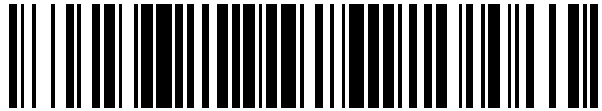


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 088**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2008 E 08844441 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 2222697**

54 Título: **Polipéptidos y ácidos nucleicos inmunosupresores**

30 Prioridad:

01.11.2007 US 984631 P
07.05.2008 US 51215 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2013

73 Titular/es:

PERSEID THERAPEUTICS LLC (100.0%)
515 GALVESTON DRIVE
REDWOOD CITY CA 94063, US

72 Inventor/es:

KARRER, ERIK, E.;
PAIDHUNGAT, MADAN, M.;
BASS, STEVEN, H.;
NEIGHBORS, MARGARET;
PUNNONEN, JUHA;
CHAPIN, STEVEN, J.;
VISWANATHAN, SRIDHAR y
LARSEN, BRENT, R.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 088 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

Polipéptidos y ácidos nucleicos inmunosupresores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a polipéptidos novedosos que se unen a CD80 y/o CD86, a ácido nucleico que codifica tales polipéptidos y, a procedimientos de preparación y, a uso de tales polipéptidos y ácidos nucleicos.

Antecedentes de la invención

10 Los linfocitos T desempeñan una función importante en la iniciación y regulación de respuestas inmunitarias. Para que se produzca la activación completa de linfocitos T se requieren al menos dos acontecimientos de señalización distintos. Una primera señal se produce por la interacción de receptores de linfocitos T (TCR) expresados sobre linfocitos T con antígenos específicos (Ag) presentados en el contexto de moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) expresadas sobre células presentadoras de antígeno (APC). Una segunda señal (co-estimulación) resulta de la interacción entre ligandos co-estimuladores expresados sobre APC y sus receptores correspondientes expresados sobre linfocitos T. Una ruta de co-estimulación dominante implica la interacción entre
15 los ligandos CD80 (B7-1 o B7.1) y CD86 (B7-2 o B7.2) expresados sobre APC con CD28 y CTLA-4 (también conocidos como CD152) expresados principalmente sobre linfocitos T. CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) y CD28 sirven de receptores para los ligandos CD80 y CD86.

20 La señalización positiva está mediada por el receptor CD28. La unión del (de los) ligando(s) CD80 y/o CD86 a CD28 reduce el umbral de activación de linfocitos T promoviendo la formación de sinapsis inmunológicas (Viola A. y col., Science 283:680-682 (1999)). Adicionalmente, la co-estimulación de CD28 activa o potencia la producción de factores fundamentales para la proliferación y supervivencia de linfocitos T tal como interleucina-2 (IL-2), NF-κB y Bcl-XL (Norton S. D. y col., J. Immunol. 149:1556-1561 (1992); Vella A. T. y col., J. Immunol. 158: 4714-4720 (1997)). *In vivo*, ratones deficientes en CD28 están gravemente inmunodeprimidos y muestran escasas respuestas de linfocitos T específicas para antígeno (Green, J. M. y col., Immunity 1:501-508 (1994)). La alergia o tolerancia a linfocitos T puede producirse cuando los linfocitos T se activan en ausencia de la señal co-estimulante.

30 La señalización negativa está mediada por el receptor de CTLA-4. Cada uno de los ligandos CD80 y CD86 se unen con alta avidéz a CTLA-4 y compensan respuestas inmunoproliferativas derivadas de la señalización de CD28. Posibles mecanismos de señalización de CTLA-4 incluyen la unión competitiva de moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 (Masteller, E. M. y col., J. Immunol. 164:5319 (2000)), inhibición de la señalización de TCR por inducción de fosfatasa para la inmunosinapsis (Lee K. M. y col., Science 282:2263 (1998)) e interrupción de las sinapsis inmunológicas (Pentcheva-Hoang T. y col., Immunity 21:401 (2004); Chikuma S. y col., J. Exp. Med 197:129 (2003); Schneider H. y col., Science 313: 1972 (2006)). *In vivo*, ratones deficientes en CTLA-4 muestran fenotipos autoinmunitarios profundos caracterizados por infiltración masiva de tejido y destrucción de órganos (Waterhouse P. y col., Science 270:985 (1995)).

35 Agentes terapéuticos diseñados para antagonizar la ruta de co-estimulación de CD80/CD86, tales como CTLA-4 humano-Ig soluble, son prometedores para el tratamiento de enfermedades y trastornos autoinmunitarios. La presente invención proporciona moléculas ventajosas que tienen capacidades mejoradas para modular o suprimir la señalización por la ruta de co-estimulación de CD80/CD86 y procedimientos de uso de tales moléculas para la manipulación seleccionada y diferencial de respuestas de linfocitos T. Tales moléculas son de uso beneficioso en
40 una variedad de aplicaciones que se tratan en detalle más adelante.

Resumen de la invención

45 La invención proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de SEC ID N°: 36 en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en SEC ID N°: 36, en el que el polipéptido se une a CD80 humano o CD86 humano o un dominio extracelular de cualquiera de ellos y tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria que es mayor que la capacidad de un polipéptido LEA29Y que comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168 para inhibir una respuesta inmunitaria.

50 La invención también proporciona un dímero de polipéptidos aislado o recombinante que comprende dos polipéptidos de la invención, en el que el dímero tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria que un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168.

55 La invención también proporciona un polipéptido de la invención, que es una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de SEC ID N°: 36 en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones

correspondientes en SEC ID N°: 36 y (b) un segundo polipéptido, en el que el segundo polipéptido es un polipéptido del Fc de Ig, en el que la proteína de fusión tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria que una proteína de fusión LEA29Y-Ig, en el que la proteína de fusión LEA29Y-Ig comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 166.

- 5 La invención también proporciona un dímero de polipéptidos de la invención, que es un dímero de proteínas de fusión aisladas o recombinantes que comprende dos proteínas de fusión monoméricas ligadas por al menos un enlace disulfuro formado entre dos residuos de cisteína presentes en cada proteína de fusión mutante monomérica, en el que cada proteína de fusión monomérica comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de SEC ID N°: 36 en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en SEC ID N°: 36 y (b) un polipéptido del Fc de Ig, y en el que el dímero de proteínas de fusión tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria que un dímero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig, en el que el dímero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig comprende dos proteínas de fusión LEA29Y-Ig monoméricas comprendiendo cada una la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 166.
- 10
- 15 La invención también proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la invención, un dímero de polipéptidos de la invención, una proteína de fusión de la invención, o un dímero de proteínas de fusión de la invención, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo.

La invención también proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

- 20 La invención también proporciona una célula huésped aislada o recombinante que comprende:
- (a) un polipéptido de la invención;
 - (b) un dímero de polipéptidos de la invención;
 - (c) una proteína de fusión de la invención;
 - (d) un dímero de proteínas de fusión de la invención;
 - 25 (e) un ácido nucleico de la invención; y/o
 - (f) un vector de la invención.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable o vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más de los siguientes:

- 30 (a) un polipéptido de la invención;
- (b) un dímero de polipéptidos de la invención;
- (c) una proteína de fusión de la invención;
- (d) un dímero de proteínas de fusión de la invención;
- (e) un ácido nucleico de la invención;
- (f) un vector de la invención; y/o
- 35 (g) una célula huésped de la invención.

La invención también proporciona un polipéptido de la invención, un dímero de polipéptidos de la invención, una proteína de fusión de la invención, un dímero de proteínas de fusión de la invención, un ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula de la invención para su uso en:

- 40 (i) un tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero;
- (ii) el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario; o
- (iii) el tratamiento de rechazo de trasplante de tejido u órgano en un mamífero.

La invención también proporciona el uso de un polipéptido de la invención, un dímero de polipéptidos de la invención, una proteína de fusión de la invención, un dímero de proteínas de fusión de la invención, un ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula de la invención para la fabricación de un medicamento para:

- 45 (i) un tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero;
- (ii) el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario; o
- (iii) el tratamiento de rechazo de trasplante de tejido u órgano en un mamífero.

- 50 La invención también proporciona un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende cultivar una célula huésped de la invención en un medio de cultivo y recuperar el polipéptido expresado por la célula.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama esquemático del vector de expresión de plásmidos CTLA-4-Ig mutante de pcDNA que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante. En la Figura 1, cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante

fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG2 humana (hIgG2).

