



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 373**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/74** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07762432 .8**  
96 Fecha de presentación : **23.01.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1984736**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54 Título: **Ensayos de competición de receptores CD86 y CD80.**

30 Prioridad: **24.01.2006 US 761624 P**  
**20.07.2006 US 832012 P**  
**22.01.2007 US 656206**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.06.2011**

73 Titular/es: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**  
**Route 206 And Province Line Road**  
**Princeton, New Jersey 08543-4000, US**

72 Inventor/es: **Townsend, Robert M.;**  
**Leon, Francisco y**  
**Fleener, Catherine A.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 373 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Ensayos de competición de receptores CD86 y CD80

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos para monitorizar compuestos usados para tratar enfermedades del sistema inmune tales como rechazo de injerto tras trasplante de órganos. Específicamente, la presente invención se refiere a un ensayo basado en competición de receptor CD86 basado en citometría de flujo para medir la eficiencia de unión de L104EA29Ylg a receptores CD86 comparando la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD86 no competitivos a receptores de CD86 (expresión de CD86 total) y la unión de anticuerpos anti-CD86 competitivos a receptores de CD86 no unidos por L104EA29Ylg.

**Antecedentes de la invención**

10 La propiedad característica de un sistema inmune de vertebrados es la capacidad para discriminar "lo propio" de "lo no propio" (extraño). Esta propiedad ha conducido a la evolución de un sistema que requiere múltiples señales para lograr activación inmune óptima (Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54: 1-14 (1989)). Las interacciones células T-células B son esenciales para la respuesta inmune. Los niveles de muchas moléculas cohesivas encontradas en linfocitos T y linfocitos B se incrementan durante una respuesta inmune (Springer y col., A. Rev. Immunol. 5: 223-252 (1987); Shaw y Shimuzu, Current Opinion in Immunology, Eds. Kindt y Long, 1: 92-97 (1988)); y Hemler Immunology Today 9: 109-113 (1988)). Los niveles aumentados de estas moléculas puede ayudar a explicar porqué las células B activadas son más eficaces estimulando proliferación de células T específicas de antígeno de lo que lo son las células B en reposo (Kaiuchi y col., J. Immunol. 131: 109-114 (1983); Kreiger y col., J. Immunol. 135: 2937-2945 (1985); McKenzie, J. Immunol. 141: 2907-2911 (1988); y Hawrylowicz y Unanue, J. Immunol. 141: 4083-4088 (1988)).

15 La generación de una respuesta inmune de linfocitos T ("células T") es un procedimiento complejo que implica interacciones célula-célula (Springer y col., A. Rev. Immunol. 5: 223-252 (1987)), particularmente entre células T y células accesorias tales como células B y producción de los mediadores inmunitarios solubles (citocinas o linfocinas) (Dinarello y Mier, New Engl. Jour. Med. 317: 940-945 (1987)). Esta respuesta se regula por varios receptores de superficie de células T, incluyendo el complejo receptor de células T (Weiss y col., Ann. Rev. Immunol. 4: 593-619 (1986)) y otras moléculas de superficie "accesorias" (Springer y col., (1987) supra). Muchas de estas moléculas accesorias son antígenos de diferenciación de superficie celular (CD) que se dan en la naturaleza definidos por la reactividad de anticuerpos monoclonales sobre la superficie de células (McMichael, Ed, Leukocyte Typing III. Oxford Univ. Press, Oxford, N.Y. (1987)).

20 Con el fin de lograr activación de linfocitos T efectiva, dos receptores sobre la superficie celular deben unirse por sus respectivos ligandos y deben suministrar una señal a la célula. Primero el receptor de linfocitos T debe reconocer al antígeno en el contexto de MHC sobre una célula presentadora de antígeno. Segundo, a receptor co-estimulador debe unirse al ligando, o co-receptor, apropiado, en la célula presentadora de antígeno. El receptor coestimulador de células T más estudiado es CD28, que se une a moléculas B7 (CD80 y CD86) en células de presentación de antígenos. Green JL, Leytze GM, Emswiler J, Peach R, Bajorath J, Cosand W, Linsley PS. Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. J. of Biol. Chem. 271:26762-26771, 1994. La inhibición de la ruta de CD28/B7 *in vitro* inhibe proliferación de células T, producción de citocinas e induce no responsividad de las células T específica de antígeno. Green JL, Leytze GM, Emswiler J, Peach R, Bajorath J, Cosand W, Linsley PS. Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. J. of Biol. Chem. 271: 26762-26771, 1994; y Kelly S, Linsley P, Warner G, Shyu WC y Paborji M. Investigator Brochure, BMS-188667, CTLA4lg. En modelos animales, esta ruta ha mostrado ser importante en respuestas inmunes dependientes de células T, incluyendo reconocimiento y autoinmunidad aloantigénica. Green JL, Leytze GM, Emswiler J, Peach R, Bajorath J, Cosand W, Linsley PS. Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. J. of Biol. Chem. 271: 26762-26771, 1994; y Kelly S, Linsley P, Warner G, Shyu WC y Paborji M. Investigator Brochure, BMS-188667, CTLA4lg. Larsen, C.P, Pearson, T.C, Adams, A.B, Tso, P, Shirasugi, N, Strobert, E, Anderson, D, Cowan, S, Price, K, Naemura, J, Emswiler, J, Greene, J, Turk, L, Bajorath, J, Townsend, R, Hagerty, D, Linsley, P.S, y R. J. Peach. 2005. Rational Development of LEA29Y, a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties. American Journal of Transplantation. 5(3):443-53. Así, la ruta CD28/B7 representa una diana lógica, viable para un agente terapéutico inmunomodulador.

25 CTLA4lg (BMS-188667), una proteína de condensación que comprende el dominio extracelular de CTLA-4 humano (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) y un fragmento del dominio Fc de IgG1 humana, bloquea la ruta CD28/B7 uniéndose a COSO y CD86 sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos. Este compuesto se ha encontrado que es clínicamente útil como un inmunosupresor. Véase la Solicitud De Patente de los Estados Unidos 10/419,008 (Publicación N.º 20040022787 A1) que describe y discute CTLA4lg y L104EA29Ylg y los procedimientos de preparación y uso de las mismas. Documentos de Patente de los Estados Unidos Números: 5.844.095, 5.885.796, y 5.851.795 describen y discuten CTLA4lg.

Se encontró que una molécula relacionada, L104EA29Ylg (BMS-224818) (también conocida como LEA29Y), es un

- agente terapéutico inmunomodulador particularmente potente. Este compuesto es una molécula de CTLA4Ig humana que contiene una sustitución de dos aminoácidos que da como resultado la unión potenciada a CD80 y CD86 en relación con CTLA4Ig. Véase Larsen, C.P., Pearson, T.C., Adams, A.B., Tso, P., Shirasugi, N., Strobert, E., Anderson, D., Cowan, S., Price, K., NaemurFfia, J., Emswiler, J., Greene, J., Turk, L., Bajorath, J., Townsend, R., Hagerty, D., Linsley, P.S., and R. J. Peach. 2005. Rational Development of LEA29Y, a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties. *American Journal of Transplantation*. 5(3):443-53. La Solicitud de Patente de Estados Unidos 09/865,321 (Publicación N.º 2002-0182211 A1) describe y discute L104EA29YIg. EL documento WO 02/094202 informa de procedimientos para inhibir rechazo al trasplante celular de isletas, en particular para tratar diabetes, administrando moléculas mutantes de CTLA4 solubles tales como L104EA29YIg.
- 10 El documento WO 98/19706 informa de anticuerpos específicos CD80 humanos capaces de inhibir la unión de CD80 a un receptor de CD28 sin inhibir la unión de CD80 a un receptor de CTLA4.
- CD80 y CD86 se discuten en Carreno, B.M., y Collins, M., 2002 (*The B7 Family of Ligands and Its Receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses*, *Annu. Rev Immunol.* 20: 29-53) y Salomon, B. y Bluestone, J.A., 2001 (*Complexities of CD28/B7: CTLA-4 Costimulatory Pathways in Autoimmunity and Transplantation*, *Annu. Rev. Immunol.* 19: 225-52). Dado que CTLA4Ig y L104EA29YIg se unen a leucocitos circulantes que expresan moléculas CD80 y/o CD86, sería informativo monitorizar la extensión a la que CD80 y/o CD86 está(n) unido(s) a la(s) proteína(s) de condensación, además de la cantidad de compuesto que circula en el plasma durante uso clínico. En hacer tal cosa, los trabajadores clínicos serían capaces de correlacionar niveles de exposición de compuesto con niveles de saturación de receptor requeridos para eficacia con el fin de monitorizar la eficiencia de unión. Comprender la extensión a la que CD86 está saturado con L104EA29YIg a diversas concentraciones de sangre se puede usar para ayudar a justificar esquemas o regímenes de dosificación diferentes. Por ejemplo, durante la fase de desarrollo, se pueden utilizar diferentes formulaciones y vías de administración (por ejemplo tratamiento intravenoso mensual o subcutáneo semanal). Este ensayo se podría usar para ayudar a establecer la mejor vía y curso de administración que manifieste saturación máxima durante el periodo de tiempo más largo. El uso de ensayos de competición basados en FACS en caracterizar anticuerpos monoclonales para unir a epitopos de OX40L en células B activadas y células dendríticas se describe por Wang y col. (*Tissue Antigens*, Munksgaard, Copenhagen, DK, vol. 64, n.º 5, páginas 566-574, 5 de noviembre, 2004).

#### Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a ensayos para monitorizar y medir la unión de L104EA29YIg a un receptor CD86. En este ensayo, las células mononucleares periféricas se aíslan a partir de una muestra de sangre, y partes de la muestra de células mononucleares se preincuban con concentraciones crecientes de L104EA29YIg. Después de la incubación, se añade un anticuerpo anti-CD86 marcado y la unión del anticuerpo marcado se mide usando citometría de flujo. Comparando la unión de partes de la muestra de células mononucleares con concentraciones variantes de L104EA29YIg añadidas a una parte de la muestra de células mononucleares sin ninguna L104EA29YIg añadida, alguien puede determinar que L104EA29YIg está uniéndose al receptor.

En otra realización más de la invención, se proporciona un procedimiento de ensayo en el que la eficiencia de unión de L104EA29YIg a un receptor se mide usando un anticuerpo competitivo y un anticuerpo no competitivo concurrentemente. En un ensayo tal, los monocitos periféricos se aíslan a partir de una muestra de sangre y partes de la muestra de monocitos se preincuban con L104EA29YIg. Después de la incubación, se añade un anticuerpo anti-receptor competitivo marcado y después se añade un anticuerpo antirreceptor no competitivo. La unión de los dos anticuerpos se mide usando citometría de flujo. La unión del anticuerpo no competitivo representa la cantidad de receptor total y la unión del anticuerpo competitivo representa la cantidad de receptor disponible, no unido por L104EA29YIg. De este modo, la eficiencia de unión de L104EA29YIg se puede determinar usando una muestra única.

En otra realización más de la invención, se proporciona un procedimiento de ensayo en el que la eficiencia de unión de L104EA29YIg a un receptor se mide usando un anticuerpo competitivo y un anticuerpo no competitivo en muestras separadas. En un ensayo tal, la sangre completa se trata con L104EA29YIg. PBS se usa como un control no tratado. Se añade solución de IgG de ratón a todas las muestras para bloquear la unión no específica de reactivos de detección. Para detectar niveles de CD86 no unido, el anticuerpo antirreceptor competitivo marcado fluorescentemente (por ejemplo, mAb HA5) se añade a un grupo de muestras. Para detectar niveles de CD86 totales, un anticuerpo antirreceptor no competitivo marcado fluorescentemente (por ejemplo mAb 2D4) se añade a otro grupo de muestras. Para detectar monocitos, se añade anti-CD14-FITC a cada muestra. Para evaluar la fluorescencia no específica asociada con los mAb anti-CD86 marcados, se añade mAb CD86 antihumano no marcado en exceso a un subgrupo de muestras relevantes (por ejemplo se añade HA5 no marcado a muestras que contenían HAS marcado). Las células se lisaron usando solución de lisis y la unión de los anticuerpos se mide usando citometría de flujo. La unión del anticuerpo no competitivo representa la cantidad del receptor total y la unión del anticuerpo competitivo representa la cantidad de receptor disponible, no unido por L104EA29YIg. La unión específica ( $\Delta$ MF1 (intensidad de fluorescencia media)) se determina por la diferencia entre la unión total (mAb anti-CD86 marcado solo) y la unión no específica (marcado + mAb anti-CD86 no marcado en exceso). De este modo, la eficiencia de unión de L104EA29YIg se puede determinar usando dos muestras separadas.

En aún otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento de ensayo para monitorizar la eficiencia de

unión de L104EA29Ylg en un marco clínico. En un ensayo tal, un paciente se administra con L104EA29Ylg. Se obtiene una muestra de sangre del paciente, y una mezcla de las IgG de ratón se añade a alícuotas de la muestra de sangre para reducir unión no específica mediada por receptor de Fc. Se añade CD14-FITC antihumana para identificar monocitos. Después, se añadieron anticuerpo antirreceptor competitivo marcado y anticuerpo antirreceptor no competitivo marcado a las alícuotas de la muestra de sangre. Como anteriormente, para evaluar la fluorescencia no específica asociada con los mAb anti-CD86 marcados, se añade mAb anti-CD86 humano no marcado en exceso a un subgrupo de las muestras relevantes (por ejemplo se añade HA5 no marcado a muestras que contienen HAS marcado). Se usa una solución de lisis/fijadora para lisar las células rojas de la sangre y fijar los leucocitos. Las muestras se centrifugaron para retirar las células sanguíneas lisadas y aislar los leucocitos. El receptor total y el receptor disponible (no unidos por L104EA29Ylg) se miden determinando la unión de los anticuerpos competitivos y no competitivos (respectivamente). La unión específica ( $\Delta$ MFI) se determina por la diferencia entre la unión total (mAb anti-CD86 marcado solo) y la unión no específica (mAb anti-CD86 marcado + mAb anti-CD86 no marcado en exceso).

En un aspecto preferido de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-receptor es un anticuerpo anti-CD86. En particular, el anticuerpo anti-CD86 competitivo es FUN-1, IT2.2, o HA5 (clon de HA5.2B7). En otro aspecto preferido de la invención, el anticuerpo anti-CD86 humano está marcado con un fluoróforo. En otro aspecto preferido de la invención, el fluoróforo es ficoeritrina (PE).

En aún otro aspecto preferido de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-CD86 no competitivo es mAb 2D4.

En otra realización más de la invención, se proporcionan el anticuerpo monoclonal mAb 2D4 y un hibridoma que expresa este mAb. El hibridoma usado para producir este anticuerpo se depositó en la ATCC el 13 de enero, 2006, como número de depósito PTA-7305 (hibridoma que expresa mAb 2D4). Éstas y otras realizaciones de la invención serán patentes a la luz de la descripción detallada más adelante.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra los resultados de una competición de CD86 en células mononucleares de sangre periférica aisladas con mAb competitivo FUN-1.

La Figura 2 ilustra (a) los resultados de competición en sangre completa con mAb competitivo FUN-1 (Iug/ml) y (b) los resultados de competición en sangre completa con un mAb no competitivo 2D4.

La Figura 3 presenta la secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º: 1) de la molécula de CTLA4lg. También se muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 2) codificada por el ácido nucleico. Moléculas de CTLA4lg que se pueden producir a partir de este nucleótido incluyen moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de restos: (i) 26-383 de SEC ID N.º: 2, (ii) 26-382 de SEC ID N.º: 2, (iii) 27-383 de SEC ID N.º: 2, o (iv) 26-382 de SEC ID N.º: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N.º: 2, o (vi) 25-383 de SEC ID N.º: 2. El ADN y las secuencias de aminoácidos comprenden las siguientes regiones: (a) una secuencia señal de Oncostatina M (aminoácidos 1-26 de SEC ID N.º: 2); (b) un dominio extracelular de CTLA4 humano (aminoácidos 27-151 de SEC ID N.º: 2); (c) una parte modificada de la región constante de la IgG I humana (aminoácidos 152-383 de SEC ID N.º: 2), incluyendo una región bisagra modificada (aminoácidos 152-166 de SEC ID N.º: 2), un dominio CH2 de IgG1 humana modificado (aminoácidos 167-276 de SEC ID N.º: 2) y un dominio CH3 de IgG 1 humana modificado (aminoácidos 277-383 de SEC ID N.º: 2).

