gaggatgacc 600
cagatgtcca gatcagctgg tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa 660
cccatagaga ggattacaac agtactctcc gggtggtcag tgccctcccc atccagcacc 720
aggactggat gagtggcaaa gctttcgcat gcgcggtcaa caacaaagac ctcccagcgc 780
ccatcgagag aaccatctca aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct 840
tgcctccacc agaagaagag atgactaaga aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag 900
acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact 960
acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga 1020
gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg 1080
gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct tctcccggac tccgggtaaa taa 1133

<210> 62
<211> 605
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hzB7RlVASPpZMP21

<400> 62

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

<210> 63
<211> 1116
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> zB7RlmFc2 murino

<400> 63

atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tggggtggca tgtcgcttca 240
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgccgagccc 420
agatctccca caatcaagcc ctgtcctcca tgcaaatgcc cagcacctaa cctcgagggt 480
ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc 540
cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc 600
tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca gctcagacac aaacccatag agaggattac 660
aacagtactc tccgggtggt cagtgccctc cccatccagc accaggactg gatgagtggc 720
aaagctttcg catgcgcggt caacaacaaa gacctcccag cgcccatcga gagaaccatc 780
tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca caggtatatg tcttgcctcc accagaagaa 840
gagatgacta agaaacaggt cactctgacc tgcatggtca cagacttcat gcctgaagac 900
atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa acagagctaa actacaagaa cactgaacca 960
gtcctggact ctgatggttc ttacttcatg tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac 1020
tgggtggaaa gaaatagcta ctcctgttca gtggtccacg agggtctgca caatcaccac 1080
acgactaaga gcttctcccg gactccgggt aaataa 1116

<210> 64
<211> 582
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> zB7RlVASPpZMP21 murino

<400> 64

atgcatggct ggctgctcct ggtctgggtc caggggctga tacaggctgc cttcctcgct 60
acaggagcca cagcaggcac gatagataca aagaggaaca tctctgcaga ggaaggtggc 120
tctgtcatct tacagtgtca cttctcctct gacacagctg aagtgaccca agtcgactgg 180
aagcagcagg accagcttct ggccatttat agtgttgacc tggggtggca tgtcgcttca 240
gtcttcagtg atcgggtggt cccaggcccc agcctaggcc tcaccttcca gtctctgaca 300
atgaatgaca cgggagagta cttctgtacc tatcatacgt atcctggtgg gatttacaag 360
gggagaatat tcctgaaggt ccaagaaagc tcagtggctc agttccagac tgccgagccc 420
agatctggtt ccggaggctc cggtggctcc gacctacaga gggtgaaaca ggagcttctg 480
gaagaggtga agaaggaatt gcagaaagtg aaagaggaaa tcattgaagc cttcgtccag 540
gagctgaggg gttccggtgg ccatcaccat caccatcact ga 582

<210> 65
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 65
ggagtgactg tactggctag aaagaag 27

<210> 66
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 66
gagactcctc aggttccatt cct 23

<210> 67
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 67
ccttgggaga acagaagcgg agcc **24**

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

<400> 68

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

```
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
    50                  55                  60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65                  70                  75                  80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
                85                  90                  95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
            100                 105                 110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
        115                 120                 125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
    130                 135                 140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145                 150                 155                 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
                165                 170                 175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
            180                 185                 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
        195                 200                 205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Glu Pro Arg
225                 230                 235                 240
Ser Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
                245                 250                 255
Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
            260                 265                 270
Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285
Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
    290                 295                 300
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
305                 310                 315                 320
Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
                325                 330                 335
Met Ser Gly Lys Ala Phe Ala Cys Ala Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
            340                 345                 350
Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
        355                 360                 365
Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
    370                 375                 380
Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
385                 390                 395                 400
Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
                405                 410                 415
Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
            420                 425                 430
Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
        435                 440                 445
Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
    450                 455                 460
Ser Arg Thr Pro Gly Lys
465                 470
```

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

<400> 69

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

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la unión de zB7R1 con CD155 para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde el cáncer se **caracteriza por** la presencia de células tumorales que expresan CD155; en donde zB7R1 es el polipéptido de SEQ ID NO: 2, y en donde el inhibidor es un anticuerpo que se une específicamente a los restos de aminoácidos 16-140 de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo.

2. Un inhibidor de la unión de zB7R1 con CD155 para su uso según la reivindicación 1, en donde el método de tratamiento de cáncer comprende además un protocolo de inmunoterapia, quimioterapia y/o radioterapia contra el cáncer.