Las Figuras 2A-2D son diagramas esquemáticos de proteínas de fusión hCD80-Ig, hCD86-Ig, LEA29Y-Ig y hCTLA-4-IgG2 a modo de ejemplo, respectivamente. El péptido señal, dominio extracelular (ECD), ligador (si lo hay) y dominio Fc de Ig de cada proteína de fusión se muestran esquemáticamente. También se muestran residuos de aminoácidos presentes en las uniones entre el péptido señal, ECD, ligador (si lo hay) y Fc de Ig. El péptido señal de cada proteína de fusión se escinde normalmente durante el procesamiento y, por tanto, la proteína de fusión (madura) secretada normalmente no contiene la secuencia de péptidos señal. La Figura 2D presenta un diagrama esquemático de una proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2 ("hCTLA-4-IgG2") que comprende un dominio extracelular de CTLA-4 humano ("ECD de hCTLA-4") covalentemente fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido de IgG2 humano. La secuencia de polipéptidos predicha de esta proteína de fusión hCTLA-4-IgG2 se muestra en SEC ID N°: 161 y comprende los siguientes segmentos: péptido señal de hCTLA-4 (residuos de aminoácidos 1-37), polipéptido del ECD de hCTLA-4 (residuos de aminoácidos 38-161) y polipéptido del Fc de IgG2 humana (residuos de aminoácidos 162-389). No se incluye ligador (por ejemplo, ningún residuo de aminoácido) entre el extremo C del polipéptido del ECD de hCTLA-4 y el extremo N del Fc de IgG2 humana. El polipéptido del Fc de IgG2 humana comprende una bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de IgG2 humana. En la Figura 2D se muestran los residuos de aminoácidos en las uniones entre estos diversos segmentos. Específicamente se muestran los cuatro últimos residuos de aminoácidos del péptido señal, los cinco primeros y los cinco últimos residuos de aminoácidos del polipéptido del ECD de hCTLA-4, y los cinco primeros y los cinco últimos residuos de aminoácidos del polipéptido del Fc de IgG2 humana.

El péptido señal se escinde normalmente durante el procesamiento y, por tanto, la proteína de fusión secretada (proteína de fusión madura) de hCTLA-4-IgG2 no contiene normalmente la secuencia de péptidos señal. La secuencia de polipéptidos de la forma madura o secretada de esta proteína de fusión hCTLA-4-IgG2 se muestra en SEC ID N°: 162. La secuencia del polipéptido del ECD de hCTLA-4 comprende los residuos de aminoácidos 1-124 de SEC ID N°: 162 y la secuencia del polipéptido del Fc de IgG2 humana comprende los residuos de aminoácidos 125-352 de SEC ID N°: 162. En otro aspecto, esta proteína de fusión hCTLA-4 Ig madura no incluye el residuo de lisina (K) del extremo C y, por tanto, comprende los residuos de aminoácidos 1-351 de SEC ID N°: 162.

La proteína de fusión madura hCTLA-4-IgG2, que tiene una total de 352 aminoácidos, comprende los residuos de aminoácidos 38-389 de la secuencia de polipéptidos de la proteína hCTLA-4 WT de longitud completa mostrada en SEC ID N°: 160 y empieza con la secuencia de aminoácidos: metionina-histidina-valina-alanina. Si se desea, los aminoácidos de la forma madura pueden enumerarse empezando con la Met de la secuencia de Met-His-Val-Ala, que designa Met como el primer residuo (por ejemplo, el ECD comprende los residuos de aminoácidos numerados 1-124), como en SEC ID N°: 162. Un dímero hCTLA-4-IgG2 maduro es la forma de la proteína de fusión normalmente usada en los ensayos de los ejemplos descritos más adelante, a menos que se establezca de otro modo. Una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión hCTLA-4-IgG2, que comprende ECD de hCTLA-4 fusionado con el polipéptido del Fc de hIgG2, se muestra en SEC ID N°: 163.

La Figura 3 representa análisis de SDS/PAGE de las siguientes proteínas: marcadores de peso molecular de diversa masa (kilodaltons (kDa) (carril 1); una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo basada en el clon D3 (es decir, D3-IgG2) (carril 2); una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo basada en el clon D4 (es decir, D4-IgG2) (carril 3); y la proteína de fusión Orenicia® (abatacept) (carril 4) (Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ).

La Figura 4 presenta un perfil de elución de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo (es decir, D3-IgG2) a partir de análisis de SEC, que demuestra que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes son homogéneas en tamaño cuando se purifican a partir de células COS transitoriamente transfectadas.

La Figura 5 muestra un análisis Biacore™ típico de la unión de las siguientes proteínas de fusión a hCD86-Ig: proteína de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig y D3-IgG2. La fase de disociación del análisis empieza en el momento marcado por la flecha. La proteína de fusión Orenicia®, que está compuesta por el polipéptido del ECD de CTLA-4 humano natural fusionado con un polipéptido del dominio Fc de IgG1 mutante, sirve eficazmente de control de CTLA-4 humano-Ig natural. Una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, tal como D3-IgG2, que tiene una mayor avidez por unirse a CD86-Ig que la proteína de fusión Orenicia® tiene una velocidad más lenta de disociación de CD86-Ig que la proteína Orenicia®.

La Figura 6 es una representación gráfica de los resultados de los ensayos de inhibición de la proliferación de PBMC (con estimulación con anticuerpo dirigido contra CD3) que implican proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo (D3-04-IgG2, D3-11-IgG2, D3-12-IgG2, D3-14-IgG2). Estos ensayos muestran que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes son significativamente más potentes que Orenicia® y LEA29Y-Ig en inhibir la proliferación de linfocitos *T in vitro*.

La Figura 7 es una representación gráfica de los ensayos de inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (con estimulación anti-CD3 y co-estimulación dependiente de hB7.2) que implican un conjunto a modo de ejemplo de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. Las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación.

La Figura 8 es una representación gráfica de ensayos de inhibición de la proliferación de PBMC (con estimulación con antígeno PPD) que implican un conjunto a modo de ejemplo de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. Orenicia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación.

La Figura 9 es una representación gráfica de ensayos de inhibición de la proliferación de la reacción de linfocitos mixtos (MLR) unilateral que implican una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo - D3-IgG2. Las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación.

La Figura 10 es un diagrama esquemático que muestra la estructura de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo. Se muestran dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas idénticas esquemáticamente, comprendiendo cada una un ECD de CTLA-4 mutante maduro fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG2 humana. Cada polipéptido de IgG2 humana incluye una bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de IgG2. También se muestran residuos de aminoácidos a modo de ejemplo presentes en las uniones entre polipéptidos del ECD y Fc de Ig. Los residuos de aminoácidos en las uniones entre estos componentes pueden diferenciarse dependiendo de la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante y/o secuencia de polipéptidos de Ig. La proteína de fusión dimérica resulta de la formación de al menos un enlace disulfuro entre residuos de cisteína en posiciones análogas en los dos monómeros. Los residuos de cisteína (C) que posiblemente participan en la formación de enlaces disulfuro entre los dos monómeros están marcados con asteriscos. El péptido señal de cada proteína de fusión monomérica se escinde normalmente durante el procesamiento y, por tanto, la proteína de fusión (madura) secretada normalmente no incluye la secuencia de péptidos señal.

La Figura 11 es una representación gráfica de ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ (con estimulación anti-CD3 y co-estimulación dependiente de hB7.2) que implican proteínas de fusión hCTLA-4-IgG2, Orenia® y LEA29Y-Ig.

Las Figuras 12A-12F presentan un alineamiento de la secuencia de polipéptidos del dominio extracelular de CTLA-4 humano natural (designado en la figura "hCTLA4ECD"), la secuencia de polipéptidos del polipéptido LEA29Y (designada en la figura "LEA29YECD") y las secuencias de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutantes a modo de ejemplo. Los nombres de los clones de estos polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutantes se indican a la izquierda. Los residuos de aminoácidos que son idénticos a aquellos en el ECD de CTLA-4 humano natural se indican con un punto (.).

La Figura 13 presenta una matriz BLOSUM62.

Las Figuras 14A-14D muestran alineamientos y puntuaciones de alineamientos a modo de ejemplo determinados por cálculo manual para dos secuencias de aminoácidos.

Las Figuras 15A-15B muestran perfiles farmacocinéticos (PC) para la proteína de fusión Orenia®, CTLA-4 humano-IgG2 y proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes representativas administradas a 1 mg/kg como (A) un único bolo intravenoso (IV) o (B) inyección subcutánea (SC) en ratas.

Descripción detallada

Definiciones

También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es sólo con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que se refiere la invención.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de ácidos nucleicos (por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) en forma tanto mono como bicatenaria. A menos que se limite específicamente, los términos engloban ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares como el ácido nucleico de referencia y se metabolizan de un modo similar a nucleótidos que se producen naturalmente. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular también engloba implícitamente variantes conservativamente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias de nucleótidos complementarias, además de la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer y col., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Cassol y col. (1992); Rossolini y col., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico o polinucleótido se usa indistintamente con ADNc o ARNm codificado por un gen.

El término "gen" se refiere ampliamente a cualquier segmento de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) asociado a una función biológica. Un gen puede incluir una secuencia codificante y/o secuencia reguladora requerida para su expresión. Un gen también puede incluir segmento(s) de ácido nucleico de ADN no expresado que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otra(s) proteína(s) (por ejemplo, región promotora, potenciadora u otra reguladora). Un gen puede obtenerse a partir de una variedad de fuentes, que incluye clonar a partir de una fuente de interés o sintetizar a partir de información de secuencias conocida o predicha, y puede incluir una o más secuencias diseñadas para tener parámetros deseados.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido que se produce naturalmente correspondiente, además de a polímeros de aminoácidos que se producen naturalmente y polímeros de aminoácidos que se producen no naturalmente. Como se usa en el presente documento, los términos engloban cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, que incluyen proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), en las que los residuos de aminoácidos están ligados por enlaces peptídicos covalentes.

La numeración de un polímero de aminoácidos o polímero de ácidos nucleicos dado “se corresponde con” o es “con respecto a” la numeración de un polímero de aminoácidos o polímero de ácidos nucleicos seleccionado cuando la posición de cualquier componente de polímero dado (por ejemplo, aminoácido, nucleótido, también denominado genéricamente “residuo”) se designa por referencia al mismo o una posición equivalente en el polímero de aminoácido o ácido nucleico seleccionado, en vez de por la actual posición numérica del componente en el polímero dado. Por tanto, por ejemplo, la numeración de una posición de aminoácidos dada en una secuencia de polipéptidos dada se corresponde con la misma posición de aminoácidos o equivalente en una secuencia de polipéptidos seleccionada usada como secuencia de referencia.