La Figura 4 representa una secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º: 3) y una secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 4) de L104EA29Ylg (también conocida como "LEA29Y") que comprende una secuencia señal de Oncostatina M; un dominio extracelular mutado de CTLA4 empezando en (como se indica en la Figura 4) metionina en la posición +1 y terminando en ácido aspártico en la posición +124, o empezando en alanina en la posición -1 y terminando con ácido aspártico en la posición +124; y una región Ig. SEC ID N.º: 3 y 4 indican el primer aminoácido de la secuencia señal de Oncostatina M (M, que está seguida por G) como 1. SEC ID N.º: 3 y 4 representan un nucleótido y una secuencia de aminoácidos, respectivamente, de L104EA29Ylg que comprende una secuencia señal de Oncostatina M; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en la metionina en la posición +27 y termina con ácido aspártico en la posición +150, o comienza en la alanina en la posición +26 y termina con ácido aspártico en la posición +150; y una región Ig. L104EA29Ylg puede tener la secuencia de aminoácidos de residuos: (i) 26-383 de SEC ID N.º: 4, (ii) 26-382 de SEC ID N.º: 4; (iii) 27-383 de SEC ID N.º: 4 o (iv) 27-382 de SEC ID N.º: 4, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N.º: 4, o (vi) 25-383 de SEC ID N.º: 4.

La Figura 5 representa los resultados de una competición de receptor CD86 *ex vivo* en sangre completa con mAb HA5 y mAb FUN1. (NHV = Voluntario Sano Normal). Esta figura demuestra que la concentración de L104EA29Ylg necesaria para inhibir unión específica de HA5 un 50% es 0,13 ug/ml, y la concentración de L104EA29Ylg necesaria para inhibir la unión específica de FUN1 un 50% es 0,49 ug/ml.

La Figura 6 representa la caracterización de competición de CD86 con mAb FUN 1 después de la incubación de sangre completa con L104EA29Ylg. (MFI = intensidad de fluorescencia mediana; MLR = reacción de leucocitos mixta; NS = No específico). Esta figura resume actuación de FUN-1 en el ensayo en sangre recogido de 6 NHV diferentes demostrando el efecto de inhibición de L104EA29Ylg de unión del anticuerpo.

La Figura 7 representa la caracterización de competición de CD86 con mAb HA5 después de la incubación de sangre

completa con L104EA29Ylg. Esta figura resume la actuación de HA5 en el ensayo en sangre recogida de 6 diferentes NHV que demuestra el efecto de inhibición de L104EA29Ylg de la unión del anticuerpo.

5 La Figura 8 representa un ensayo de competición de receptor CD86 en sangre completa recogida de NHV a los que se ha administrado L104EA29Ylg subcutáneamente. (SC = subcutánea; los cuadrados indican pre-dosis, los triángulos indican el Día 5, los círculos indican el Día 14 y los Diamantes indican el Día 42). La Figura 8 demuestra que la administración de L104EA29Ylg SC a voluntarios sanos normales, inhibe la unión de FUN1 a monocitos en el día 5, pero este efecto se invierte el día 14.

10 La Figura 9 representa la correlación entre propiedades farmacocinéticas (PK) y propiedades farmacodinámicas (PD) de los resultados mostrados en la Figura 8, que ayudan a entender qué concentraciones de fármaco en suero se requieren para lograr una actividad farmacodinámica tal como saturar el objetivo. Los triángulos abiertos y cerrados representan los dos sujetos que recibieron L104EA29Ylg. Esta figura demuestra que en los sujetos a los que se ha administrado L104EA29Ylg SC, se observa más inhibición de la unión de Fun-1 a monocitos en sangre periférica con concentraciones crecientes en suero de L104EA29Ylg.

15 La Figura 10 representa una comparación de la unión específica de varios mAb anti-CD86 en NHV a monocitos en sangre completa. Los datos muestran que todos los tres anticuerpos se unen a monocitos en un modo similar.

La Figura 11 representa unión específica de mAb 2D4 en muestras clínicas (incluyendo sangre de pacientes de trasplante renal tratados con L104E29Ylg). En pacientes de trasplante que recibieron L104EA29Ylg, la unión de 2D4 está inalterada después de la administración de L104EA29Ylg y no es significativamente diferente de la de los NHV.

20 La Figura 12 representa unión específica de mAb HA5 y mAb FUN 1 en muestras clínicas (incluyendo sangre de pacientes transplantados tratados con L104E29Ylg). Estos datos demuestran que a diferencia de la unión de 2D4, la unión de FUN-1 y de HA5 se inhibe significativamente por administración de L104E29Ylg en pacientes de trasplante y se reduce significativamente con respecto a los NHV.

25 La Figura 13 representa perfiles de PK y de PD clínicos simulados. Esta figura representa un modelo sugiriendo como este ensayo podría usarse para monitorizar saturación de receptor después de administración de L104E29Ylg. Ello plantea como hipótesis que poco después de la primera dosis, la saturación del receptor se maximiza y permanece al nivel deseado a pesar de cambios en régimen de dosificación tales como frecuencia de dosis o fuerza de dosis.

La Figura 14 representa la valoración de FUN1 PE anti-CD86, demostrando los efectos sobre la unión de L104EA29Ylg. Estos resultados se usaron para determinar la concentración de anticuerpos para usar en ensayos de competición.

30 La Figura 15 representa la valoración de PE HA5.2B7 anti-CD86, demostrando los efectos sobre la unión de L104EA29Ylg. Estos resultados se usaron para determinar la concentración de anticuerpos para usar en ensayos de competición.

La Figura 16 representa la valoración de PE 2D4 anti-CD86, demostrando los efectos de la unión de L104EA29Ylg. L104EA29Ylg no afecta la unión de mAb 2D4.

35 La Figura 17 representa unión específica de un mAb 2D4 no competitivo en muestras clínicas de sujetos a largo plazo y a corto plazo. En paciente de trasplante que recibe L104EA29Ylg, la unión de 2D4 está inalterada después de la administración de L104EA29Ylg y no es diferente significativamente de la de los sujetos control tratados con Ciclosporina A (CsA). El ensayo es similar al ensayo descrito en la Figura 11 salvo porque los sujetos tratados con CsA se usan como controles y los resultados de sujetos tratados con L104EA29Ylg durante un periodo de 6 meses o menos están también incluidos.

40 La Figura 18 representa unión específica de un anticuerpo monoclonal competitivo HA5 en muestras clínicas de sujetos a largo plazo y a corto plazo. Estos datos demuestran que la unión a HA5 se inhibe significativamente por administración de L104EA29Ylg en pacientes de trasplantes y está significativamente reducida comparada con sujetos control tratados con CsA. El ensayo es similar al ensayo descrito en la Figura 12 salvo porque los sujetos tratados con Csa se usaron como controles y los resultados de sujetos tratados con L104EA29Ylg durante un periodo de 6 meses o menos están también incluidos.

45 La Figura 19 representa ensayo de competición de receptor CD86 en sangre completa de voluntarios sanos normales con mAb HA5. Los datos demuestran que la concentración de CTLA4lg necesaria para inhibir unión específica de HA5 en un 50% es 2,63 µg/ml, mientras que la concentración de L104EA29Ylg requerida para inhibir la unión específica de HA5 un 50% es 0,11 µg/ml. El ensayo es el mismo tipo de ensayo como se muestra en la Figura 5, donante B, salvo porque los resultados en la Figura 19 representan la respuesta promedio de 6 donantes.

50 La Figura 20 representa ensayo de competición de receptor CD80 en sangre completa de voluntarios sanos normales con mAb L307.4. Los datos demuestran que la concentración de CTLA4lg requerida para inhibir unión específica de L307.4 en un 50% es 0,01 µg/ml y que la concentración de L104EA29Ylg requerida para inhibir unión específica de L307.4 en un 50% es 0,01 µg/ml. Los resultados representan la respuesta promedio de 6 donantes.

55

La Figura 21 representa los resultados de saturación de receptor CD80 y CD86 y de inhibición de ensayo de alo-respuesta para comparación. Están representadas las  $CI_{50}$  de CTLA4Ig en una reacción de leucocitos mixta, en un ensayo de competición del receptor CD86 usando mAb HA5 y en un ensayo de competición de receptor CD80 usando mAb L307.4. También están representadas las  $CI_{50}$  de L104EA29YIg en una reacción de leucocitos mixta, en un ensayo de competición del receptor CD86 y en un ensayo de competición del receptor CD80 .

### Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de invención y a los Ejemplos incluidos en el presente documento. Esta invención describe el desarrollo de un "Ensayo de Competición de Receptor CD86" basado en citometría de flujo para L104EA29YIg. Los intentos preliminares para desarrollar un ensayo de competición de receptor CD86 basado en CTLA4Ig fallaron. La afinidad relativamente alta de L104EA29YIg para CD86 (en relación con CTLA4Ig o mAb) permite a L104EA29YIg competir por la unión con los mAb anti-CD86 puestos a prueba.

La citometría de flujo se ha usado con regularidad creciente en laboratorios clínicos para realizar inmunofenotipo de antígenos leucocitarios. Las ventajas de la citometría de flujo incluyen velocidad, sensibilidad, precisión y objetividad. Los componentes y la operación de citómetros de flujo se conocen bien por aquellos expertos en la técnica y no se describirán en detalle en el presente documento. Para propósitos de una descripción de tales cosas, los solicitantes se refieren a la Patente de los EE.UU. N.º 5,567,627, expedido el 22 de octubre, 1996. Es suficiente indicar que los componentes y la metodología de la citometría de flujo, se pueden usar para proporcionar información específica en un número de parámetros de una muestra. Por ejemplo es posible proporcionar información en componentes de tamaños diferentes dentro de una muestra, proporcionando mientras simultáneamente información en las señales de diferentes longitudes de onda recibidas de diferentes componentes recibidos de la muestra. Así, cuando una muestra incluye componentes de diversos tamaños e incluye también componentes con marcadores que emiten diferentes longitudes de onda de luz los datos de citometría de flujo obtenidos pueden proporcionar información multidimensional al usuario. La presente invención utiliza esta tecnología proporcionando tipos diferentes de anticuerpos marcados y células marcadas y no marcadas que expresan antígenos conocidos. Exponiendo una muestra a tales cosas y a partir de entonces analizando tales cosas dentro de un citómetro de flujo es posible obtener cantidades sustanciales de información con respecto a la sangre en una manera rápida y eficiente.

En este ensayo citométrico de flujo, los niveles de expresión de CD86 totales en monocitos periféricos se detectaron por un mAb realmente no competitivo (por ejemplo 2D4) y el nivel de las moléculas CD86 no unidas por L104EA29YIg se detectó por un mAb anti-CD86 competitivo (por ejemplo FUN-1 e IT2.2).

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo anti-receptor competitivo es un anticuerpo que evita de forma medible la unión a un receptor por medio de una molécula dada, tal como L104EA29YIg. Un anticuerpo anti-receptor no competitivo es un anticuerpo que no evita de forma medible la unión de una molécula dada, tal como L104EA29YIg, al receptor.

Como se usa en el presente documento, "CTLA4Ig" o "CTLA4-Ig" se refiere a una molécula de proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de residuos: (i) 26-383 de SEC ID N.º: 2, (ii) 26-382 de SEC ID N.º: 2, (iii) 27-383 de SEC ID N.º: 2, o (iv) 27-382 de SEC ID N.º: 2, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N.º: 2, o (vi) 25-383 de SEC ID N.º: 2. La expresión de CTLA4Ig en células de mamífero puede dar como resultado la producción de variantes N- y C-terminales. CTLA4Ig también se refiere a formas multiméricas del polipéptido, tales como dímeros, tetrámeros y hexámeros. Las combinaciones diméricas pueden incluir, por ejemplo: (i) e (i); (i) e (ii); (i) e (iii); (i) e (iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) e (ii); (ii) e (iii); (ii) e (iv); (ii) e (v); (ii) y (vi); (iii) e (iii); (iii) e (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) e (iv); (iv) y (v); (iv) y (vi); (v) y (v); (v) y (vi); y (vi) y (vi). Estas combinaciones diméricas diferentes pueden asociarse también entre sí para formar moléculas de CTLA4Ig tetrámeras. (El ADN que codifica CTLA4Ig como se muestra en la SEC ID N.º: 2 se depositó el 31 de mayo, 1991 con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 según lo que estipulan las especificaciones del Tratado de Budapest y habiéndose acordado número de acceso de ATCC 68629; una línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresa CTLA4Ig como se muestra en SEC ID N.º: 2 se depositó el 31 de mayo, 1991 con número de identificación de ATCC CRL-10762).

L104EA29YIg (también conocida como "LEA29Y" o "L104EA29Y") es una proteína de condensación modificada mediante ingeniería genética similar en estructura a CTAL4Ig. Se hicieron dos modificaciones de aminoácidos para CTLA4Ig, leucina a ácido glutámico en la posición 104 (L104E), que es posición 130 de SEC ID N.º: 2, y alanina a tirosina en la posición 29 (A29Y), que es posición 55 de SEC ID N.º: 2, para generar L104EA29YIg.

Como se usa en el presente documento, "L104EA29YIg" se refiere a una molécula de proteína que tiene la secuencia de residuos: (i) 26-383 de SEC ID N.º: 4, (ii) 26-382 de SEC ID N.º: 4, (iii) 27-383 de SEC ID N.º: 4, o (iv) 27-382 de SEC ID N.º: 4, u opcionalmente (v) 25-382 de SEC ID N.º: 4, o (vi) 25-383 de SEC ID N.º: 4. La expresión de L104EA29YIg en células de mamíferos puede dar como resultado la producción de variantes N- y C-terminales. L104EA29YIg también se refiere a formas multiméricas del polipéptido, tales como dímeros, tetrámeros y hexámeros. Las combinaciones diméricas pueden incluir, por ejemplo: (i) e (i); (i) e (ii); (i) e (iii); (i) e (iv); (i) y (v); (i) y (vi); (ii) e (ii); (ii) e (iii); (ii) e (iv); (ii) y (v); (ii) y (vi); (iii) e (iii); (iii) e (iv); (iii) y (v); (iii) y (vi); (iv) y (iv); (iv) y (v); (iv) y (vi); (v) y (v); (v) y (vi); y (vi) y (vi). Estas combinaciones diméricas diferentes también se pueden asociar entre sí para formar moléculas

de L104EA29Ylg tetrámeras. (El ADN que codifica L104EA29Ylg se depositó el 20 de junio, 2000, con la American Type Culture Collection (ATCC) 1994. Se ha acordado el número de acceso de ATCC PTA-2104. L104EA29Ylg se describe adicionalmente en las solicitudes de patente de Estados Unidos en trámite junto con el presente documento de N.º de Serie 09/579,927, 60/287,576 y 60/214,065, y en los documentos US20020182211A1 y WO/01/923337 A2.)

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1. Ensayos *In Vitro*

Se llevaron a cabo experimentos iniciales midiendo la unión de L104EA29Ylg a CD86. Se usaron diversos anticuerpos de forma individual o en combinación desarrollando un procedimiento de ensayo que permita la medida de unión de L104EA29Ylg en relación con la disponibilidad del receptor CD86.