Una “posición equivalente” (por ejemplo, una “posición de aminoácidos equivalente” o “posición de ácidos nucleicos equivalente” o “posición de residuos equivalente”) se define en el presente documento como una posición (tal como una posición de aminoácidos o posición de ácidos nucleicos o posición de residuos) de una secuencia de polipéptidos de prueba (o polinucleótido de prueba) que se alinea con una posición correspondiente de una secuencia de polipéptidos de referencia (o polinucleótidos de referencia) cuando se alinea (preferentemente se alinea óptimamente) usando un algoritmo de alineamiento como se describe en el presente documento. La posición de aminoácidos equivalente de la secuencia de polipéptidos de prueba no necesita tener el mismo número de posición numérica que la posición correspondiente del polipéptido de prueba. Asimismo, la posición de ácidos nucleicos equivalente de la secuencia de polinucleótidos de prueba no necesita tener la misma posición numérica que la posición correspondiente del polinucleótido de prueba.

Un polipéptido “mutante” comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia en uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido parental o de referencia (tal como, por ejemplo, una secuencia de polipéptidos natural (WT)). En un aspecto, un polipéptido mutante comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido parental o de referencia en de aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% o más del número total de residuos de la secuencia de polipéptidos parental o de referencia. En otro aspecto, un polipéptido mutante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias con la secuencia de polipéptidos de un polipéptido parental o de referencia. En otro aspecto, un polipéptido mutante comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido parental o de referencia en de 1 a 100 o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más residuos de aminoácidos). Un polipéptido mutante puede comprender una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido parental o de referencia por, por ejemplo, la delección, adición o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más residuos de aminoácidos) del polipéptido parental o de referencia, o cualquier combinación de tal(es) delección (delecciones), adición (adiciones) y/o sustitución (sustituciones). El polipéptido de referencia o parental puede por sí mismo un polipéptido mutante.

“Que se produce naturalmente” como se aplica a un objeto significa que el objeto se encuentra en la naturaleza a diferencia de ser producido artificialmente por el hombre. “Que se produce no naturalmente” como se aplica a un objeto significa que el objeto no se produce naturalmente (es decir, que el objeto no puede encontrarse en la naturaleza). Por ejemplo, un polipéptido que no se produce naturalmente se refiere a un polipéptido que ha sido preparado por el hombre tal como, por ejemplo, siendo sintetizado *in vitro* o preparado artificialmente.

Una “subsecuencia” o “fragmento” de una secuencia de interés es cualquier porción de la secuencia entera hasta, pero que no incluye, la secuencia entera de interés.

Un ácido nucleico, proteína u otro componente está “aislado” cuando está parcialmente o completamente separado de componentes con los que está normalmente asociado (otras proteínas, ácidos nucleicos, células, reactivos sintéticos, etc.). En una base molar, una especie aislada es más abundante que otras en una composición. Por ejemplo, una especie aislada puede comprender al menos aproximadamente el 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Preferentemente, la especie de interés se purifica a homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición por procedimientos de detección convencionales). La pureza y homogeneidad pueden determinarse usando varias técnicas muy conocidas en la materia tales como electroforesis en gel de agarosa o de poli(acrilamida) de una muestra de proteína o ácido nucleico, seguido de visualización tras la tinción. Si se desea puede utilizarse una técnica de alta resolución tal como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o un medio similar para la purificación del material.

El término “purificado” como se aplica a ácidos nucleicos o polipéptidos generalmente denota un ácido nucleico o polipéptido que está esencialmente libre de otros componentes como se ha determinado por técnicas analíticas muy conocidas en la materia (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido purificado forma una banda discreta en un gel electroforético, eluato cromatográfico y/o un medio sometido a centrifugación en gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético está “purificado”. Un ácido nucleico o polipéptido purificado tiene al menos aproximadamente el 50% de pureza, normalmente al menos aproximadamente el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o más de pureza (por ejemplo, porcentaje en peso en una base molar).

Un ácido nucleico o polipéptido es "recombinante" cuando es artificial o manipulado, o se deriva de una proteína o ácido nucleico artificial o manipulado.

5 El término "recombinante" cuando se usa con referencia a una célula normalmente indica que la célula replica un ácido nucleico heterólogo o expresa un polipéptido codificado por un ácido nucleico heterólogo. Células recombinantes puede comprender genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también incluyen aquellas que comprenden genes que se encuentran en la forma nativa de la célula, pero se modifican y re-introducen en la célula por medios artificiales. El término también engloba
10 células que comprenden un ácido nucleico endógeno a la célula que ha sido modificado sin eliminar el ácido nucleico de la célula; tales modificaciones incluyen aquellas obtenidas por sustitución de genes, mutación específica para sitio y técnicas relacionadas conocidas para aquellos expertos en la materia. La tecnología de ADN recombinante incluye técnicas para la producción de ADN recombinante *in vitro* y transferencia del ADN recombinante a células en las que puede expresarse o propagarse, produciéndose así un polipéptido recombinante.

15 Un "casete de expresión recombinante" o simplemente un "casete de expresión" es una construcción de ácidos nucleicos, generada recombinantemente o sintéticamente, con elementos de ácidos nucleicos que puede efectuar la expresión de un gen estructural en huéspedes compatibles con tales secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos promotores y opcionalmente señales de terminación de la transcripción. Normalmente, el casete de expresión recombinante incluye un ácido nucleico a transcribir (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado) y un promotor. Factores adicionales necesarios o útiles en efectuar la expresión también
20 pueden usarse como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un casete de expresión también puede incluir secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia señal que dirige la secreción de una proteína expresada de la célula huésped. En un casete de expresión también pueden incluirse señales de terminación de la transcripción, potenciadores y otras secuencias de ácidos nucleicos que influyen en la expresión génica.

25 Un ácido nucleico "exógeno", "segmento de ADN exógeno", "secuencia heteróloga" o "ácido nucleico heterólogo" como se usa en el presente documento es uno que se origina a partir de una fuente extraña a la célula huésped particular o, si es de la misma fuente, se modifica de su forma original. Por tanto, un gen heterólogo en una célula huésped incluye un gen que es endógeno para la célula huésped particular, pero ha sido modificado. La modificación de una secuencia heteróloga en las aplicaciones descritas en el presente documento normalmente se produce mediante el uso de procedimientos de evolución molecular dirigida. Por tanto, los términos se refieren a un
30 segmento de ADN que es extraño o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que el elemento no se encuentra generalmente. Los ácidos nucleicos exógenos o ADN exógeno se expresan para dar polipéptidos exógenos.

35 Un "vector" puede ser cualquier agente que pueda liberar o mantener un ácido nucleico en una célula huésped e incluye, por ejemplo, pero no se limita a, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN), ácidos nucleicos desnudos, vectores víricos, virus, ácidos nucleicos complejados con uno o más polipéptidos u otras moléculas, además de ácidos nucleicos inmovilizados sobre partículas de fase sólida. Los vectores se describen en detalle más adelante. Un vector puede ser útil como agente para administrar o mantener un gen exógeno y/o proteína en una célula huésped. Un vector puede poder transducir, transfectar o transformar una célula, haciendo así que la célula replique o exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintos de aquellos nativos a la célula o de un modo no nativo para la
40 célula. Un vector puede incluir materiales para ayudar a conseguir la entrada de un ácido nucleico en la célula tales como una partícula vírica, liposoma, recubrimiento de proteínas o similares. Puede usarse cualquier procedimiento de transferencia de un ácido nucleico a la célula; a menos que se indique lo contrario, el término vector no implica ningún procedimiento particular de administración de un ácido nucleico a una célula o implica que cualquier tipo de célula particular es el objeto de transducción. La presente invención no se limita a ningún vector específico para la
45 administración o mantenimiento de cualquier ácido nucleico de la invención, que incluye, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido CTLA-4 mutante de la invención o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que se une a CD80 y/o CD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de CD80 o ECD de CD86).

50 El término "vector de expresión" normalmente se refiere a una construcción o secuencia de ácidos nucleicos, generada recombinantemente o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico específicos que permite la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión normalmente incluye un ácido nucleico a transcribir operativamente ligado a un promotor. El término "expresión" incluye cualquier etapa que participa en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limitan a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación post-traducciona l y/o secreción.

55 Un "péptido señal" es una secuencia de péptidos (o aminoácidos) que normalmente precede a un polipéptido de interés y es traducida conjuntamente con el polipéptido y dirige o facilita el polipéptido al sistema secretor. Un péptido señal está normalmente unido o fusionado covalentemente con el extremo amino del polipéptido de interés y facilita la secreción del polipéptido de interés de una célula huésped. El péptido señal se escinde normalmente del polipéptido de interés tras la traducción.

El término “que codifica” se refiere a la capacidad de una secuencia de nucleótidos para codificar uno o más aminoácidos. El término no requiere un codón de iniciación o de terminación. Una secuencia de aminoácidos puede codificarse en uno cualquiera de los seis marcos de lectura diferentes proporcionados por una secuencia de polinucleótidos y su complemento.

- 5 El término “secuencia de control” se define en el presente documento para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un conductor, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptidos, promotor, secuencia de péptidos señal y terminador de la transcripción. Como mínimo, una secuencia de control incluye un
10 promotor, y señales de terminación de la transcripción y traducción. Las secuencias de control pueden proporcionarse con ligadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la ligación de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

- El término “secuencia codificante” se refiere a una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto de proteínas. Los límites de la secuencia codificante están generalmente
15 determinados por un marco de lectura abierto (ORF), que puede empezar con el codón de iniciación ATG.

- Un ácido nucleico está “operativamente ligado” a otra secuencia de ácidos nucleicos cuando está dispuesto en una relación funcional con la otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si dirige la transcripción de la secuencia codificante. Operativamente ligado significa que las secuencias de ADN que están ligadas son normalmente contiguas y, si fuera
20 necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, como los potenciadores generalmente funcionan cuando están separados del promotor por varios kilobases y las secuencias intrónicas pueden ser de longitudes variables, algunos elementos de polinucleótido pueden estar operativamente ligados, pero no son contiguos.

Una “célula huésped” es cualquier célula que es susceptible a transformación con un ácido nucleico.

- 25 Un “antígeno” se refiere a una sustancia que reacciona con el (los) producto(s) de una respuesta inmunitaria estimulada por un inmunogén específico. Véase, por ejemplo, JULIUS CRUSE Y COL., ATLAS OF IMMUNOLOGY 60 (1999); RICHARD COICO Y COL., IMMUNOLOGY: A SHORT COURSE 27-30 (5ª ed. 2003). Una respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por célula (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos (CTL)). Los productos de una respuesta inmunitaria pueden incluir anticuerpos y/o
30 CTL. Los antígenos son normalmente macromoléculas (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono complejos, fosfolípidos, polisacáridos) que son extraños para el huésped; esa porción del antígeno conocida como determinante antigénico reacciona con (por ejemplo, se une a) el (los) producto(s) de la respuesta inmunitaria, tal como un anticuerpo o un receptor de linfocitos T específico sobre un linfocito T. Un antígeno puede, pero no necesariamente, inducir una respuesta inmunitaria, además de reaccionar con el (los) producto(s) de la respuesta
35 inmunitaria. “Antigenicidad” se refiere al estado o propiedad de ser antigénico - es decir, que tiene las propiedades de un antígeno. La especificidad de un antígeno puede mostrarse en la relación de un antígeno con su anticuerpo o viceversa; un antígeno normalmente reacciona de un modo altamente específico con su anticuerpo correspondiente y no con el mismo grado de especificidad con otros anticuerpos provocados por el inmunogén. Una “cantidad antigénica” es una cantidad de un antígeno que reacciona detectablemente con el (los) producto(s) de una respuesta
40 inmunitaria estimulada por un inmunogén específico.

- Un “inmunogén” es una sustancia que puede inducir una respuesta inmunitaria en vez de tolerancia inmunológica. Véase, por ejemplo, JULIUS CRUSE Y COL., arriba en 60-61; RICHARD COICO, arriba en 27-30. Los inmunógenos también reaccionan con (por ejemplo, se unen con) el (los) producto(s) de la respuesta inmunitaria inducida que ha o han sido específicamente inducidos contra ellos. Por tanto, todos los inmunógenos son antígenos.
45 “Inmunogenicidad” se refiere al estado o propiedad de ser inmunogénico - es decir, que tiene las propiedades de un inmunogén. Una “cantidad inmunogénica” es una cantidad de un inmunogén que es eficaz para inducir una respuesta inmunitaria detectable. Un inmunogén puede provocar una fuerte respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como al menos inmunidad protectora parcial o completa, a al menos un patógeno.

- Un “inmunomodulador” o molécula “inmunomoduladora”, tal como un polipéptido o ácido nucleico inmunomodulador, modula una respuesta inmunitaria. Por “modulación” de o “modular” una respuesta inmunitaria está previsto que la respuesta inmunitaria sea alterada. Por ejemplo, “modulación” de o “modular” una respuesta inmunitaria en un sujeto generalmente significa que una respuesta inmunitaria se estimula, induce, inhibe, disminuye, suprime, aumenta, potencia o altera de otro modo en el sujeto. Tal modulación de una respuesta inmunitaria puede evaluarse por
50 medios conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen aquellos descritos más adelante. Un “inmunosupresor” o “inmunodepresor” es una molécula, tal como un polipéptido o ácido nucleico, que suprime una respuesta inmunitaria.

Una región Fc o dominio de una inmunoglobulina o molécula de anticuerpo (también llamado un polipéptido del Fc de Ig o polipéptido del Fc) se corresponde en gran parte con la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, y es responsable de diversas funciones que incluyen la(s) función (funciones) efector(as) del

anticuerpo. Por ejemplo, la región Fc de Ig de la molécula IgG comprende los dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina y la región bisagra del extremo N que conduce a CH2. La región bisagra es una parte de la cadena pesada entre Fc y CH1 que contiene los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas y da flexibilidad a la molécula de anticuerpo. Los dominios constantes de la región Fc interactúan con células del sistema inmunitario. Los receptores de Fc son proteínas que se unen a la región Fc de anticuerpos. Una familia significativa de receptores de Fc para la clase de anticuerpos IgG incluye los receptores de Fc gamma (Fc γ R). La unión de anticuerpos a receptores de Fc sobre células media en varias funciones de anticuerpos. Diferentes subclases de IgG presentan diferentes afinidades por receptores de Fc gamma. En general, IgG1 e IgG3 se unen a los receptores con una mayor afinidad que IgG2 e IgG4. Los receptores de Fc se expresan sobre una variedad de células que incluyen, por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y ciertos linfocitos. La unión de un Fc de Ig a su receptor lleva estas células efectoras a sitios del antígeno unido, produciendo en último lugar respuestas de señalización e inmunitarias, que incluyen activación de linfocitos B, respuestas inflamatorias, respuestas citotóxicas y respuestas fagocíticas.

Una fusión de Fc de Ig es una molécula que comprende uno o más polipéptidos (o una o más moléculas pequeñas) operativamente ligados a una región Fc de una inmunoglobulina o anticuerpo. Véase, por ejemplo, Chamow y col., 1996, Trends Biotechnol. 14:52-60. Por consiguiente, una proteína de fusión de Fc de Ig es una molécula que comprende uno o más polipéptidos operativamente ligados a una región Fc de Ig. Una proteína de fusión de Fc de Ig puede comprender, por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo (que facilita funciones efectoras y la farmacocinética) y la región de unión o dominio de unión de una proteína receptora o proteína de ligando u otra proteína o fragmento de la misma. La región de unión o dominio de unión media en el reconocimiento del receptor o ligando diana (comparable al de la región variable del anticuerpo de un anticuerpo para un antígeno). Una región Fc de Ig puede ligarse indirectamente o directamente a uno o más polipéptidos o moléculas pequeñas (componentes de fusión). Diversos ligadores conocidos en la técnica y como se describen en mayor detalle más adelante pueden usarse para ligar un Fc de Ig con un componente de fusión para generar una fusión de Fc de Ig. Una proteína de fusión de Fc de Ig normalmente comprende una región Fc de Ig covalentemente ligada directamente o indirectamente a al menos un polipéptido, polipéptido que normalmente se une a ligando o receptor diana.

Una "afinidad de unión específica" entre dos moléculas, por ejemplo, un ligando y un receptor, significa una unión preferencial de una molécula con otra. La unión de moléculas se considera normalmente específica si la constante de asociación de la unión en equilibrio (por ejemplo, K_A) es aproximadamente $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ o mayor, que incluye aproximadamente 10^4 a 10^{13} M^{-1} , aproximadamente 10^6 a 10^{12} M^{-1} , aproximadamente 10^1 M^{-1} a 10^{11} M^{-1} o aproximadamente 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Valores de K_A para la interacción de unión entre un antígeno y un anticuerpo normalmente oscilan de aproximadamente 10^5 M^{-1} a aproximadamente 10^{12} M^{-1} , normalmente aproximadamente 10^7 M^{-1} a aproximadamente 10^{11} M^{-1} , y frecuentemente aproximadamente 10^8 M^{-1} a aproximadamente 10^{10} M^{-1} . $K_A (\text{M}^{-1})$ se determina calculando k_a/k_d en la que k_a es la constante de la velocidad de asociación y k_d es la constante de la velocidad de disociación. Las unidades de k_a y k_d son $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y s^{-1} , respectivamente. La constante de disociación en equilibrio, K_D , es la inversa de K_A . $K_D = k_d/k_a$. Para la reacción $A + B \rightleftharpoons AB$ (que representa un único ligando que se une a una única proteína de interés (por ejemplo, receptor)), K_D es igual a $([A] \cdot [B])/[AB]$. Ejemplos no limitantes de técnicas muy conocidas para medir afinidades y/o avideces de unión de moléculas incluyen, por ejemplo, tecnología Biacore™ (GE Healthcare) como se trata en otra parte en el presente documento, microcalorimetría por valoración isotérmica (MicroCal LLC, Northampton, MA, EE.UU.), ELISA y procedimientos de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Por ejemplo, FACS u otros procedimientos de citometría pueden usarse para seleccionar poblaciones de moléculas (tales como, por ejemplo, ligandos presentados en superficie celular) que se unen específicamente al miembro del par de unión asociado (tal como un receptor, por ejemplo, un receptor soluble). Los complejos ligando-receptor pueden detectarse y clasificarse, por ejemplo, por fluorescencia (por ejemplo, haciendo reaccionar el complejo con un anticuerpo fluorescente que reconoce el complejo). Las moléculas de interés que se unen a un miembro del par de unión asociado (por ejemplo, receptor) se reúnen y vuelven a clasificarse en presencia de menores concentraciones de receptor. Realizando múltiples rondas de clasificación en presencia de concentraciones decrecientes de receptor (estando un intervalo de concentración a modo de ejemplo en el orden de 10^{-6} M hasta 10^{-13} M , es decir, 1 micromolar (μM) hasta 1 nanomolar (nM), o menos (por ejemplo, 10^{-11} M o 10^{-12} M), dependiendo de la naturaleza de la interacción ligando-receptor) pueden aislarse poblaciones de la molécula de interés que presentan afinidad de unión específica por el receptor.