## 10 Materiales

- PBS de Dulbecco sin Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> (Mediatech Inc., Herndon VA, N.º de Cat. 21-031-CM), o equivalente
- BMS-224818-01 (L104EA29Ylg), 100 mg, se resuspendieron y se almacenaron congelados como una solución madre de 10 mg/ml en PBS
- Medio de Separación de Linfocitos (Mediatech Inc., Herndon VA, N.º de Cat. 25-072-CV)
- 15 • Azida de sodio (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, N.º de Cat. S2002), o equivalente
- Azul Tripano, al 0,4% (Invitrogen, Grand island NY, N.º De Cat. 15250-061) o equivalente
- Solución de Lisis de FACS 10X (BD Biosciences, San José CA, N.º de Cat. 349202)
- Suero Fetal Bovino (Mediatech Inc., Herndon VA, N.º de Cat. 35-011-CV), o equivalente
- IgGk humana, de plasma humano (Sigma-Aldrich, San Luís, MO, N.º de Cat. 15154), o equivalente
- 20 • IgG de suero humano (Sigma-Aldrich, San Luís, MO, N.º de Cat. I4506), o equivalente
- IgG de suero murino (Sigma-Aldrich, San Luís, MO, N.º de Cat. I5381), o equivalente
- mAb conjugado anti-CD14-FITC (Becton Dickinson, San José, CA N.º de Cat. 555397)
- mAb anti-CD86-PE conjugado, clon FL1N-1 (Becton Dickinson, San José, CA N.º de Cat. 555658)
- mAb anti-CD86-PE conjugado, clon IT2.2 (Becton Dickinson, San José, CA N.º de Catálogo 555665)
- 25 • mAb 2D4-PE anti-CD86-PE conjugado. (mAb patentado por BMS, conjugado a PE, Lote Control N.º 14640, por Caltag Laboratories).
- mAb Anti-CD80-PE conjugado (1420-PE) (mAb patentado por BMS, conjugado a PE, Lote Control N.º 17312, por Caltag Laboratories.)
- CPT Vacutainer™ con citrato de sodio, 8 ml. (Becton Dickinson, N.º de Cat. 362761)
- 30 • CPT Vacutainer™, con heparina sódica, 8 ml, (Becton Dickinson, N.º de Cat. 362753)
- mAb L307.4 conjugado anti-CD80 (Becton Dickinson, N.º de Cat. 340294)
- mAb 104 anti-CD80 conjugado (Beckman Coulter, N.º de Cat. IM1976)
- Fórmula de Solución de Dextrosa de Citrato Ácido Anticoagulante (ACD-A) (dextrosa a 2 mg/ml, citrato de sodio a 1,8 mg/ml, ácido cítrico a 0,6 mg/ml; Gambro N.º 777967000) Heparina (Sigma H3149, 30 U/ml)

## 35 A. Detección de CD86 en PBMC Humanas y competición con L104EA29Ylg

Dado que los monocitos representan la población de leucocitos circulante que expresa la expresión más abundante de CD86, la expresión de CD86 en monocitos CD 14+ se evaluó en un ensayo de inmunofluorescencia directa de dos colores (Figura 1). Como se espera, los monocitos periféricos en PBMC (monocitos de sangre periférica) expresaron niveles moderados de CD86 tal como se detecta por la unión de mAb FUN-1 anti-CD86 (o por datos de IT2.2 no mostrados). Cuando PBMC se preincubaron con concentraciones crecientes de L104EA29Ylg (0,1 a 100 µg/prueba), la unión de anti-CD86 detectable se inhibió en una manera dependiente de concentración. Estos datos sugieren que L104EA29Ylg puede competir con mAb anti-CD86 selectivos (por ejemplo FUN-1e IT2.2) para unión de CD86 en monocitos de sangre periférica. Así los reactivos y el potencial para generar un ensayo de competición de receptor CD86 para medir bloqueo de coestimulación por L104EA29Ylg existen y así sólo se deben a la alta afinidad única que L104EA29Ylg tiene para CD86.

Sin desear comprometerse con ningún procedimiento específico, los Solicitantes proporcionan el siguiente procedimiento de ejemplo para demostrar como el ensayo puede realizarse en un ajuste *in vitro*:

#### Procedimiento de PBMC:

- 5 1. Se retiran 40 ml de sangre en una jeringuilla que contiene heparina (30 U/ml), EDTA (5,4 mM) o ACD-A (dextrosa a 2 mg/ml, citrato de sodio a 1,8 mg/ml, ácido cítrico a 0,6 mg/ml) como un anticoagulante.
2. Fase de 20 ml de sangre sobre 15 ml de Medio de Separación de Linfocitos.
3. Centrifugar a 1800 rpm durante 25 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar la fase de PBMC y transferir a un tubo de 50 ml. Añadir 30 ml de PBS.
5. Centrifugar a 1800 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 10 6. Resuspender la pella en 50 ml de PBS.
7. Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Resuspender el sedimento en PBS y determinar el número de células usando tinción con azul Tripano.
9. Resuspender las células a una concentración final de 107 células por ml en FBS al 0,5%/PBS/azida sódica al 0,1%.
- 15 10. Alicuotar 106 células (100 µl) en un tubo de poliestireno de 12 x 75 mm en hielo.
11. Añadir L104EA29Ylg a las concentraciones deseadas (por ejemplo, entre 0 y 200 µg/ml) al tubo e incubar durante 15 minutos en hielo.
12. Añadir 20 µg de bien IgG1 humana (200 µg/ml, concentración final) o bien de IgG humanas mezcladas (concentración final de 200 µg/ml) bloqueando unión de FcR potencial de anticuerpos de detección. Incubar 10 minutos en hielo.
- 20 13. Añadir cantidad indicada (por ejemplo 1 µg) de anticuerpo PE anti-CD86 humano (anticuerpo marcado con PE, es decir, ficoeritrina) (por ejemplo clon FUN1 de BD), incubar 30 minutos en hielo.
14. Añadir 1 ml Solución de Lisis de FACS, incubar 30 minutos en hielo.
- 25 15. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Resuspender sedimento en 250 µl de Solución de Lisis de FACS.
16. Leer en citómetro de flujo. Para adquisición, fijar la población de monocitos, como se identifica por propiedades de dispersión directa y lateral (G1). La adquisición se detiene después de acumulación de 5000 eventos de G1.
- 30 17. Para análisis, la fluorescencia media de eventos de G1 se determinó en un histograma de eventos de FL2 (CD86 PE) y se usa determinando el nivel relativo de CD86 presente en la superficie de monocitos.

#### B. Detección de CD86 en Muestras de Sangre Completa Humana y competición con L104EA29Ylg

Para ser útil como un ensayo clínico, la competición de CD86 observada en PBMC debe ser también detectable en muestras de sangre completa. Para demostrar este potencial, se sacó sangre completa de un voluntario sano normal en vacutainers conteniendo bien ACD o bien EDTA. La sangre se preincubó después con L104EA29Ylg a 0, 5, 120 y 250 µg/ml a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación, se midió el CD86 no ocupado por L104EA29Ylg incubando las muestras de sangre a 4°C con FUN-1 (y/o IT2.2). Los resultados de las medidas de citometría de flujo sugieren que los niveles esperados de expresión de CD86 en monocitos CD14+ se detectaron; sin embargo, el uso de diferentes anticoagulantes dio como resultado niveles diferentes de CD86 detectables en ausencia de L104EA29Ylg. Las concentraciones crecientes de L104EA29Ylg inhibieron unión de FUN-1 en una manera dependiente de concentración (Figura 2a) y no pareció haber ningún efecto de elección de anticoagulante en esta inhibición.

Sin desear comprometerse con ningún procedimiento específico, los Solicitantes proporcionan el siguiente procedimiento de ejemplo para demostrar como debe de hacerse el ensayo:

#### Procedimiento de sangre completa

1. Sacar sangre al interior de ACD-A anticoagulante
- 45 2. Dispensar L104EA29Ylg en tubo de polipropileno 12 x 75 mm para la concentración final deseada (por ejemplo, entre 0 y 200 µg/ml).

3. Añadir sangre entera a L104EA29Ylg. Incubar en un rotador en la incubadora en atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 1 hora.
4. Alícuota 200 ul de muestra de sangre en un tubo de poliestireno de 12 x 75 mm en hielo.
5. A cada tubo, añadir 25 ug de IgG mezcladas de ratón bloqueando unión a FcR potencial de anticuerpos de detección. Incubar durante 15 minutos en hielo.
6. A cada tubo, añadir 20 ul de FITC anti-CD14 humano (5 µg/ml) \ y cantidad indicada (por ejemplo 1 lug) de anti-CD86 humano marcado por PE (por ejemplo clon FUN1 BD PE). Incubar en hielo durante 30 minutos.
7. Añadir 2 ml de Solución de Lisis de FACS (BD) a cada tubo. Incubar en hielo durante 30 minutos.
8. Hacer girar los tubos durante 5 minutos a 1500 rpm, a 4°C.
- 10 9. Resuspender en 200 µl de Solución de Lisis de FACS.
10. Leer en citómetro de flujo, ajustar ajustes de compensación según sea necesario. Para adquisición, fijar la población de monocitos, como se identifica por propiedades de dispersión directa y lateral (G1). Fijar monocitos CD14+ usando un gráfico de inmunotransferencia de dispersión directa frente a CD 14 (G2). Los eventos aditivos de G1 y G2 (llamados G3) se observan en un histograma mirando en el canal FL2 (CD86 PE). La adquisición se detiene después de acumulación de 3000 eventos de G3.
- 15 11. Para análisis, la fluorescencia media de eventos G3 se determina en un histograma de eventos FL2 (CD86 PE) y se usa determinando el nivel relativo de CD86 presente en la superficie de monocitos CD14+.

### 20 C. Detección de CD86 en Células de la Sangre Completa Humana con Uso Concurrente de Anticuerpos Anti-CD86 Competitivos y No Competitivos.

Adicionalmente, la unión de 2D4, un mAb anti-CD86 que no compite con CTLA-4, no está afectada por la preincubación con una alta concentración (200 µg/ml) de L104EA29Ylg (Figura 2b). Esto sugiere que 2D4 no compite con L104EA29Ylg para unirse a CD86 y se puede usar para medir la expresión de superficie total de CD86 incluso en presencia de L104EA29Ylg.

### 25 D. Sumario

Los datos para estos experimentos se muestran en Las Figuras 1, 2a y 2b. Estos datos demuestran que mAb anti-CD86 seleccionados (por ejemplo FUN-1 e IT2.2), que no compiten con CTLA4lg, competirán con L104EA29Ylg para unión a CD86 sobre la superficie de células presentadoras de antígenos. Los datos también demuestran que verdaderamente se pueden usar mAb anti-CD86 no competitivos (por ejemplo 2D4) midiendo expresión de CD86 de superficie total incluso en presencia de altas concentraciones de L104EA29Ylg. Estas observaciones son únicas para L104EA29Ylg debido a la afinidad mejorada por CD86 según se compara con CTLA4lg y otros ligandos de CD86. Estas observaciones son la base para la aplicación novedosa de estos reactivos para el desarrollo de un ensayo clínico para medir bloqueo de coestimulación por L104EA29Ylg.

### 35 Ejemplo 2. Estudios *Ex Vivo* e *In Vivo* Clínicos

Para ser útil como un ensayo clínico, la competición de CD86 observada en PBMC debe también ser detectable en muestras de sangre completa. Para demostrar este potencial, se saca sangre completa de un voluntario sano normal en vacutainers que contienen bien ACD o bien EDTA. La sangre estaba después preincubada con concentraciones variantes de L104EA29Ylg. Las concentraciones de ensayo se determinaron por valoración de FUN-1 PE, HA5 PE y 2D4 PE. (Véanse las Figuras 14-16, y las Tablas 1 y 2). Después de la incubación, el CD86 no ocupado por L104EA29Ylg se midió incubando las muestras de sangre a 4°C con HA5.2B7. La concentración de L104EA29Ylg necesaria para inhibir unión de anticuerpos en un 50% varía, dependiendo del anticuerpo. Por ejemplo, se requiere 0,13 µg/ml de L104EA29Ylg para inhibir unión de HA5 en un 50%, mientras que 0,49 µg/ml de L104EA29Ylg se requiere para inhibir unión de FUN-1 en un 50%. (Véase Figura 5). La actuación de FUN-1 y HA5 en el ensayo en sangre recogida de 6 voluntarios sanos normales diferentes (NHV) que demuestra el efecto de inhibición de L104EA29Ylg de unión de anticuerpo se muestra en las Figuras 6 y 7. En general, HA5 parece ser más sensible ya que detecta mayor saturación de receptor a concentraciones de L104EA29Ylg similares y CI<sub>50</sub> menores. Todos los tres anticuerpos monoclonales (FUN-1, HA5, y 2D4) se unen a CD86 (en monocitos) a niveles similares. (Véase Figura 10).

En estudios clínicos, la unión específica a FUN-1, según se mide por cambio en intensidad de fluorescencia media (MFI), se inhibe sustancialmente en el Día 5 después de dosificar con L104EA29Ylg. (Véase Figura 8). L104EA29Ylg inhibe la unión de FUN-1, y, cuando se administra subcutáneamente, según aumenta la concentración de L104EA29Ylg, así lo hace la inhibición de unión de FUN-1. (Véase Figura 9). En pacientes de trasplante que reciben continuamente L104EA29Ylg, la unión de 2D4 está inalterada siguiendo una administración individual de L104EA29Ylg y no es diferente significativamente de NHV. (Véase Figura 11). El término "depresión" se refiere al punto temporal justo antes de la siguiente administración del fármaco, cuando la concentración de fármaco está en su

5 nivel sanguíneo más bajo en un paciente. A diferencia de la unión de 2D4, la unión de Fun-1 y HA5 está significativamente inhibida por administración de L104EA29Ylg en pacientes de trasplante y está significativamente reducida comparada con NHV. (Véase la Figura 12; datos de 2D4 no mostrados.) La Figura 13 es un modelo que sugiere como este ensayo se podría usar monitorizando saturación de receptor tras administración de L104EA29Ylg. Ello plantea como hipótesis que poco después de la primera dosis, la saturación del receptor se maximiza y permanece al nivel deseado a pesar de los cambios en el régimen de dosificación tales como frecuencia de dosis o fuerza de dosis. Sin desear comprometerse con ningún procedimiento específico, los Solicitantes proporcionan el siguiente procedimiento de ejemplo para demostrar como puede realizarse el ensayo:

**Materiales**

- 10 • L104EA29Ylg, BMS Syracuse, lote 4E82288/MSF521A; vial de 100 mg reconstituido con 10 ml de PBS, a una concentración final de 10 mg/ml. Alícuotas de 50 µl almacenadas a -20°C
- Lote 15 de CD86 PE (clon HA5.2B7) de Beckman Coulter n.º IM2729 (conc. 6,25 µg/ml)
- clon 2D4 de APC CD86; 0,09 mg/ml; mAb generado de BMS, APC conjugada por Calbiochem
- FITC de CD14 BD n.º 555397
- 15 • Anti-CD86 purificado (clon de HA5.2B7) de Beckman Coulter N.º IM2728, 200 µg liofilizados; resuspendidos a 200 µg/ml en dH<sub>2</sub>O/azida al 0,1%
- 2,29 mg/ml de anti-CD86 humano purificado (clon de 2D4)
- IgG de ratón, grado de reactivo, N.º de Sigma 15381; 10 mg liofilizados; se resuspende en 5 ml de PBS a una concentración final de 2 mg/ml, se almacena a 4°C
- 20 • Solución de Lisis FACS, 10x, BD N.º 349202

**Procedimiento *In Vitro* de sangre completa**

1. Sacar sangre dentro de ACD-A vacutainer o dentro de jeringuilla con ACD-A como anticoagulante.
2. Diluir L104EA29Ylg a 10 mg/ml en PBS a una concentración que está 10 veces por encima de la concentración final deseada. Véanse diluciones en la Tabla 1 más adelante.

25 Tabla 1. Concentración de L104EA29Ylg usada en Ensayos

Conc. final de L104EA29Ylg	de µl de PBS	µl de L104EA29Ylg a 10 mg/ml	Correlación con valores clínicos
250 µg/ml	150	50	pico
125 µg/ml	175	25	intermedio
5 µg/ml	100	Primero diluir 1:100, después añadir 100	depresión
2 µg/ml	160	Primero diluir 1:100, después añadir 40	depresión

3. Dispensar 150 µl de L104EA29Ylg diluida en un tubo de polipropileno 12 x 75 mm. Dispensar 150 µl de PBS a tubo adicional para control no tratado.
4. Añadir 1,35 ml de sangre completa a L104EA29Ylg o PBS. Incubar en un rotador en la incubadora con atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 1 hora.
5. En hielo, dispensar 10 µl of solución de IgG de ratón a tubos de muestra de poliestireno de 12 x 75 mm.
6. Dispensar 100 µl de sangre para cada muestra en 12 tubos de poliestireno de 12 x 75.
7. Incubar en icc 10 minutos.
8. A tres tubos, añadir 3,5 µl purificados, mAb HA5 no marcado (purificado). A tres tubos adicionales, añadir 4,4 µl de mAb 2D4 purificado, no marcado. (Véase tabla a continuación). Incubar 15 minutos en hielo.
9. A todos los tubos, añadir 10 µl de CD14 FITC.