La frase "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces la referencia y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que está seleccionado por su especificidad por una proteína particular. Puede usarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, rutinariamente se usan inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para

determinar inmunorreactividad específica). Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de referencia o ruido y más normalmente más de 10 a 100 veces la referencia.

5 El término “citocina” incluye, por ejemplo, pero no se limita a, interleucinas, interferones (IFN), quimiocinas, factores de crecimiento hematopoyéticos, factores de necrosis tumoral (TNF) y factores de crecimiento transformantes. En general, éstas son proteínas de pequeño peso molecular que regulan la maduración, activación, proliferación y diferenciación de células del sistema inmunitario.

10 El término “cribado” describe, en general, un procedimiento que identifica moléculas óptimas de la presente invención tal como, por ejemplo, que incluye polipéptidos de la invención, y proteínas de fusión relacionadas que comprenden las mismas, y ácidos nucleicos que codifican todas aquellas moléculas. Pueden usarse varias propiedades de las moléculas respectivas en la selección y el cribado, por ejemplo, una capacidad de una molécula respectiva para inducir o alterar una respuesta inmunitaria deseada en un sistema de prueba o en una aplicación *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La “selección” es una forma de cribado en la que la identificación y separación física se alcanzan simultáneamente por expresión de un marcador de selección que, en algunas circunstancias genéticas, permite que células expresen el marcador para sobrevivir, mientras que otras células mueren (o viceversa). Los marcadores de cribado incluyen, por ejemplo, luciferasa, beta-galactosidasa y proteína fluorescente verde, sustratos de reacción y similares. Marcadores de selección incluyen genes de resistencia a fármaco y toxina, y similares. Otro modo de selección implica clasificación física basada en un acontecimiento detectable tal como unión de un ligando a un receptor, reacción de un sustrato con una enzima, o cualquier otro procedimiento físico que pueda generar una señal detectable tanto directamente (por ejemplo, utilizando un sustrato o ligando cromogénico) como indirectamente (por ejemplo, haciendo reaccionar con un anticuerpo secundario cromogénico). La selección por clasificación física puede realizarse mediante una variedad de procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, por FACS en formatos de células completas o microgotitas.

25 Debido a limitaciones en el estudio de respuestas inmunitarias primarias *in vitro*, los estudios *in vivo* son procedimientos de cribado particularmente útiles. En algunos de tales estudios, un polinucleótido o polipéptido de la invención se introduce primero en un sujeto de prueba (por ejemplo, un mamífero, tal como un animal), y una respuesta inmunitaria inducida es posteriormente estudiada analizando el tipo de respuesta inmunitaria en el animal inmunizado (por ejemplo, producción de anticuerpo en el suero de animales inmunizados, proliferación de linfocitos T), o estudiando la calidad o intensidad de la respuesta inmunitaria inducida en el animal inmunizado (por ejemplo, nivel del título de anticuerpos inducido).

30 El término “sujeto” como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, un organismo o animal, que incluye mamíferos y no mamíferos. Un mamífero incluye, por ejemplo, pero no se limita a, un ser humano, primate no humano (por ejemplo, babuino, orangután, mono, gorila), ratón, perro, cerdo, vaca, cabra, gato, conejo, rata, cobaya, hámster, caballo, oveja u otro mamífero no humano. Un no mamífero incluye, por ejemplo, pero no se limita a, un invertebrado no mamífero y vertebrado no mamífero, tal como un ave (por ejemplo, un pollo o pato) o un pez.

35 El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto, que incluye un animal o ser humano. Una composición farmacéutica normalmente comprende una cantidad eficaz de un agente activo y un vehículo, excipiente o diluyente. El vehículo, excipiente o diluyente es normalmente un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, respectivamente.

40 El término “cantidad eficaz” se refiere a una dosificación (o dosis) o cantidad de una sustancia suficiente para producir un resultado deseado. El resultado deseado puede comprender una mejora objetiva o subjetiva en el receptor de la dosificación o cantidad. Por ejemplo, el resultado deseado puede comprender una inducción, promoción, potenciamiento o modulación medible, detectable o probable de una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se ha administrado una dosificación o cantidad de un antígeno o inmunogén particular (o composición del mismo). Una dosificación (o dosis) o cantidad de un inmunogén suficiente para producir tal resultado puede describirse como una dosificación (o dosis) o cantidad “inmunogénica”.

50 Un “tratamiento profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos o síntomas de, o sólo muestra signos o síntomas tempranos de, una enfermedad, patología o trastorno, de forma que el tratamiento se administra con el fin de prevenir o disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad, patología o trastorno. Un tratamiento profiláctico funciona como un tratamiento preventivo contra una enfermedad, patología o trastorno, o como un tratamiento que inhibe o reduce adicionalmente el desarrollo o potenciamiento de una enfermedad, patología o trastorno. Una “actividad profiláctica” es una actividad de un agente que, cuando se administra a un sujeto que no muestra signos o síntomas de, o sólo muestra signos o síntomas tempranos de, una patología, enfermedad o trastorno previene o disminuye el riesgo del sujeto de desarrollar la patología, enfermedad o trastorno. Un agente “profilácticamente útil” (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) se refiere a un agente que es útil en prevenir el desarrollo de una enfermedad, patología o trastorno, o útil en inhibir o reducir el desarrollo o potenciamiento adicional de una enfermedad, patología o trastorno.

55 Un “tratamiento terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra síntomas o signos de patología, enfermedad o trastorno, en el que el tratamiento se administra al sujeto con el fin de disminuir o eliminar aquellos signos o síntomas. Una “actividad terapéutica” es una actividad de un agente que elimina o disminuye signos o

síntomas de patología, enfermedad o trastorno cuando se administra a un sujeto que padece tales signos o síntomas. Un agente “terapéuticamente útil” significa que el agente es útil en disminuir, tratar o eliminar signos o síntomas de una enfermedad, patología o trastorno.

5 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y muchos de los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, biología molecular, química de ácidos nucleicos y química de proteínas descrita más adelante son muy conocidos y comúnmente empleados para aquellos expertos en la materia. Técnicas convencionales, tales como se describen en Sambrook y col., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 (en lo sucesivo “Sambrook”) y CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F. M. Ausubel y col., eds., *Current Protocols*, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (1994, complementado por 1999) (en lo sucesivo “Ausubel”), se usan para procedimientos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, procedimientos de cultivo celular e incorporación de transgenes, por ejemplo, electroporación, inyección, pistola de genes, impresión a través de la piel y lipofección. Generalmente, las etapas de síntesis y purificación de oligonucleótidos se realizan según memorias descriptivas. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente según procedimientos convencionales en la materia y diversas referencias generales que se proporcionan en todo este documento. Se cree que los procedimientos en este documento son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y se proporcionan por comodidad del lector.

Diversos términos adicionales se definen o se caracterizan de otro modo en el presente documento.

Moléculas y procedimientos

20 En el presente documento se desvelan moléculas y procedimientos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones del sistema inmunitario que incluyen, por ejemplo, aquellos en los que se desea la modulación del sistema inmunitario (por ejemplo, respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T). Las moléculas desveladas en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos, conjugados, proteínas de fusión solubles, ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos o proteínas de fusión) son útiles para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones del sistema inmunitario en los que se desea la inmunosupresión que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunitarias, enfermedades inmunoproliferativas, trastornos relacionados con injerto y procedimientos de tratamiento que implican trasplante de tejido, célula, órgano o injerto de un donante a un receptor en el que se desea la supresión de una respuesta inmunitaria en el receptor contra el tejido, célula, órgano o injerto del donante.

30 En el presente documento también se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes novedosas que tienen propiedades mejoradas en comparación con una molécula de CTLA-4, tal como el polipéptido CTLA-4 humano natural (“hCTLA-4”) o un fragmento del mismo que se une a CD80 y/o CD86, tal como el dominio extracelular de CTLA-4 humano (“ECD de hCTLA-4”). Como se trata en mayor detalle más adelante, se usaron una variedad de estrategias de mutagénesis y cribado para preparar e identificar moléculas de CTLA-4 mutantes novedosas que se unen a CD80 y/o CD86. En particular, tales estrategias se usaron para preparar e identificar moléculas de CTLA-4 mutantes que tienen avideces de unión mejoradas por CD80 (B7-1) y/o CD86 (B7-2) con respecto a CTLA-4 humano (“hCTLA-4”), y/o que tienen afinidades de unión mejoradas por CD80 y/o CD86 con respecto a ECD de hCTLA-4. Las moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación que se unen a ligandos CD80 y/o CD86 endógenos expresados sobre células presentadoras de antígeno inhiben o bloquean eficazmente la interacción de estos ligandos con el receptor CD28 endógeno, que se expresa sobre la superficie de linfocitos T. Como resultado, la señal co-estimuladora crítica para la activación de linfocitos T proporcionada por la interacción del receptor de la superficie de linfocitos T CD28 con las moléculas B7 (es decir, CD80 y CD86) se inhibe o bloquea. Tales linfocitos T no están óptimamente activados y tienen capacidades reducidas para la proliferación.

45 En los casos en los que se bloquee la señalización entre un ligando CD80 o CD86 y un receptor CD28, los linfocitos T no están óptimamente estimulados para ser activos y, por tanto, no están óptimamente inducidos para proliferar. Similarmente, en los casos en los que se inhibe la señalización entre un ligando CD80 o CD86 y un receptor CD28, la activación y proliferación de linfocitos T se inhibe. Se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes que funcionan como antagonistas para la señalización de CTLA-4. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes que funcionan como antagonistas para la señalización de CD28, suprimiendo o bloqueando así respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T; tales moléculas funcionan como agentes inmunosupresores. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes que se unen tanto a CD80 como a CD86, pero que tienen mayor avidez de unión por CD86 que por CD80 y, por tanto, inhiben la co-estimulación dependiente de CD86 a un mayor grado que la co-estimulación dependiente de CD80. Se espera que todas tales moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación sean útiles para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones en los que sea deseada o sería beneficiosa la inmunosupresión.

60 Se ha mostrado que una proteína de fusión CTLA-4 humano-Ig y una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante específica – ambas desarrolladas por Bristol-Myers Squibb Co. (Princeton, NJ) – es eficaz en el tratamiento de ciertas enfermedades o afecciones inmunorrelacionadas. La proteína de fusión Orencia® (también conocida como abatacept (“ABA”)) (Bristol-Myers Squibb Co. (Princeton, NJ)) es una proteína de fusión dimérica recombinante soluble que consiste en dos proteínas de fusión de inmunoglobulina (Ig) monoméricas idénticas ligadas

- covalentemente juntas por un enlace disulfuro formado entre un residuo de cisteína presente en cada proteína de fusión monomérica. ORENCIA es una marca registrada de Bristol-Myers Squibb Company. Cada proteína de fusión de Ig monomérica del dímero Orenacia® consiste en el dominio extracelular de CTLA-4 humano (SEC ID N°: 159) fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG1 mutante específico (SEC ID N°: 186).
- 5 La secuencia de polipéptidos completa de cada proteína de fusión monomérica tal se muestra en SEC ID N°: 164. El dímero Orenacia® se produce en un sistema de expresión de mamífero y tiene un peso molecular aparente de 92 kDa. Se cree que las dos proteínas de fusión de Ig monoméricas del dímero Orenacia® están ligadas covalentemente juntas por un único enlace disulfuro formado entre el residuo de cisteína en la posición 120 de cada monómero de hCTLA-4-IgG1 mutante y que no se forman enlaces disulfuro entre los dos polipéptidos del Fc de IgG1 mutantes.
- 10 El dímero Orenacia® es un modulador de la co-estimulación selectivo que inhibe la activación de linfocitos T uniéndose a CD80 y CD86 y, por tanto, bloqueando la interacción con CD28. El dímero Orenacia® ha sido actualmente autorizado para el tratamiento de adultos humanos que padecen artritis reumatoide (AR) de moderada a grave. Información adicional sobre el dímero Orenacia® y sus indicaciones clínicas y eficacia se proporcionan en la web universal en orenacia.com y bms.com.
- 15 Como se observa anteriormente, cada monómero de proteínas de fusión del dímero Orenacia® contiene un dominio extracelular de CTLA-4 humano. El CTLA-4 humano es una proteína de membrana que se expresa transitoriamente sobre linfocitos T. La secuencia de proteínas de longitud completa de hCTLA-4 de longitud completa WT se muestra en SEC ID N°: 160, y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica hCTLA-4 de longitud completa WT se muestra en SEC ID N°: 194. CTLA-4 humano incluye un péptido señal (SP), dominio extracelular (ECD), dominio transmembrana (TD) y dominio citoplásmico (CD) ligados covalentemente juntos en ese orden (por ejemplo, el extremo C del SP está ligado covalentemente al extremo N del ECD, el extremo C del ECD está ligado covalentemente al extremo N del TD y el extremo C del TD está ligado covalentemente al extremo N del CD). El polipéptido del ECD de hCTLA-4 WT normalmente comprende los residuos 38-161 de la secuencia de proteínas de hCTLA-4 de longitud completa (SEC ID N°: 160) y normalmente tiene 124 residuos de aminoácidos de longitud. Esta
- 20 secuencia de polipéptidos del ECD de hCTLA-4 se muestra en SEC ID N°: 159. El péptido señal (SP) de la proteína hCTLA-4 de longitud completa, que normalmente comprende los residuos de aminoácidos 1-35 ó 1-37 de SEC ID N°: 160, se escinde durante el procesamiento. Véase, por ejemplo, Harper y col., J. Immunol. 147(3):1037-1044 (1991). La secuencia de péptidos señal de CTLA-4 humano que comprende los residuos de aminoácidos 1-35 ó 1-37 de la proteína hCTLA-4 se muestra en SEC ID N°: 182 o SEC ID N°: 216, respectivamente. Si la secuencia de péptidos señal es la mostrada en SEC ID N°: 182 o SEC ID N°: 216, cuando el péptido señal se escinde, la proteína hCTLA-4 madura normalmente empieza con el residuo de metionina en la posición de aminoácido 38 de la secuencia de proteínas hCTLA-4 de longitud completa mostrada en SEC ID N°: 160. Por tanto, aunque la secuencia de péptidos señal de hCTLA-4 es la de SEC ID N°: 182, que comprende los residuos de aminoácidos 1-35 de la proteína hCTLA-4, la proteína hCTLA-4 secretada madura resultante empieza con la metionina que está en la
- 25 posición 38 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa. Los residuos de lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 de longitud completa no están presentes en la proteína hCTLA-4 madura y se cree que se escinden de la proteína hCTLA-4 madura durante el procesamiento. Por tanto, los residuos de aminoácidos de la secuencia de proteínas hCTLA-4 maduras se numeran normalmente empezando con el residuo de metionina presente en la posición 38 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa como primer aminoácido (es decir, ocupando la posición 1); por consiguiente, el residuo de histidina ocupa la posición de aminoácido 2 en la proteína hCTLA-4 madura, etc. Cada monómero del dímero Orenacia® incluye la secuencia de polipéptidos del ECD de hCTLA-4 mostrada en SEC ID N°: 159. En la proteína hCTLA-4 WT de longitud completa, el péptido señal comprende los residuos de aminoácidos 1-37, el dominio extracelular (ECD) comprende los residuos de aminoácidos 38-161, el dominio transmembrana (TD) comprende los residuos de aminoácidos 162-182 y el
- 30 dominio citoplásmico (CD) comprende los residuos de aminoácidos 183-223 de SEC ID N°: 160. El dominio maduro (MD) de la proteína hCTLA-4 normalmente comprende los residuos de aminoácidos 36-223 o, en algunos casos, los residuos de aminoácidos 37-223 ó 38-223 de SEC ID N°: 160.

El ácido nucleico de SEC ID N°: 194 comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de péptidos señal (residuos de nucleótidos 1-111), una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ECD de hCTLA-4 (residuos de nucleótidos 112-483), una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de hCTLA-4 (residuos de nucleótidos 484-669); los 3 últimos nucleótidos del extremo C son el codón de terminación TGA.

50

Belatacept (también conocido como "LEA29Y-Ig", "LEA-Ig" o "A29YL104E-Ig") (Bristol-Myers Squibb Co. (Princeton, NJ)) es una proteína dimérica recombinante soluble compuesta por dos proteínas de fusión de Ig idénticas ligadas covalentemente juntas por un enlace disulfuro formado entre un residuo de cisteína en cada proteína de fusión monomérica. Cada proteína de fusión monomérica está compuesta por un polipéptido del dominio extracelular de CTLA-4 mutante fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido de IgG1 mutante específico. La secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante se diferencia de la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 humano WT en dos mutaciones, específicamente una sustitución de una tirosina con la alanina en la

55 posición 29 (abreviado como la sustitución A29Y) y una sustitución de una glutamina con la leucina en la posición 104 (abreviada como la sustitución L104E), en la que los residuos de aminoácidos en el ECD de CTLA-4 humano se numeran con la metionina en el extremo N que representa el aminoácido en la posición 1. Cada monómero de belatacept incluye la secuencia de polipéptidos de Fc de IgG1 mutante mostrada en SEC ID N°: 186; este polipéptido

60

del Fc de IgG1 mutante es idéntico al polipéptido del Fc de IgG1 mutante incluido en la proteína de fusión Orenzia®. Por tanto, la proteína de fusión monomérica belatacept se diferencia de cada proteína de fusión monomérica Orenzia® en dos aminoácidos. La secuencia de polipéptidos de cada una de tal proteína de fusión monomérica en belatacept se muestra en SEC ID N°: 166. Por tanto, el nombre "LEA29Y-Ig" refleja el hecho de que cada proteína de fusión monomérica del dímero belatacept está compuesta por un ECD de CTLA-4 mutante que se diferencia de la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 humano por las dos mutaciones L104E y A29Y. Se ha mostrado que belatacept se une a CD86 aproximadamente 4 veces más ávidamente y se une a CD80 aproximadamente 2 veces más ávidamente que el dímero Orenzia® (Larson y col., Amer. J. Transplant. 5:443-453, 444 (2005)). Se ha mostrado que belatacept es hasta aproximadamente 10 veces más potente que el dímero Orenzia® en inhibir la activación de linfocitos T *in vitro* y tiene potencia inmunosupresora *in vivo* mejorada en comparación con la proteína Orenzia® como se muestra por su elevada capacidad para inhibir respuestas de anticuerpos dependientes de linfocitos T y su prolongación mejorada de la supervivencia de aloinjerto renal en ensayos clínicos que implican primates no humanos. *Ídem*. Información adicional sobre belatacept y sus indicaciones clínicas y eficacia se proporciona en la web universal en bms.com.