10. Añadir 20 µl de anticuerpo anti-CD86 humano PE (clon HA5.2B7) a tubos tal como se indica en la tabla a continuación. Añadir 10 µl de 2D4-APC a tubos como se indica en la Tabla 2 a continuación.

**Tabla 2.** Adición de reactivos de anticuerpos no marcados/marcados.

TUBO	HA5 PE, µl	HA5 no marcado, µl	2D4-APC, µl	2D4 no marcado, µl	CD14-FITC, µl
1	20	-	-	-	10
2	20	-	-	-	10
3	20	-	-	-	10
4	20	3,5	-	-	10
5	20	3,5	-	-	10
6	20	3,5	-	-	10
7	-	-	10	-	10
8	-	-	10	-	10
9	-	-	10	-	10
10	-	-	10	4,4	10
11	-	-	10	4,4	10
12	-	-	10	4,4	10

5 11. Incubar 30 minutos en hielo.

12. Diluir Solución de Lisis FACS 10x 1:10 con dH<sub>2</sub>O. Añadir 1 ml de Solución de Lisis FACS a cada tubo. Remover e incubar 15 minutos a TA.

13. Hacer girar los tubos durante 5 minutos a 1500 rpm, a 4°C.

14. Resuspender en 200 µl de Solución de Lisis FACS.

10 15. Leer en citómetro de flujo, ajustar ajustes de compensación según sea necesario. Para adquisición, fijar la población de monocitos, como se identifica mediante propiedades de dispersión directas y laterales (G1). Fijar monocitos CD14+ usando un gráfico de inmunotransferencia de dispersión directa frente a CD14 (G2). Los eventos aditivos de G1 y G2 (llamados G3) se observan en un histograma mirando en el canal FL2 (CD86 PE, FUN1) o en el canal FL4 (CD86 APC, 2D4). La adquisición se detiene después de acumulación de 3000 eventos de G3.

15 16. Para análisis, la fluorescencia media de eventos de G3 se determina en un histograma de eventos FL2 (CD86 PE, HA5) o de eventos FL4 (CD86 APC, 2D4) y se usa determinando el nivel relativo de CD86 presente en la superficie de monocitos CD14+.

### Ejemplo 3. Ensayo Clínico

#### A. Procedimiento de Ensayo Clínico de CD86

20 Realizando un ensayo tal, las muestras de sangre obtenidas de pacientes dosificados con L104EA29Ylg se pueden alicuotar dentro de muestras de 200 µl dentro de un tubo de poliestireno de 12 x 75 mm en hielo (4°C). A cada tubo, se pueden añadir 25 µg de IgG mezcladas de ratón bloqueando unión de FcR potencial de anticuerpos de detección (por ejemplo FUN-1, 2D4, 1420, etc.) y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. A cada tubo, se pueden añadir 20 µl de anti-CD14 FITC humano y la cantidad indicada (por ejemplo 1 µg) de anti-CD86 humano (por ejemplo FUN1, HA5 o 2D4) marcado fluorescentemente y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Evaluando la fluorescencia no específica asociada con los mAb anti-CD86 marcados, se añade mAb anti-CD86 humano no marcado en exceso a un subgrupo de muestras relevantes (por ejemplo se añade HA5 no marcado a muestras que contienen HA5). Se pueden añadir 2 ml de Solución de Lisis FACS (BD) a cada tubo lisando las células sanguíneas rojas y fijando los leucocitos. La sangre se pueden incubar subsiguientemente a 4°C durante 30 minutos. Para aislar los leucocitos y eliminar las RBC lisadas y los reactivos en exceso, las muestras se pueden centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se pueden resuspender en 200 µl de Solución de Lisis FACS para análisis en el citómetro de flujo como se describe en los procedimientos. El CD86 total expresado sobre la superficie de la APC se puede determinar usando mAb 2D4 mientras

que el CD86 disponible se puede medir usando mAb FUN-1 o HA5 como ejemplos. Se determina unión específica ( $\Delta$ MF1) por la diferencia entre la unión total (mAb anti-CD86 marcado solo) y la unión no específica (mAb anti-CD86 marcado + mAb anti-CD86 no marcado en exceso). Con estos datos alguien podría calcular la proporción de CD86 no unido a CD86 total y determinar la extensión de saturación de receptor por L104EA29Ylg en una muestra de sangre dada. Alternativamente, alguien podría también realizar el mismo procedimiento en sangre del paciente obtenida antes de administración de L104EA29Ylg determinando los niveles de CD86 totales y repetir el análisis después de la administración del compuesto midiendo el decrecimiento en la unión de anticuerpo competitivo según se compara con pre-tratamiento. De este modo, alguien sería capaz de determinar la extensión de saturación de receptor después de administración de compuesto.

## 10 B. Procedimiento de Ensayo Clínico de CD80

Aunque la expresión de CD80 en monocitos es muy baja o no se da nada en absoluto, otros tipos celulares o monocitos activados expresan niveles más altos de CD80. La expresión de CD80 total y disponible puede medirse en un modo similar en estos tipos celulares usando los mAb 1420 de CD80 no competitivos midiendo CD80 total expresado y los mAb L307.4 o mAb MAB104 competitivos midiendo CD80 no unido por L104EA29Ylg. Con estos datos alguien podría calcular la proporción de CD80 no unido frente a CD80 total y determinar la extensión de saturación de receptor por L104EA29Ylg en una muestra de sangre dada.

Alternativamente, se podría también realizar el mismo procedimiento en sangre del paciente obtenida antes de administración de L104EA29Ylg determinando los niveles de CD80 y repetir el análisis tras la administración del compuesto midiendo el decrecimiento en la unión del anticuerpo competitivo en comparación con pre-tratamiento. De este modo, alguien sería capaz de determinar la extensión de saturación de receptor tras administración de compuesto.

Como se muestra en la Figura 20, se estimuló la sangre completa con LPS a 1  $\mu$ g/ml durante 4 horas a 37°C induciendo la expresión de CD80. El nivel de CD80 no unido se determinó por el nivel de unión de anticuerpo competitivo L307.4. Los resultados mostrados en la Figura 20 representan la respuesta promedio de 6 donantes.

## 25 C. Ensayo de alorrespuesta

Para medir las alorrespuestas, se llevaron a cabo reacciones de leucocitos mixtas (MLR). Para ensayos de proliferación de MLR que miden valoraciones de CTLA-4lg o L104EA29Ylg, los linfocitos T se cultivaron a 1 X 10<sup>5</sup>/pocillo en pocillos cuadruplicados junto con 1 X 10<sup>3</sup>, 2 X 10<sup>3</sup> o 0,4 X 10<sup>3</sup> MoDC alogénicas como células presentadoras de antígenos (APC) en placas de fondo redondo de 96 pocillos en un volumen total de 200  $\mu$ l de FCS al 10%-RPMI. Se añadió CTLA-4lg o L104EA29Ylg a pocillos a una concentración final de partida de 30  $\mu$ g/ml, seguida por diluciones semilogarítmicas hasta una concentración final de 1 ng/ml. En el día 5 después de la iniciación de las MLR, los cultivos se sometieron a pulsos con un  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-timidina (PerkinElmer, Boston, MA) durante 6 horas, se cosecharon en un recogedor de células de Packard (PerkinElmer), y se contaron por centelleo líquido en un +Packard TopCount NXT (PerkinElmer). Los resultados de saturación del receptor CD80 y del receptor CD86 y de inhibición de ensayo de alorrespuesta se muestran en la Figura 21.

### Ejemplo 4. Procedimientos de Producir Anticuerpos

La producción de anticuerpos se discute en detalle en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 10/375157 (N.º de Publicación 2003-0224458). Los anticuerpos de la invención se pueden producir por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferentemente, por técnicas de expresión recombinantes.

El mAb 2D4 y el mAb 1420 se marcaron con fluorocromos usados típicamente en estudios en citometría de flujo (FITC, PE, etc.). El ensayo no es dependiente del tipo de fluorocromo usado, se pueden usar diferentes marcas en este ensayo y se pueden mezclar y emparejar para adecuarse al propósito de los investigadores.

#### Listado de Secuencias

<110> BRILTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

TOWNSEND, ROBERT M.

PRIETO, FRANCISCO L.

FLEENER, CATHERINE A.

<120> ENSAYOS DE COMPETICIÓN DE RECEPTORES CD86 Y CD80

<130> 10733 PCT

<150> 60/761,624

<151> 24-7-2006

<150> 60/832,012

<151> 20-7-2006

<160> 4

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1152

<212> ADN

<213> CTLA4Ig

10 <400> 1

```

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca    60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga    120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg    180
acagtgcttc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggaac ctacatgatg    240
gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa    300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg    360
gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaacca gatttatgta    420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac    480
acatccccac cgccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttcccc    540
ccaaaacca aggacacctt catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg    600
gacgtgagcc acgaagacce tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg    660
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc    720
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctcc    780
aacaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga    840
gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc    900
ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatg ccgtggagtg ggagagcaat    960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc   1020
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca   1080
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct   1140
ccgggtaaat ga                                                                1152

```

<210> 2

<211> 383

<212> PRT

15 <213> CTLA4Ig

<400> 2

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro  
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu  
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg  
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met  
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser  
 85 90 95

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

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr  
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His  
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val  
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys



gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900  
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020  
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080  
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1140  
 ccgggtaaat ga 1152

<210> 4

<211> 383

<212> PRT

5 <213> L104EA29Ylg

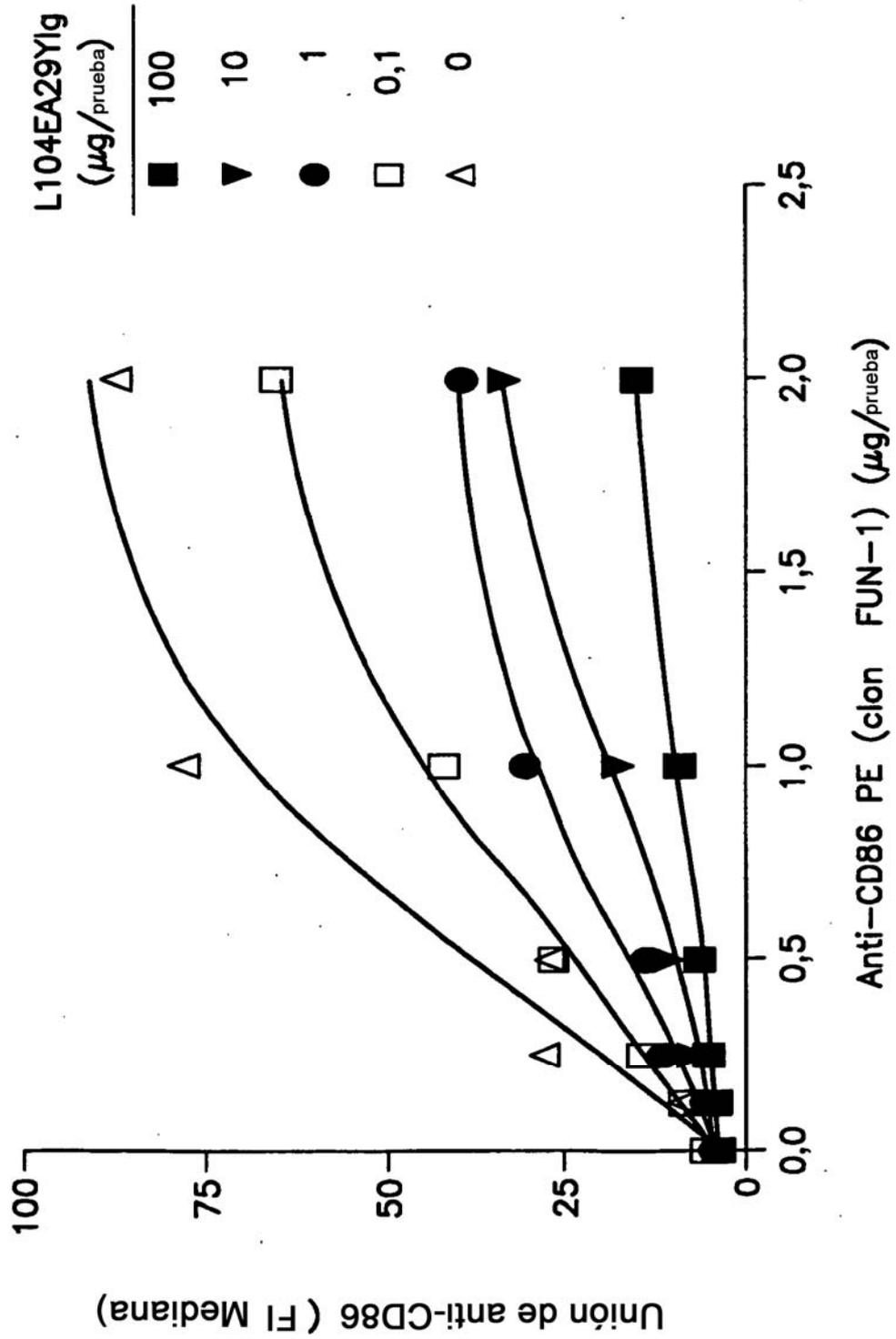
<400> 4

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 195 200 205  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 210 215 220  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 225 230 235 240  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 245 250 255  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 260 265 270  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 275 280 285  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 290 295 300  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 325 330 335  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 340 345 350  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 355 360 365  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 370 375 380

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de ensayo *in vivo* o *in vitro* para monitorizar la eficiencia de unión de L104EA29Ylg a receptor CD86 en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una muestra de sangre de un paciente dosificado con L104EA29Ylg, incluyendo la muestra de sangre células leucocitos;
- (b) añadir CD14-FITC a la muestra de sangre;
- (c) añadir anticuerpos anti-receptores competitivos y no competitivos marcados a la muestra de sangre;
- (d) lisar la muestra de sangre y fijar leucocitos;
- (e) aislar leucocitos de la muestra de sangre lisada;
- 10 (f) medir la expresión del receptor total y del receptor disponible de las células leucocitarias,
- en el que el anticuerpo antirreceptor no competitivo es 2D4, anticuerpo que es obtenible de la línea celular de hibridoma de *Mus musculus*, célula del bazo: 2D4, depositada con Número de Depósito ATCC PITA-7305.
2. El ensayo de la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente detectar la presencia de anticuerpos usando citometría de flujo.
- 15 3. El ensayo de la Reivindicación 1, subsiguiente a la etapa (a) y antes de la etapa (b) que comprende adicionalmente la etapa (a ') de bloqueo de la unión no específica mediada por receptor de Fc.
4. El ensayo de la Reivindicación 3, en el que la unión no específica mediada por receptor de Fc está bloqueada por la adición de IgG de ratón mezclada a la muestra de sangre.
- 20 5. El ensayo de la Reivindicación 1, en el que la eficiencia de unión de L104EA29Ylg se mide comparando receptores unidos y no unidos para determinar el porcentaje de saturación de receptor por L104EA29Ylg.
6. El ensayo de la Reivindicación 1, que comprende las etapas de
- (a) proporcionar una muestra de sangre de un paciente dosificado con L104EA29Ylg;
- (a ') añadir una mezcla de IgG de ratón a alícuotas de la muestra de sangre;
- (b) añadir anti-CD14 humano-FITC a las alícuotas;
- 25 (c) añadir anticuerpos de receptor competitivos y no competitivos para separar alícuotas de la muestra de sangre;
- (c ') añadir anticuerpo monoclonal anti-receptor CD86 humano no marcado en exceso a un subgrupo de muestras relevantes;
- (d) lisar las alícuotas de muestra de sangre y fijar leucocitos;
- (e) aislar los leucocitos de las alícuotas de muestra de sangre lisada;
- 30 (f) medir la expresión de receptor total y de receptor disponible de las células leucocitarias,
- en las que el anticuerpo anti-receptor no competitivo es 2D4, anticuerpo que es obtenible a partir de línea celular de hibridoma *Mus musculus*, célula del bazo: 2D4, depositada con el Número de Depósito en ATCC PTA-7305.
7. Un anticuerpo 2D4, obtenible a partir de línea celular de hibridoma de *Mus musculus*, célula del bazo: 2D4, depositada con el Número de Depósito en ATCC PTA-7305.
- 35 8. Una línea celular de hibridoma de *Mus musculus*, célula del bazo: 2D4, depositada con Número de Depósito en ATCC PTA-7305, que produce el anticuerpo 2D4.



**FIG. 1**

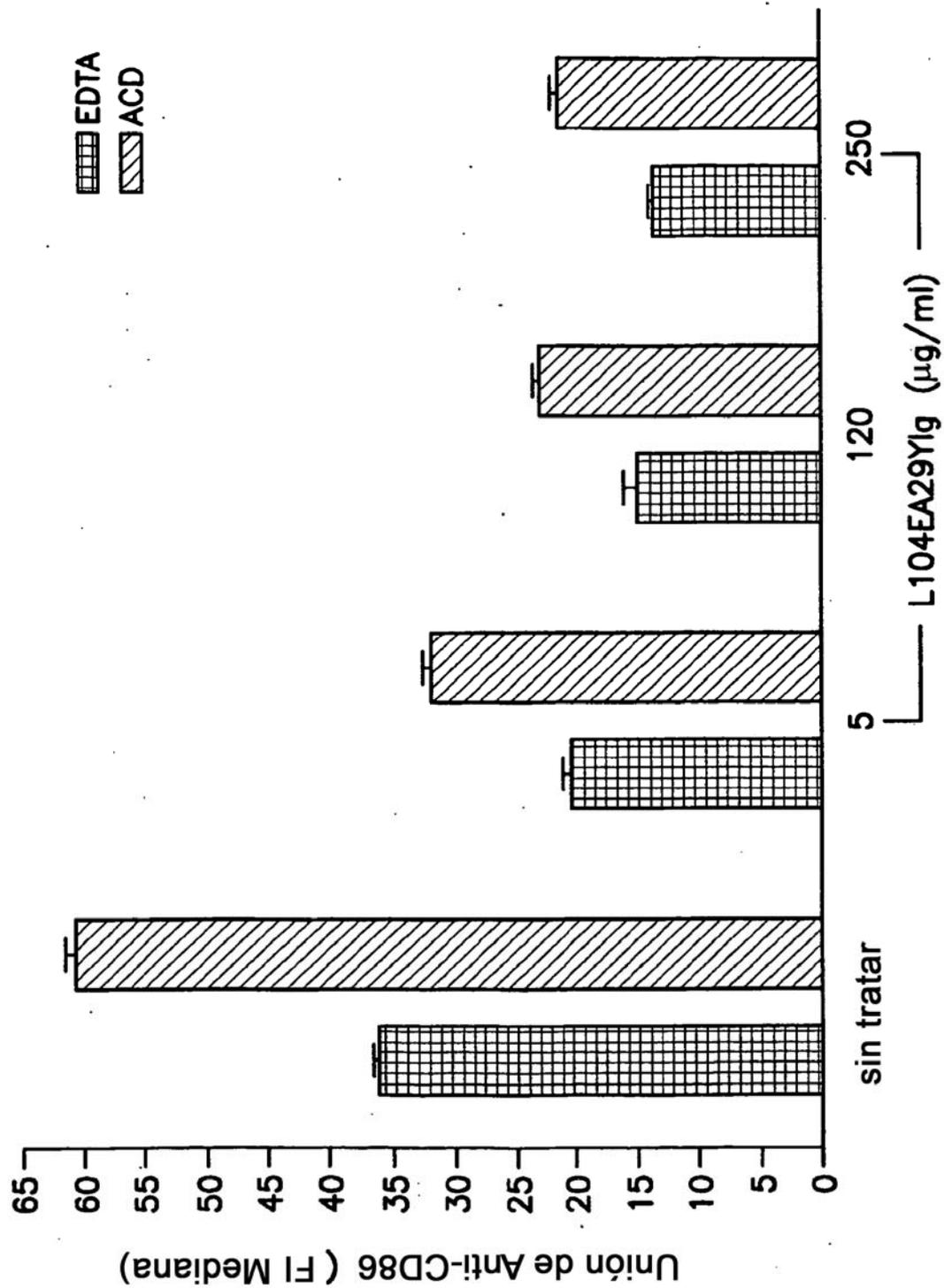
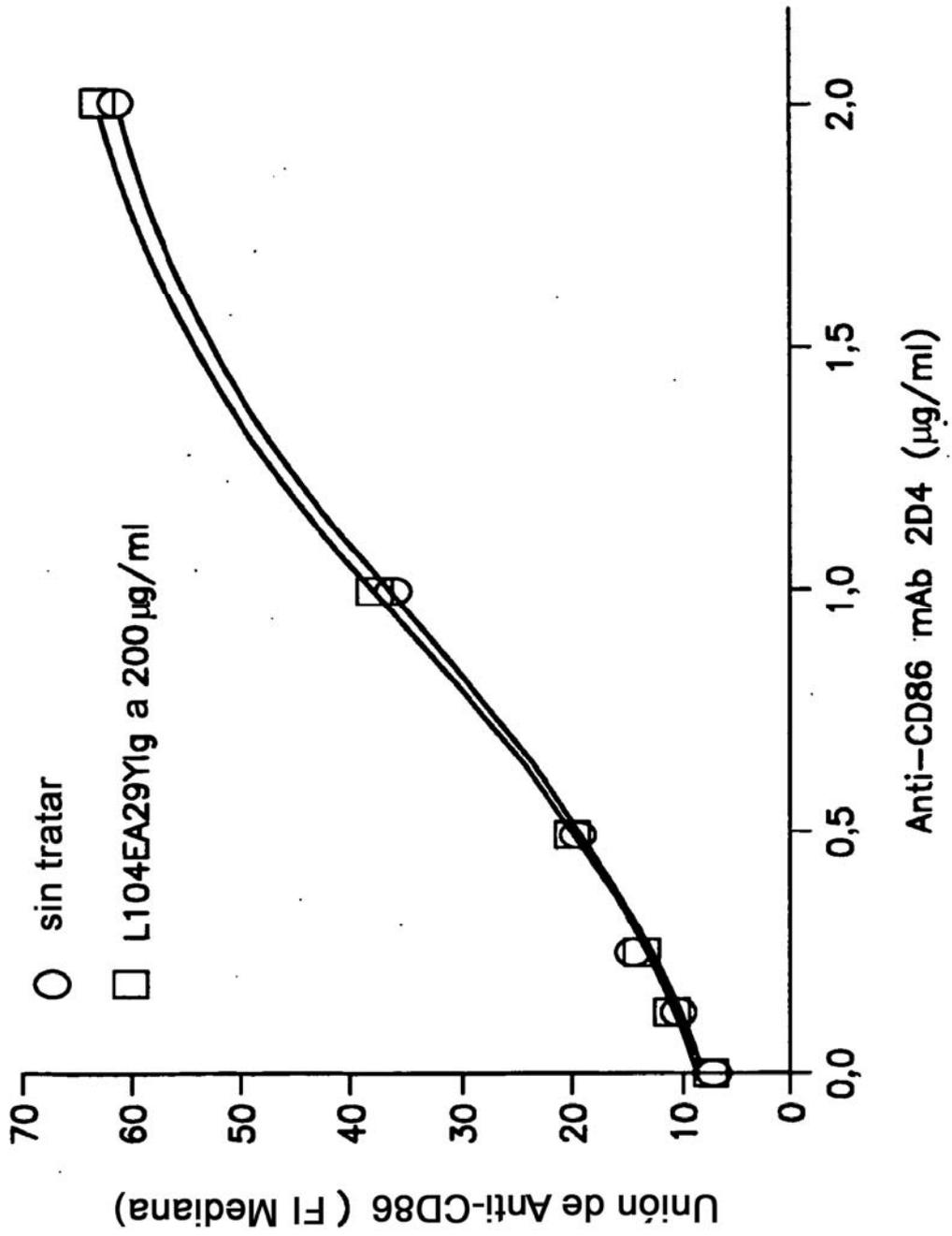


FIG. 2A



**FIG. 2B**



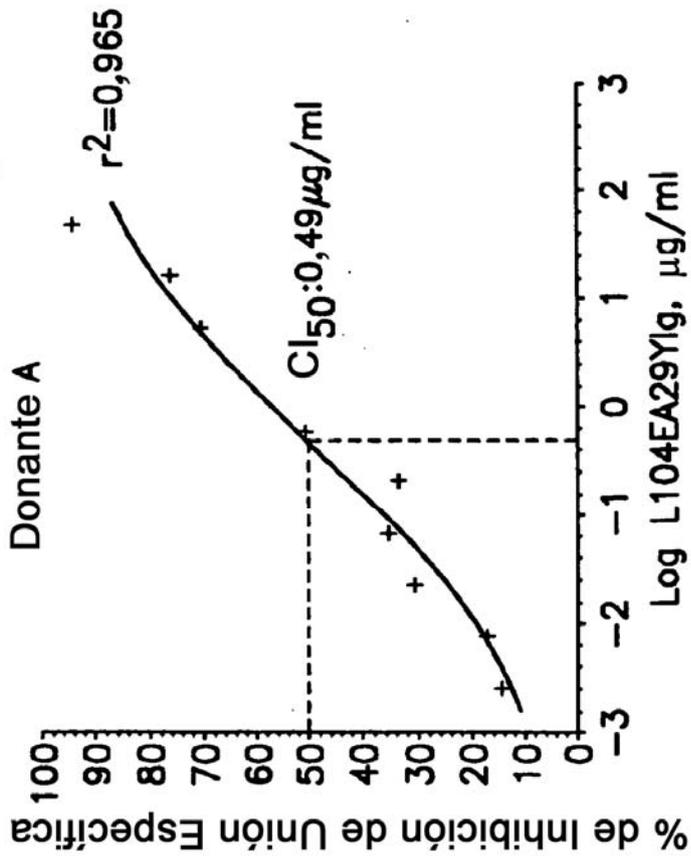


ATGGGTGTA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCAGTCTTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

FIG. 4

Competición de Receptor CD86 Ex Vivo en Sangre Completa de NHV  
(L104EA29Ylg) CI50

CD86 (FUN1) PE, 5 µg/ml



CD86 (HA5) PE, 1,25 µg/ml

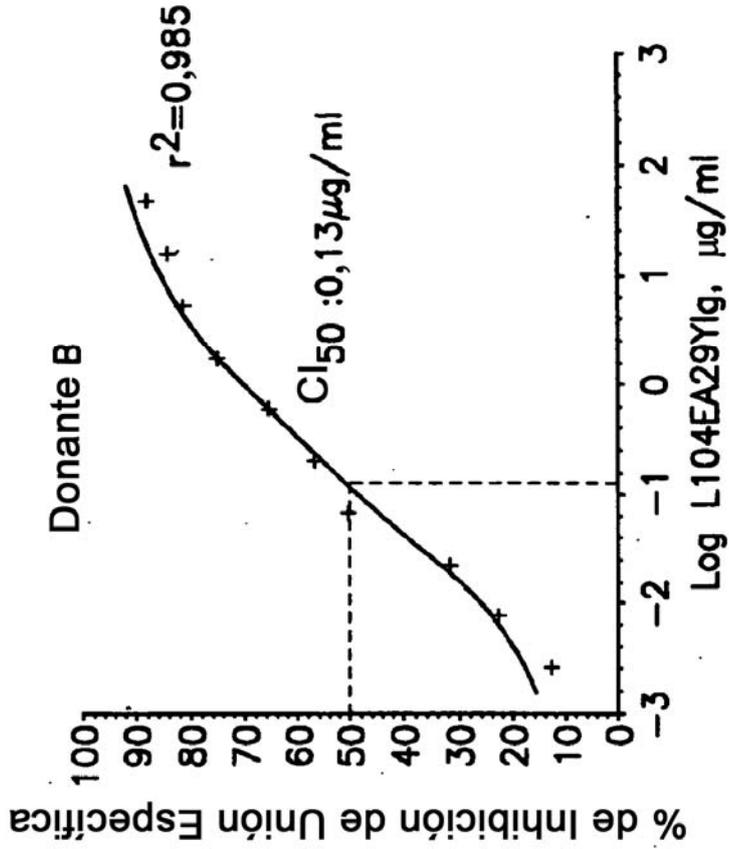


FIG. 5

Caracterización de Competición en Sangre Completa de NHV  
Después de Exposición a L104EA29Ylg Ex Vivo

mAB FUN1 Anti-CD86 (5µg/ml)

N.º de Donante	BKGD MFI/NS	MFI TOTAL	ΔMFI/ESPECÍFICA	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	%INHIB <sup>a</sup> 2µg/ml	%INHIB <sup>a</sup> 5µg/ml
059	25	64	39	0,49	63	70
190	22	70	48	2,05	50	62
078	26	49	23	0,84	65	79
126	31	56	25	0,17	86	93
122	25	75	50	0,07	83	88
194	21	45	24	1,49	54	66
<b>Media</b>	<b>25</b>	<b>60</b>	<b>35</b>	<b>0,85</b>	<b>67</b>	<b>76</b>
Desviación estándar	3,5	11,9	12,5	0,78	14,8	12,4
INTERVALO	21-31	45-70	23-48	0,07-2,05	50-86	62-93

● Potencia de L104EA29Ylg en una MLR in vitro: CI<sub>50</sub>-0,2µg/ml; CI<sub>90</sub>-3-10µg/ml

**FIG. 6**

Caracterización de Competición en Sangre Completa de NHV  
Después de Exposición a L104EA29Ylg Ex Vivo

mAB Anti-CD86 HA5.2B7 (1,25µg/ml)

N.º de Donante	BKGND MFI /NS	MFI TOTAL	ΔMFI/ ESPECÍFICA	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	%INHIB <sub>a</sub> 2µg/ml	%INHIB <sub>a</sub> 5µg/ml
101	11	51	40	0,13	75	81
173	9	39	30	0,08	77	82
003	11	48	37	0,02	88	92
183	12	44	31	0,09	83	89
122	16	71	55	0,01	91	94
190	13	82	69	0,01	90	93
<b>Media</b>	<b>12</b>	<b>56</b>	<b>44</b>	<b>0,06</b>	<b>84</b>	<b>89</b>
Desviación estándar	2,4	16,9	15,3	0,05	6,8	5,7
INTERVALO	9-16	39-82	30-69	0,01-0,13	75-91	81-94

• Potencia de L104EA29Ylg en una MLR *in vitro*: CI<sub>50</sub>-0,2µg/ml; CI<sub>90</sub>-3-10µg/ml

**FIG. 7**

Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Muestras Clínicas de Sangre Completa (SC-NHV)

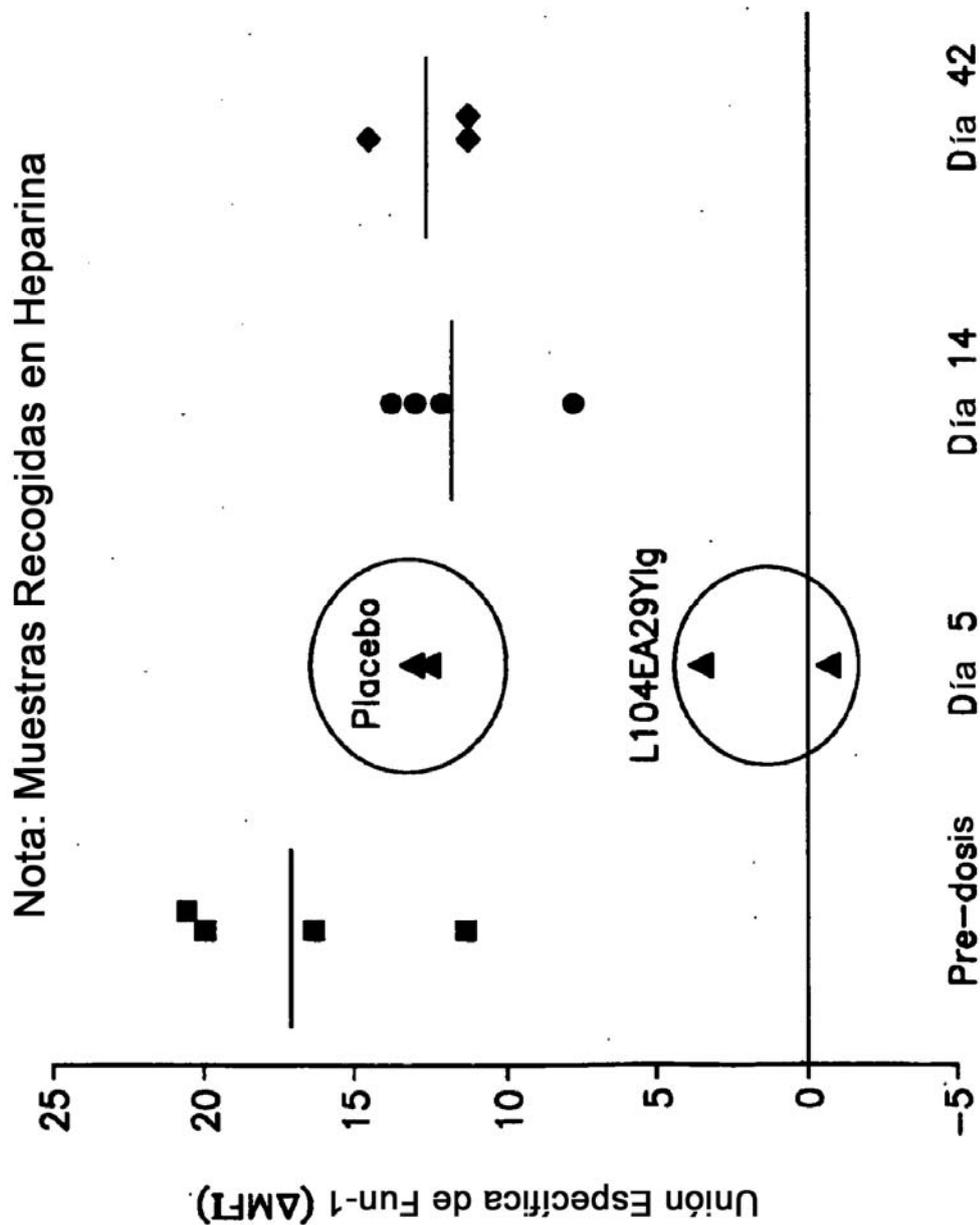


FIG. 8

Ensayo de Competición de Receptor CD86  
Correlación PK/PD

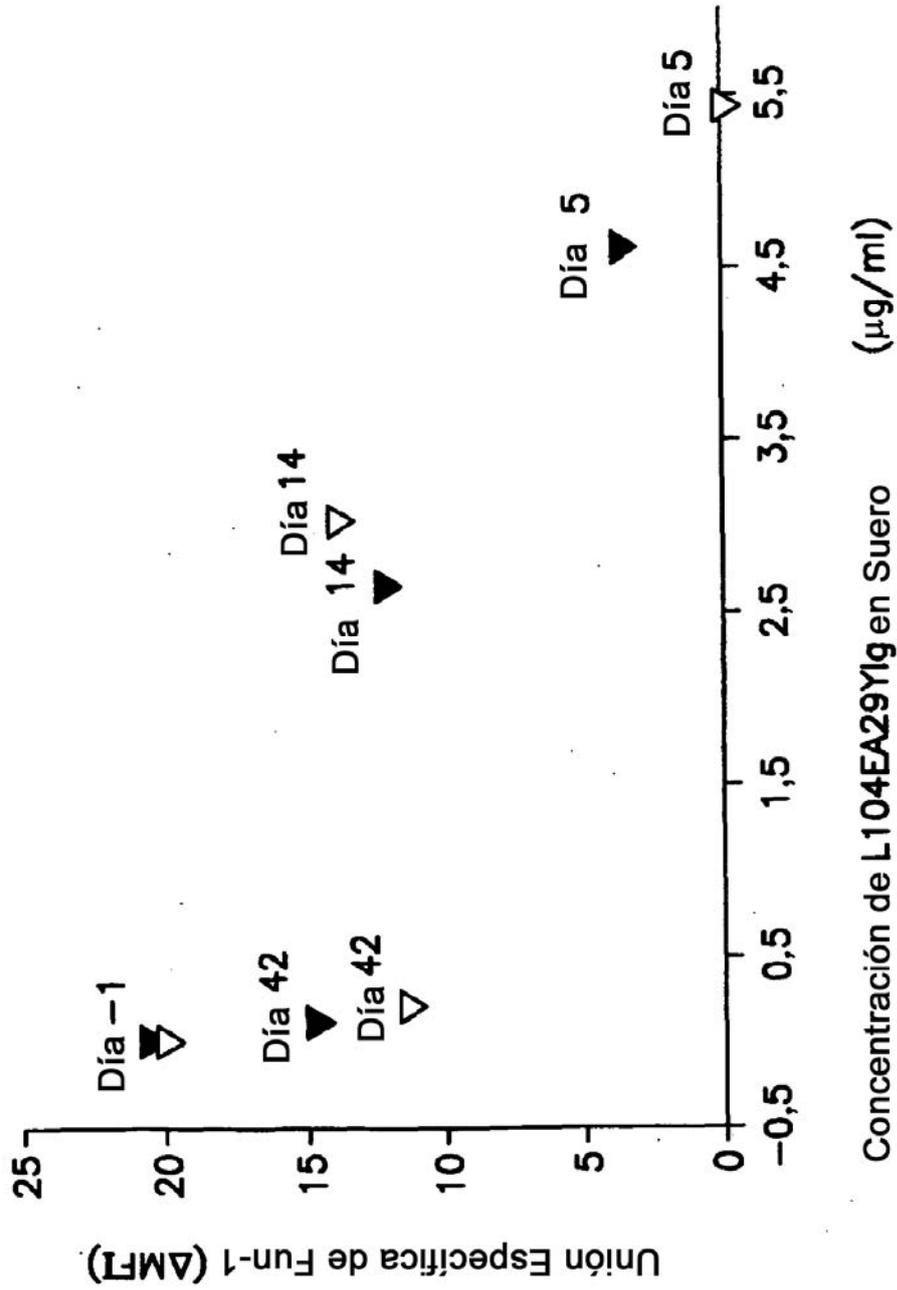


FIG. 9

Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Sangre Completa  
Comparación de Unión Específica de mAb en NHV

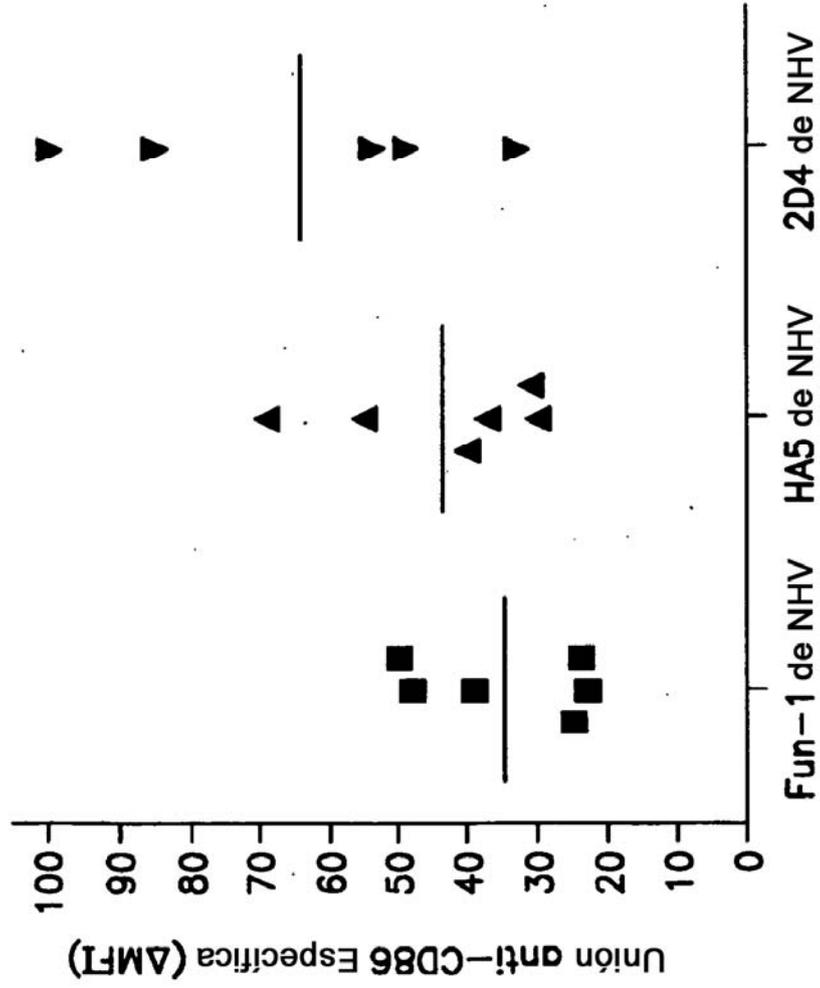


FIG. 10

Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Sangre Completa  
Evaluación de Muestras Clínicas

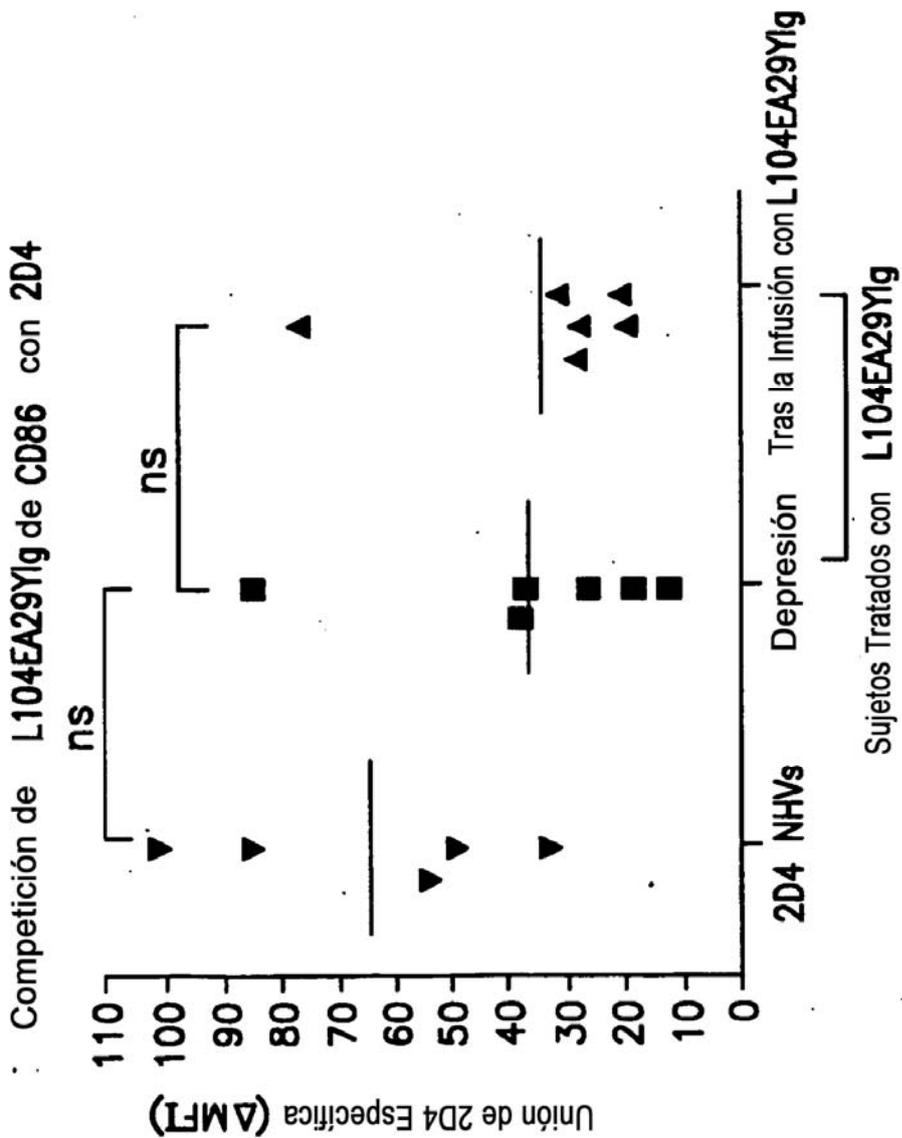
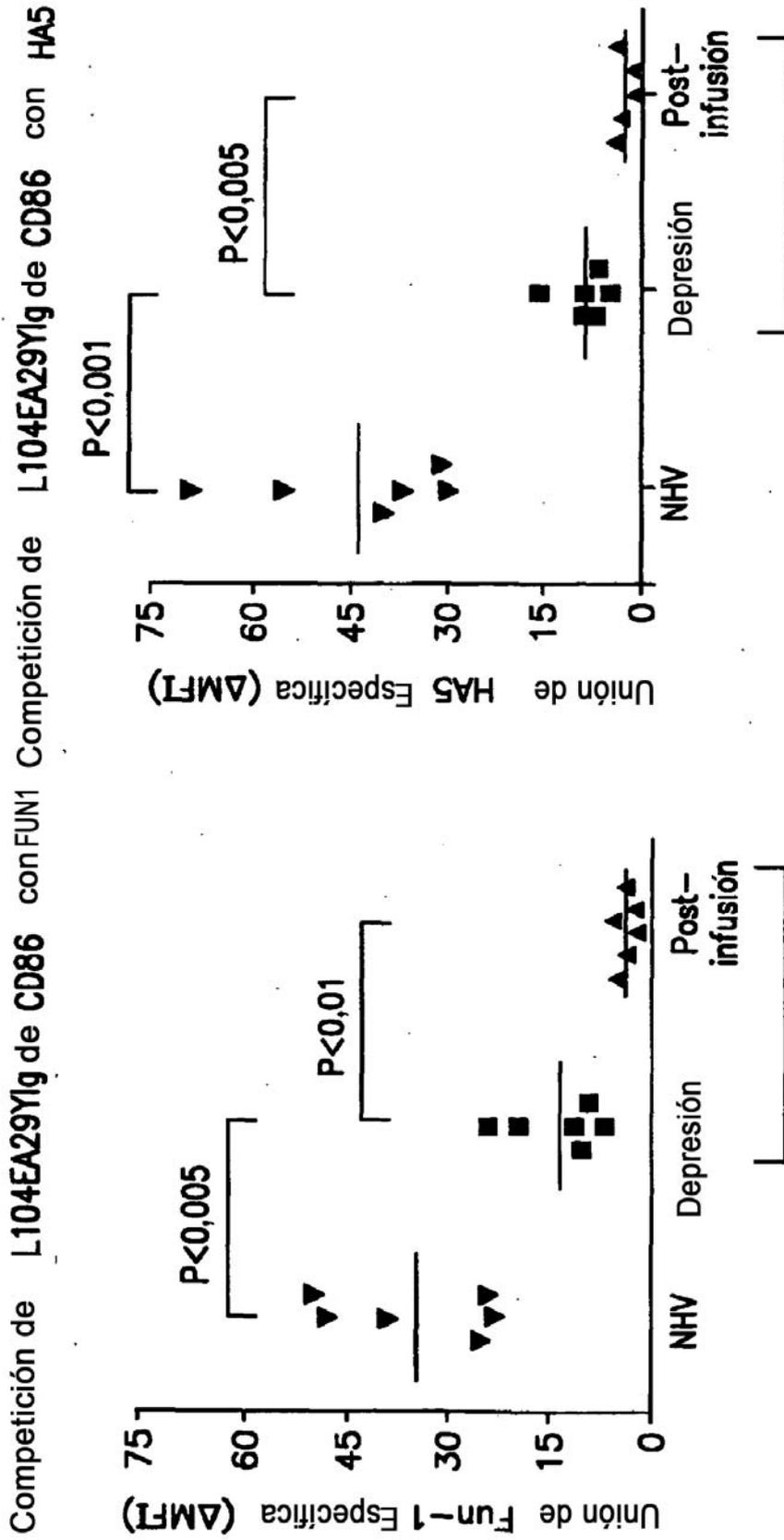


FIG. 11

Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Sangre Completa  
Evaluación de Muestras Clínicas

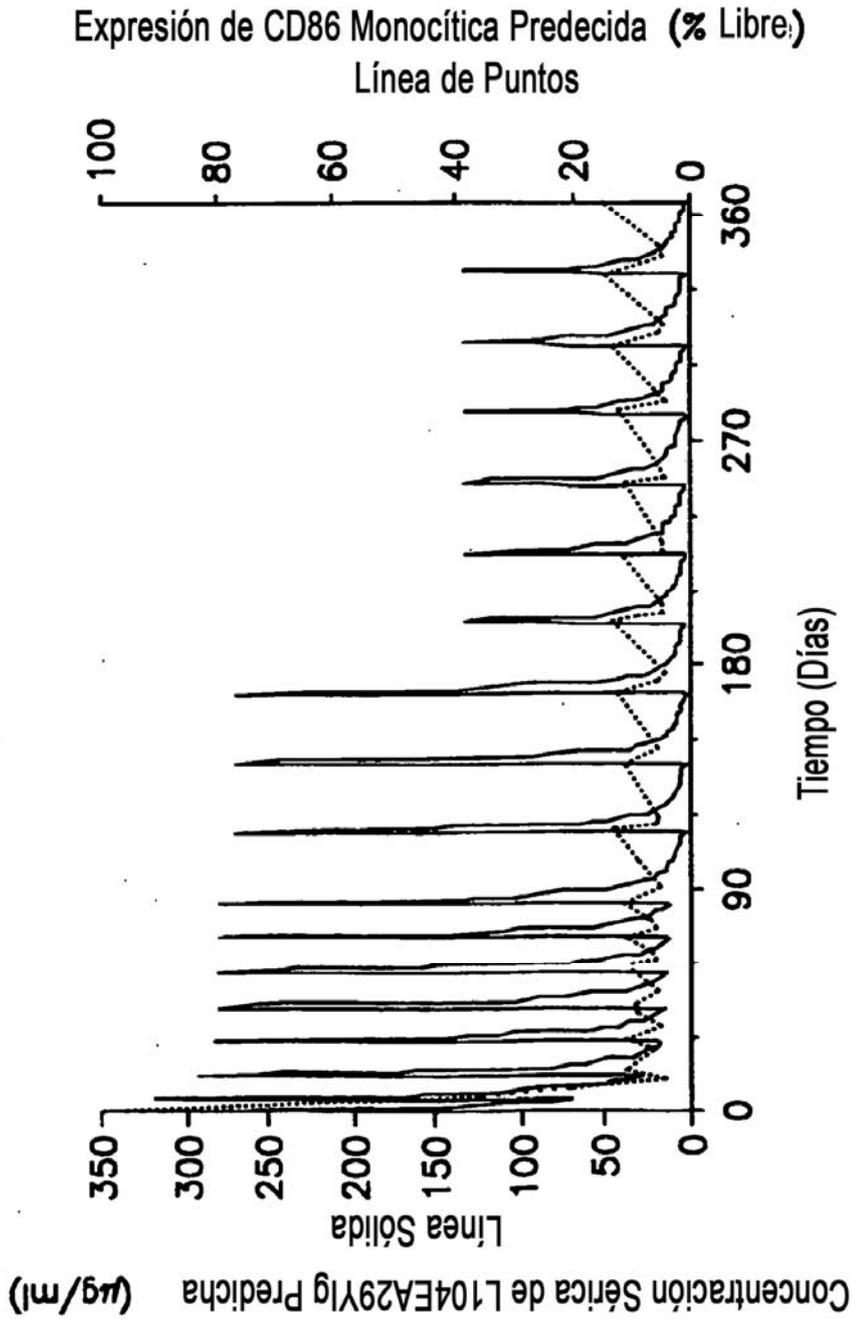


Sujetos Tratados con L104EA29Y1g

Sujetos Tratados con L104EA29Y1g

FIG. 12

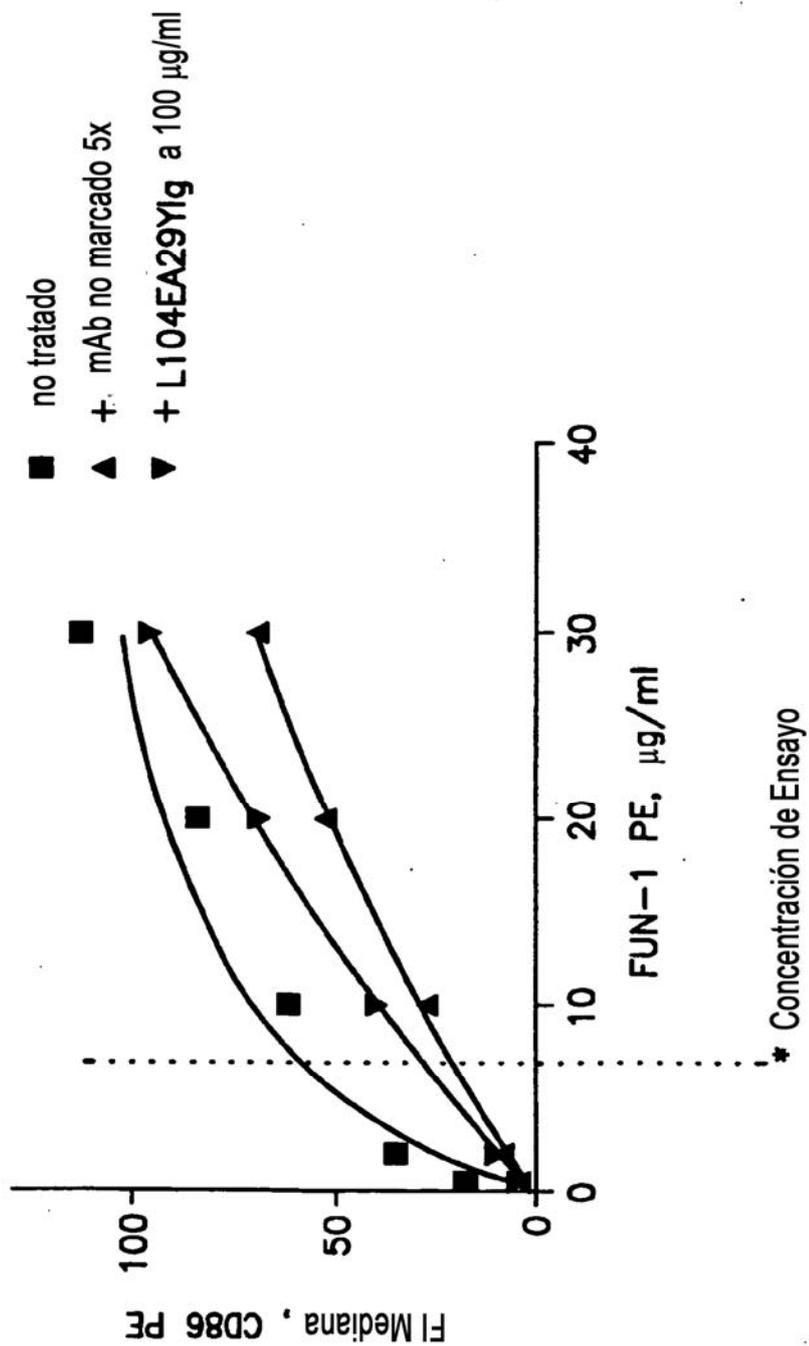
Perfiles de PK y de PD Cínicos Simulados



- El ensayo de RC de CD86 podría usarse para demostrar que el objetivo llega a saturarse después de la exposición inicial y permanece adecuadamente saturado a lo largo del tiempo y con cambios en la dosis.

**FIG. 13**

**Titration of Anti-CD86 PE (Clone FUN1)  
Effects on L104EA29Ylg Binding**



**FIG. 14**

Valoración de Anti-CD86 PE (Clon HA5.2B7)  
Efectos en unión de L104EA29Ylg

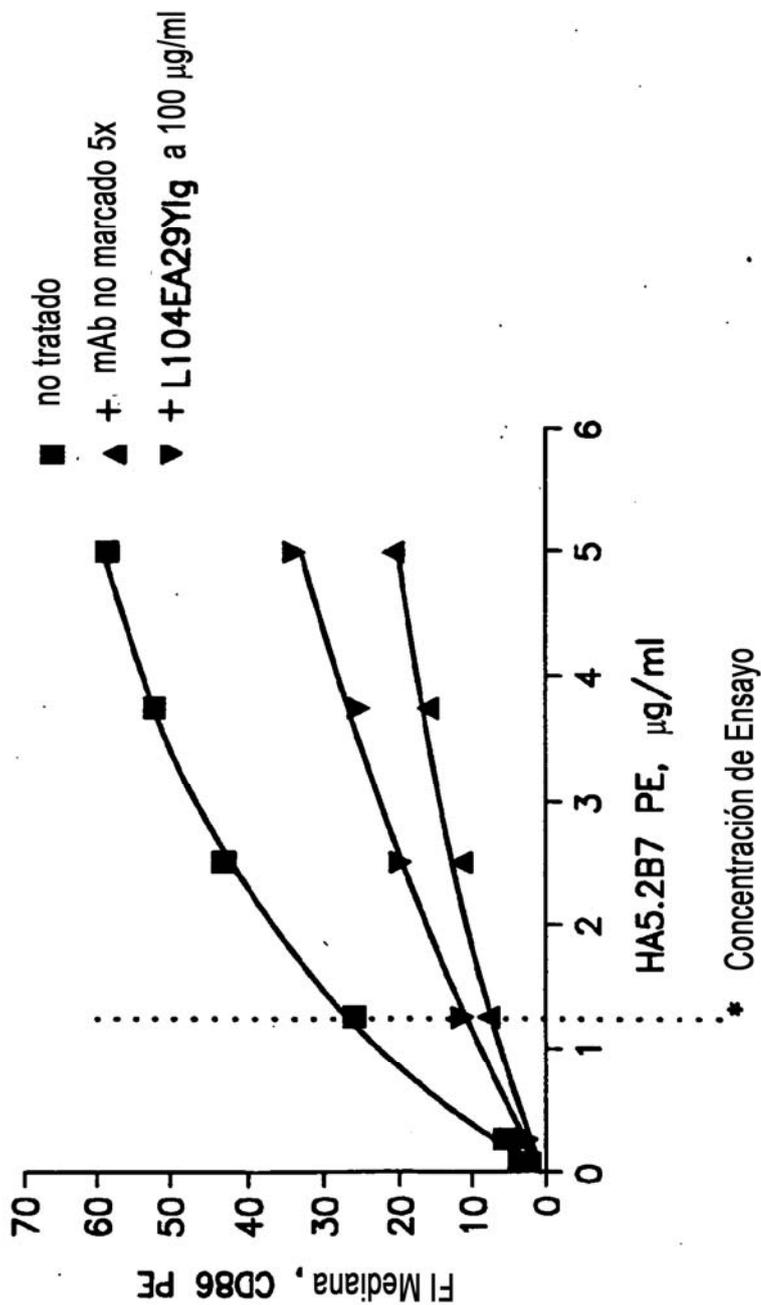


FIG. 15

Valoración de Anti-CD86 PE (Clon 2D4)

Efectos en unión de L104EA29Ylg

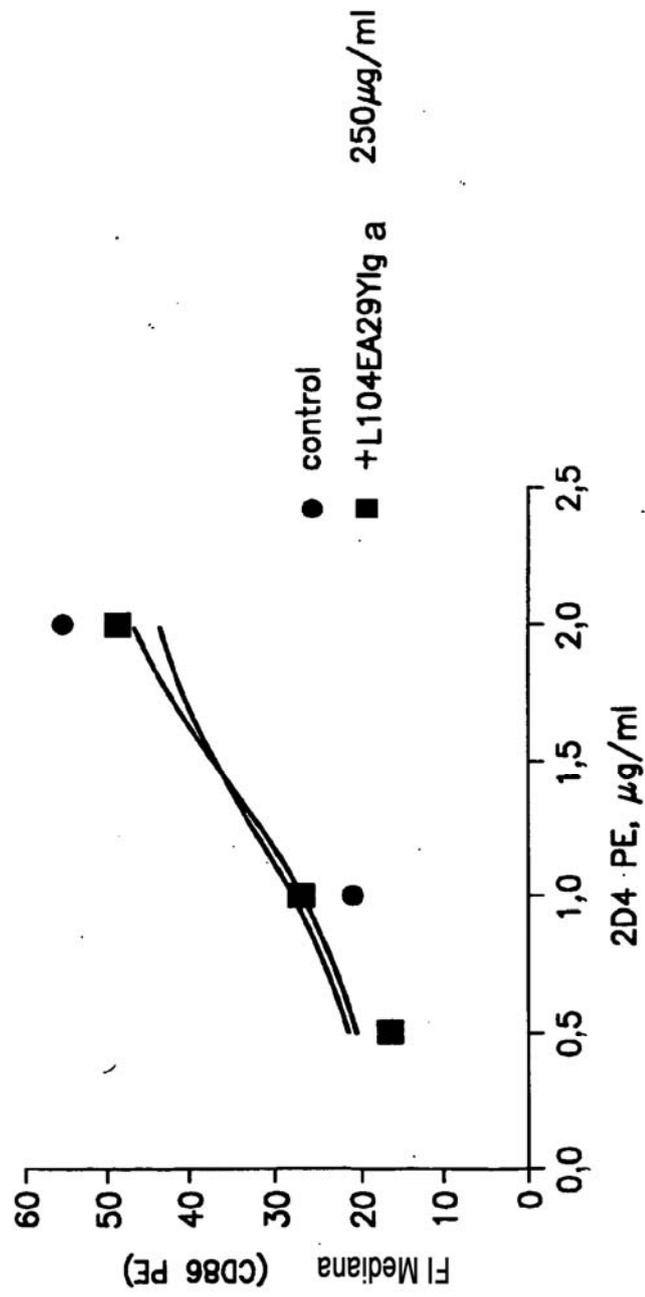
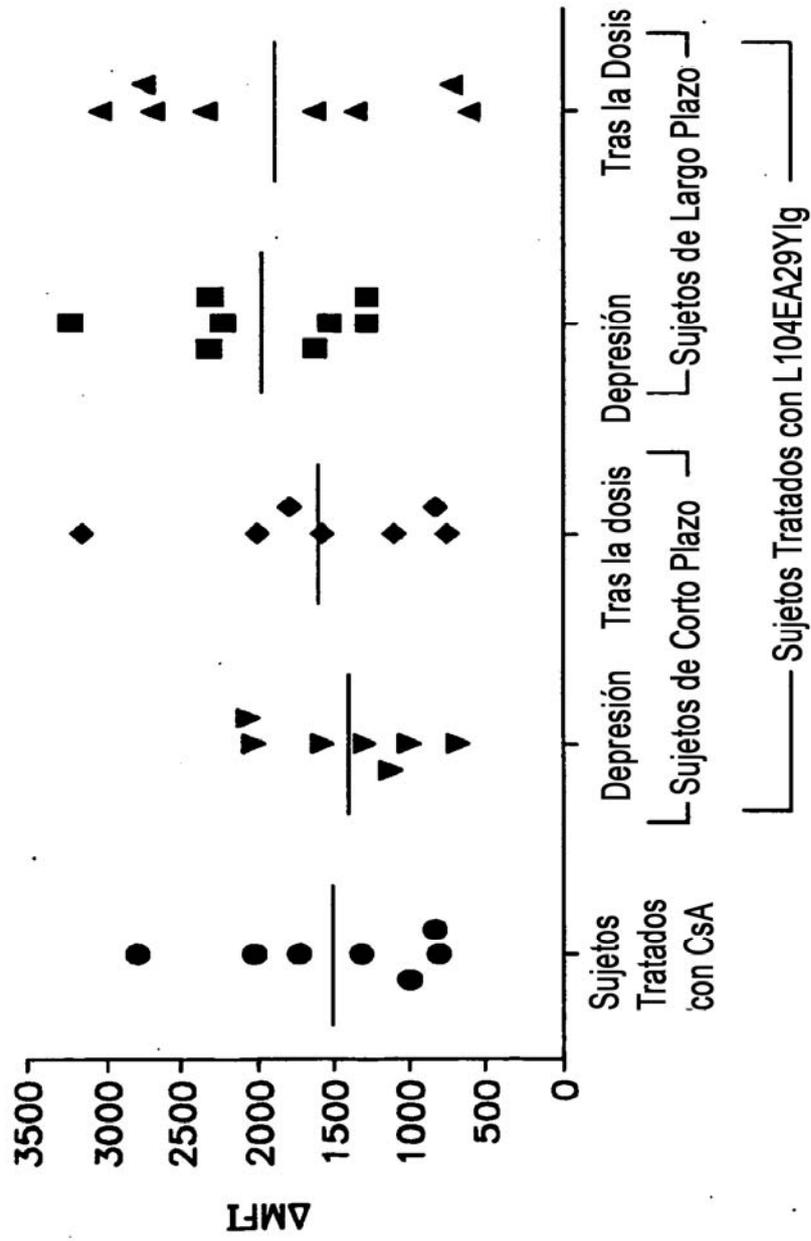


FIG. 16

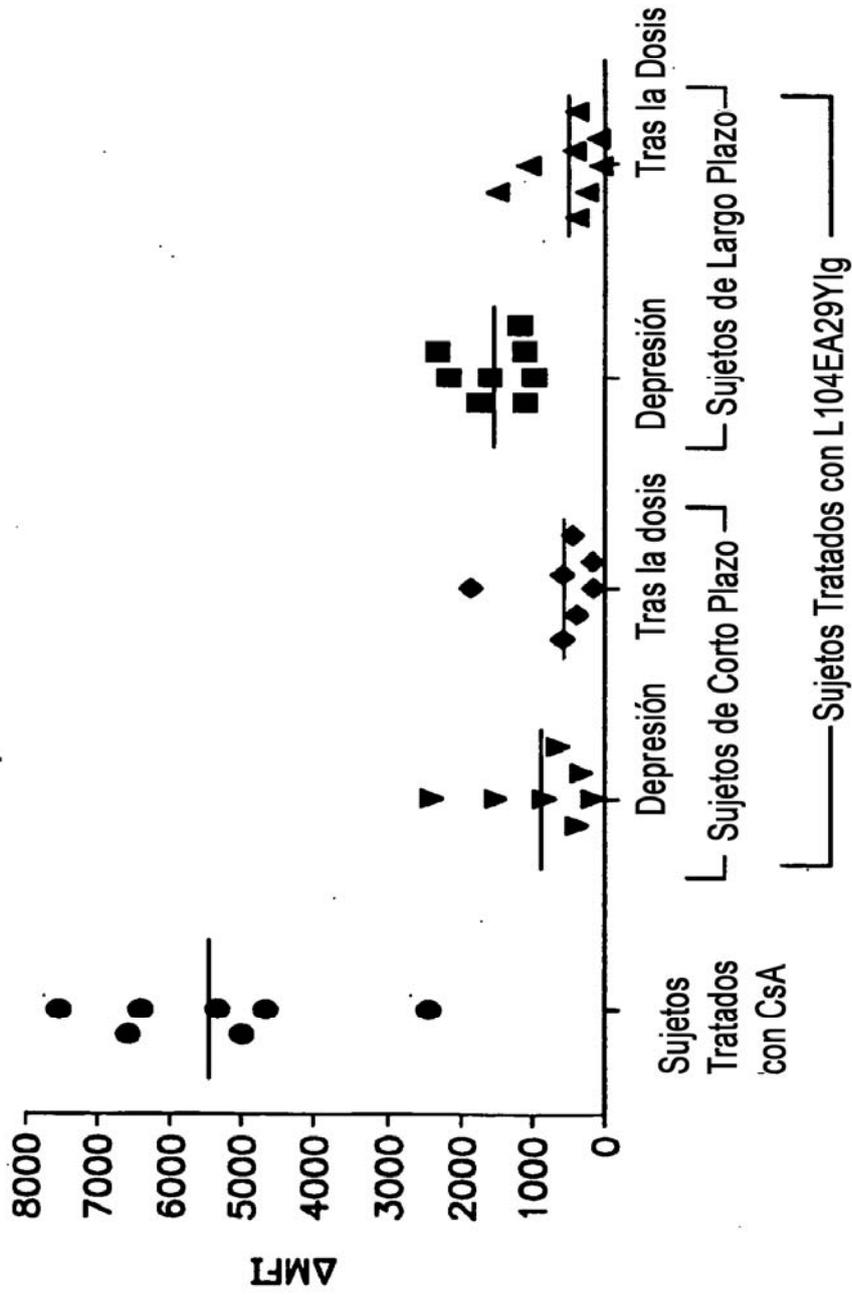
Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Pacientes de Trasplante:  
Unión Específica de 2D4 PE



Largo plazo L104EA29Ylg > 6mos.  
Corto plazo L104EA29Ylg < 6mos.

FIG. 17

Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Pacientes de Trasplante:  
Unión Específica de HA5 PE



Largo plazo L104EA29Ylg > 6mos.  
Corto plazo L104EA29Ylg < 6mos.

FIG. 18

Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Sangre Completa

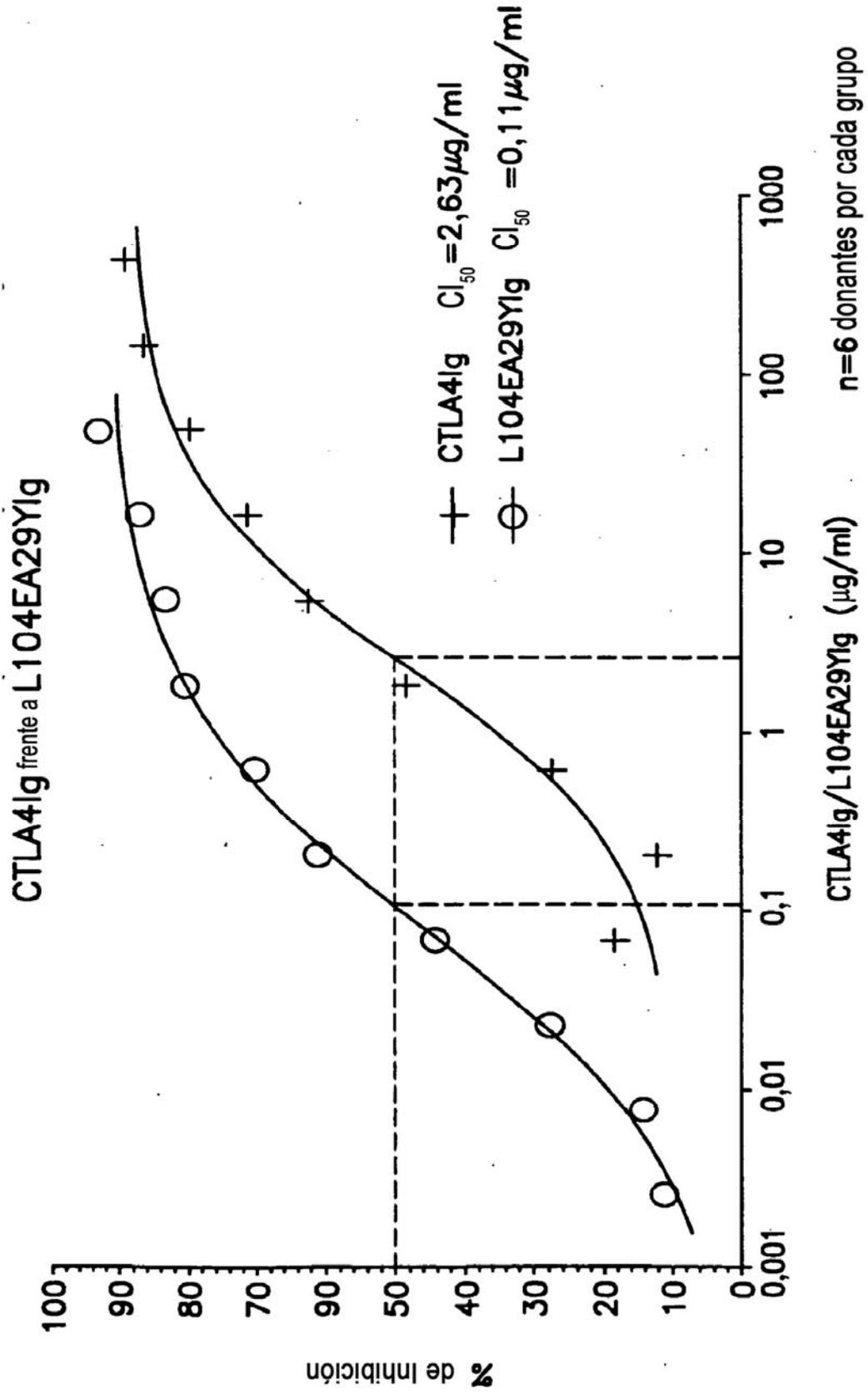


FIG. 19

Ensayo de Competición de Receptor CD86 en Sangre Completa

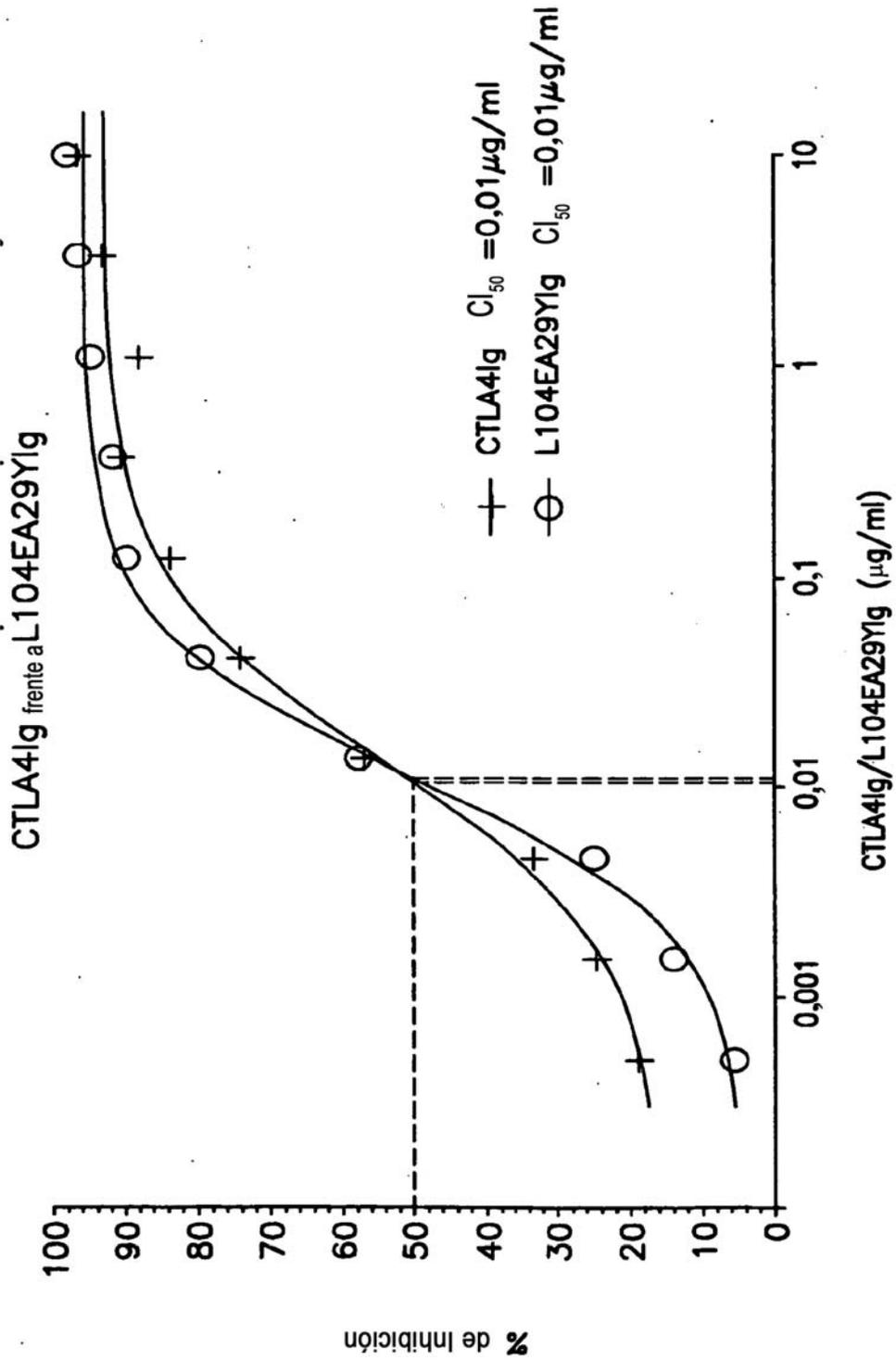


FIG. 20

Saturación de Receptor e Inhibición de Alo-respuesta

+	CTLA4Ig MLR	▽	L104EA29Y1g MLR
▽	CTLA4Ig CD86 RC	◇	L104EA29Y1g CD86 RC
○	CTLA4Ig CD80 RC	□	L104EA29Y1g CD80 RC

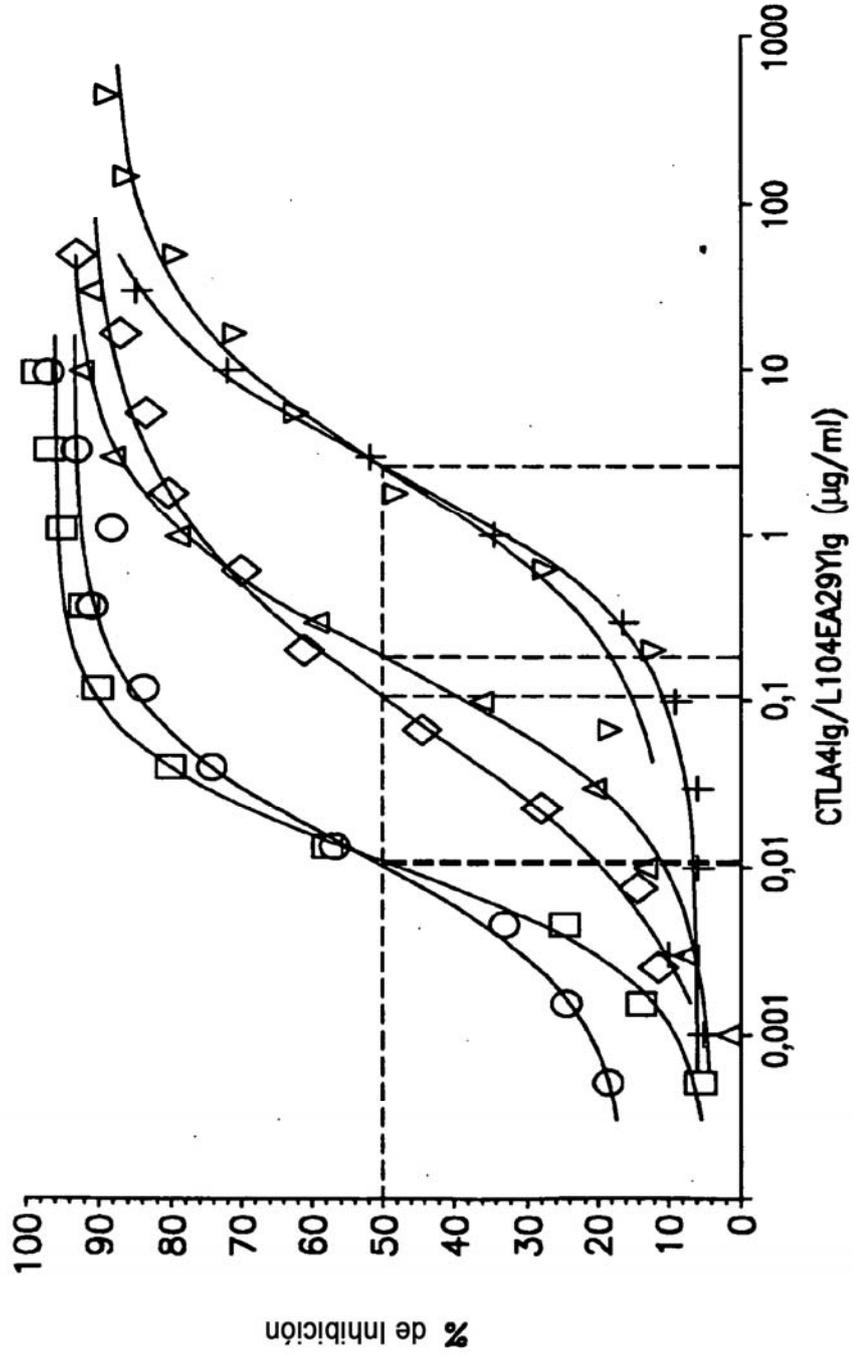


FIG. 21