En el presente documento se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, que incluyen proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles novedosas descritas en el presente documento, que tienen una avidéz de unión por CD86 que es mayor que la avidéz de unión del dímero Orenzia® (hCTLA-4-Ig dimérica) por CD86. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, que incluyen proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes recombinantes diméricas novedosas, que tienen una avidéz de unión por CD80 que es aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión del dímero Orenzia® por CD80. En el presente documento también se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes que incluyen proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles novedosas, que tienen una mayor capacidad para suprimir una o más respuestas inmunitarias (por ejemplo, respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T) que Orenzia® (abatacept). Se espera que las moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación que tienen una o más propiedades mejoradas en comparación con el dímero Orenzia® sean más potentes y, por tanto, más eficaces, útiles y ventajosas que el dímero Orenzia® en el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones en los que se desea inmunosupresión, que incluyen aquellas enfermedades, trastornos o afecciones para los que el dímero Orenzia® está autorizado y/o se ha mostrado que proporciona beneficio clínico, tal como enfermedades autoinmunitarias que incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide y psoriasis.

En el presente documento también se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, que incluyen proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles novedosas descritas en el presente documento, que tienen una avidéz de unión por CD86 que es mayor que la avidéz de unión de belatacept (LEA29Y-Ig) por CD86. En el presente documento también se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, que incluyen proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles novedosas descritas en el presente documento, que tienen una avidéz de unión por CD86 que es mayor que la avidéz de unión de belatacept por CD86. En el presente documento también se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, que incluyen proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles novedosas descritas en el presente documento, que tienen una mayor capacidad para suprimir una o más respuestas inmunitarias (por ejemplo, respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T) que belatacept. Se espera que las moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación que tienen una o más propiedades mejoradas en comparación con belatacept sean más potentes que belatacept y, por tanto, más eficaces, útiles y ventajosas que belatacept en el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones en los que se desea inmunosupresión, que incluye aquellas enfermedades, trastornos o afecciones para los que se ha mostrado que la proteína de fusión belatacept proporciona beneficio clínico, tal como supervivencia de aloinjerto renal en primates no humanos.

La seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, inmunogenicidad y eficacia clínica de una molécula de la divulgación, tal como una molécula de CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble como se describen en detalle más adelante) en un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno inmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, etc.) al que se administra una dosis particular de la molécula en un modo particular (por ejemplo, administración parenteral, intravenosa o subcutánea) puede determinarse usando metodologías comparables a aquellas empleadas en ensayos clínicos para Orenzia® que implican sujetos similares. Véanse, por ejemplo, las direcciones del sitio de la web universal en bms.com y orenzia.com. Por ejemplo, el grado al que una molécula de CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante soluble) es eficaz en reducir en sujetos que tienen artritis reumatoide (AR) la progresión de la lesión articular, en aliviar los signos y síntomas de AR, que incluyen reducción del dolor, puede evaluarse usando metodologías similares a aquellas empleadas en los ensayos clínicos de Orenzia® que implican pacientes con AR.

La seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, inmunogenicidad y eficacia clínica de una molécula de la divulgación (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble como se describen en detalle más adelante) en un sujeto en el que se desea inmunosupresión (por ejemplo, un sujeto que se somete a trasplante de tejido, célula, órgano o injerto de un donante) y al que una dosis particular de la molécula se administra en un modo particular (por ejemplo, administración parenteral, intravenosa o subcutánea) puede determinarse usando metodologías comparables a aquellas empleadas en ensayos clínicos para belatacept que implican sujetos similares. Véase, por ejemplo, la dirección del sitio de la web universal bms.com. Por ejemplo, el grado al que una molécula de CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante soluble) es eficaz en reducir rechazo de trasplante de riñón o renal en un paciente receptor que se somete a trasplante de riñón o renal

puede evaluarse usando metodologías similares a aquellas empleadas en el ensayo clínico de belatacept que implica pacientes que se someten a trasplante de riñón o renal.

Las moléculas y procedimientos de la divulgación y otros aspectos de la divulgación se tratan en detalle adicional a continuación.

5 Polipéptidos

En el presente documento se desvelan polipéptidos novedosos, denominados conjuntamente “polipéptidos de la divulgación”. El término “polipéptidos de la divulgación” está previsto que incluya variantes y/o derivados de las secuencias de polipéptidos desveladas en el presente documento. Los polipéptidos de la divulgación incluyen polipéptidos CTLA-4 que no se producen naturalmente recombinantes o mutantes que se unen a CD80 y/o CD86 y/o que inhiben o suprimen respuestas inmunitarias. Los polipéptidos de la divulgación incluyen proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación, e incluyen formas monoméricas y diméricas de tales proteínas de fusión. Los polipéptidos de la divulgación incluyen multímeros que comprenden uno o más polipéptidos CTLA-4 mutantes de la divulgación. La divulgación también incluye conjugados que comprenden uno o más polipéptidos CTLA-4 mutantes de la divulgación. Algunos polipéptidos de la divulgación son polipéptidos solubles. Por ejemplo, como se describe en más detalle más adelante, la divulgación incluye proteínas de fusión solubles que comprenden un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante ligado a un polipéptido diferente (tal como, por ejemplo, un polipéptido de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, un polipéptido del Fc de Ig) que potencia solubilidad del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante.

Como se trata en mayor detalle más adelante, en un aspecto de la divulgación se usaron una variedad de estrategias de mutagénesis y de cribado para preparar e identificar polipéptidos novedosos que se unen a CD80 y/o CD86. En particular, tales estrategias se usaron para preparar e identificar polipéptidos novedosos que tienen capacidades mejoradas para unirse a CD80 y/o CD86, que incluyen polipéptidos CTLA-4 mutantes novedosos que tienen afinidades o avides de unión mejoradas por CD80 y/o CD86. Los polipéptidos de la divulgación que se unen a ligandos CD80 y/o CD86 expresados sobre células presentadoras de antígeno interfieren con o bloquean la interacción de estos ligandos con los receptores CD28 expresados sobre linfocitos T. Como resultado, la señal co-estimuladora de linfocitos T proporcionada por la interacción del receptor de la superficie de linfocitos T CD28 con las moléculas B7 (es decir, CD80 y CD86) se inhibe o bloquea. Se cree que tales polipéptidos son útiles en el tratamiento profiláctico y terapéutico de enfermedades, trastornos y afecciones en los que es beneficiosa la modulación del sistema inmunitario (por ejemplo, respuestas de linfocitos T).

30 Polipéptidos CTLA-4 mutantes

En el presente documento se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes, comprendiendo cada uno una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 (por ejemplo, SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 18, SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20, SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23, SEC ID N°: 24, SEC ID N°: 25, SEC ID N°: 26, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, SEC ID N°: 30, SEC ID N°: 31, SEC ID N°: 32, SEC ID N°: 33, SEC ID N°: 34, SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 36, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 38, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41, SEC ID N°: 42, SEC ID N°: 43, SEC ID N°: 44, SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 46, SEC ID N°: 47, SEC ID N°: 48, SEC ID N°: 49, SEC ID N°: 50, SEC ID N°: 51, SEC ID N°: 52, SEC ID N°: 53, SEC ID N°: 54, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 56, SEC ID N°: 57, SEC ID N°: 58, SEC ID N°: 59, SEC ID N°: 60, SEC ID N°: 61, SEC ID N°: 62, SEC ID N°: 63, SEC ID N°: 64, SEC ID N°: 65, SEC ID N°: 66, SEC ID N°: 67, SEC ID N°: 68, SEC ID N°: 69, SEC ID N°: 70, SEC ID N°: 71, SEC ID N°: 72, y SEC ID N°: 73), en los que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 o un fragmento de polipéptido de CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera de ellos o ambos), y/o modulan o regulan una respuesta inmunitaria. Algunos de tales polipéptidos, tales como cada uno de aquellos expuestos en SEC ID N°: 1-73, se describen como polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutantes secretados o maduros. Los polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutantes expuestos en cada una de SEC ID N°: 1-73 no incluyen un péptido señal; se ha escindido durante el procesamiento, produciendo así el polipéptido maduro o secretado. Un fragmento del polipéptido de CD80 puede comprender, por ejemplo, un polipéptido del dominio extracelular de un polipéptido de CD80 tal como, por ejemplo, polipéptido del ECD de CD80 humano (“ECD de hCD80”). Un fragmento del polipéptido de CD86 puede comprender, por ejemplo, un polipéptido del dominio extracelular de un polipéptido de CD86 tal como, por ejemplo, polipéptido del ECD de CD86 humano (“ECD de hCD86”). Algunos de tales polipéptidos se unen a CD80 y/o CD86 de mamífero o fragmento de polipéptido del mismo tal como, por ejemplo, un ECD de CD80 o CD86 de mamífero. Algunos de tales polipéptidos se unen a CD80 humano WT (“hCD80”) y/o CD86 humano WT (“hCD86”) o un fragmento de polipéptido de los mismos tal como, por ejemplo, ECD de hCD80 o ECD de hCD86. En algunos de tales procedimientos se suprime o inhibe al menos una respuesta inmunitaria.

Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o avides de unión por hCD80 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD80) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avides de unión del

polipéptido del ECD de hCTLA-4 por hCD80 o un fragmento del mismo, respectivamente. La secuencia de polipéptidos de hCD80 de longitud completa predicha, que incluye un péptido señal, ECD, dominio transmembrana y dominio citoplásmico ligados covalentemente juntos en ese orden, se expone en SEC ID N°: 195. El péptido señal comprende los residuos de aminoácidos 1-34, el ECD comprende los residuos de aminoácidos 35-242, el dominio transmembrana comprende los residuos de aminoácidos 243-263 y el dominio citoplásmico comprende los residuos de aminoácidos 264-288 de SEC ID N°: 195. La secuencia de polipéptidos del ECD de hCD80 se muestra en SEC ID N°: 174. La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID N°: 173 codifica el péptido señal de CD80 humano WT (en el extremo N) y ECD de CD80 humano.

Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o avidéz de unión por hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD86) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidéz de unión del polipéptido del ECD de hCTLA-4 por hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD), respectivamente. La secuencia de polipéptidos de hCD86 de longitud completa predicha, que incluye un péptido señal, ECD, dominio transmembrana y dominio citoplásmico ligados covalentemente juntos en ese orden, se expone en SEC ID N°: 175, y un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la secuencia de polipéptidos de hCD86 de longitud completa predicha se muestra en SEC ID N°: 176. La secuencia de polipéptidos del ECD de hCD86 se muestra en SEC ID N°: 180. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o avidéz de unión por hCD86 que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidéz de unión del polipéptido del ECD de LEA29Y que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 168 por hCD86. Polipéptidos a modo de ejemplo de la invención que tienen afinidades de unión o avidéces de unión por hCD86 o ECD de hCD86 que son al menos iguales a o mayores que aquellas de ECD de hCTLA-4 y ECD DE LEA29Y (también llamados ECD de "A29YL104E" o "L104EA29Y") por hCD86 o ECD de hCD86, respectivamente, incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, aquellos que comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con la secuencia de cualquiera de SEC ID N°: 4, 10-12, 15, 17, 24, 26, 28, 35 y 61. Véase, por ejemplo, la Tabla 5 en el Ejemplo 4. Los datos presentados en la Tabla 5 reflejan una interacción monomérica entre una CTLA-4-Ig representativa y ECD de CD86 monomérico. El término LEA29Y (o A29YL104E o L104EA29Y), si no se indica de otro modo, se refiere a ECD de LEA29Y (o ECD de A29YL104E o L104EA29Y).

Algunos de tales polipéptidos comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aminoácidos aproximadamente igual a la longitud de aminoácidos del dominio extracelular de CTLA-4 humano. Tales polipéptidos pueden describirse como polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene aproximadamente 110 aminoácidos a aproximadamente 138 residuos de aminoácidos, aproximadamente 112 a aproximadamente 136 residuos de aminoácidos, aproximadamente 114 a aproximadamente 134 residuos de aminoácidos, aproximadamente 116 a aproximadamente 132 residuos de aminoácidos, aproximadamente 118 a aproximadamente 130 residuos de aminoácidos, aproximadamente 119 a aproximadamente 129 residuos de aminoácidos, aproximadamente 120 a aproximadamente 128 residuos de aminoácidos, aproximadamente 121 a aproximadamente 127 residuos de aminoácidos, aproximadamente 122 a aproximadamente 126 residuos de aminoácidos, aproximadamente 123 a aproximadamente 125 residuos de aminoácidos de longitud. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden una secuencia que tiene 124 residuos de aminoácidos de longitud. Polipéptidos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en los que tales polipéptido se unen a CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera de ellos o ambos).

Algunos de tales polipéptidos descritos anteriormente, que incluyen, por ejemplo, aquellos polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden cada uno una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-73 y que se unen a CD80 y/o CD86 y/o un ECD de los mismos, tienen una capacidad para modular o regular una respuesta inmunitaria. Una o más de una variedad de respuestas inmunitarias pueden modularse o regularse por tales polipéptidos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2, etc.), inducción de diversos marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2, etc.), síntesis o producción de moléculas inflamatorias, inflamación, hinchazón de articulaciones, dolor con la palpación de las articulaciones, dolor, rigidez, niveles en suero de proteína reactiva C, producción de anticuerpos anti-colágeno y/o respuesta(s) de anticuerpos dependiente(s) de linfocitos T). En algunos casos, un polipéptido tal tiene mayor capacidad para suprimir o inhibir al menos una respuesta inmunitaria tal que hCTLA-4 o ECD de hCTLA-4.

Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos pueden inhibir la activación de linfocitos T o proliferación de linfocitos T en ensayos *in vitro*. Los Ejemplos 4-9 expuestos más adelante, por ejemplo, demuestran la capacidad de proteínas de fusión representativas que comprenden una secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante representativa tal como aquellas descritas en el presente documento, para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Algunos de tales polipéptidos pueden inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto *in vivo*, tal como mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de al menos un polipéptido tal a un sujeto que necesita terapia inmunosupresora. Se espera que algunos de tales polipéptidos sean útiles en una

variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones del sistema inmunitario en los que se desea inmunomodulación, como se trata en mayor detalle más adelante. Se espera que tales polipéptidos sean útiles en procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario de mamíferos tales como, por ejemplo, seres humanos, en los que se desea la inmunoinhibición o inmunosupresión), procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano), y otros procedimientos descritos en otra parte en el presente documento.

Adicionalmente o alternativamente, algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de hCTLA-4 o ECD de hCTLA-4 para suprimir o inhibir uno o más tipos de respuestas inmunitarias. Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en ensayos y/o aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*, tales como aquellos descritos anteriormente y en mayor detalle más adelante, que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de hCTLA-4 o ECD de hCTLA-4 para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en tales aplicaciones. Adicionalmente, algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citocinas, respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T) que es mayor que la capacidad de un polipéptido LEA29Y - un ECD de CTLA-4 mutante específico que comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168 - para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria. Los Ejemplos 4-9 expuestos más adelante, por ejemplo, comparan la capacidad de proteínas de fusión representativas de la invención que comprenden una secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la invención para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de una proteína de fusión que comprende el polipéptido del ECD de hCTLA-4 o LEA29Y para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Se espera que tales moléculas sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones terapéuticas que incluyen tratamiento de enfermedades y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos profilácticos y terapéuticos para inhibir rechazo de órgano, célula o trasplante de injerto de tejido.

Algunos de tales polipéptidos pueden diferenciarse de otros por, por ejemplo, una delección, adición y/o sustitución de aminoácidos. Una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservativa o no conservativa. Véase, por ejemplo, la sección titulada "Variación de secuencias".

En el presente documento se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden cada uno una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en los que el polipéptido se une a hCD80 monomérico o hCD86 monomérico o un ECD de cualquiera de ellos o ambos. Algunos de tales polipéptidos tienen (1) una afinidad de unión por hCD86 monomérico que es aproximadamente igual a o mayor que la afinidad de unión de hCTLA-4 monomérico o un polipéptido LEA29Y por hCD86 monomérico o un ECD del mismo, y (2) una afinidad de unión por hCD80 monomérico que es aproximadamente igual a o mayor que la afinidad de unión de hCTLA-4 monomérico por hCD80 monomérico. El polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 168. Además, algunos de tales polipéptidos tienen mayor capacidad para suprimir una o más respuestas inmunitarias descritas en el presente documento (por ejemplo, activación/proliferación de linfocitos T, síntesis/producción de citocinas, inducción de marcadores de activación, producción de moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno, respuesta de Ab dependiente de linfocitos T) que hCTLA-4 monomérico, ECD de hCTLA-4 monomérico, o polipéptido LEA29Y.

En el presente documento también se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden cada uno una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en los que el polipéptido tiene una afinidad de unión por un ECD de hCD86 o ECD de hCD80 que es aproximadamente igual a o mayor que la afinidad de unión de un ECD de hCTLA-4 por el ECD de hCD86 o ECD de hCD80, respectivamente. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad de unión por el ECD de hCD86 que es mayor que la afinidad de unión del ECD de hCTLA-4 (SEC ID N°: 159) o el polipéptido LEA29Y (SEC ID N°: 168) por el ECD de hCD86. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad de unión por el ECD de hCD80 que es mayor que la afinidad de unión del ECD de hCTLA-4 por el ECD de hCD80. Algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria, en algunos casos, una mayor capacidad para suprimir una o más respuestas inmunitarias, que incluye aquellas descritas anteriormente y en todo el presente documento, que el ECD de hCTLA-4 o el polipéptido LEA29Y.

En el presente documento se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes (por ejemplo, polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante) que comprenden cada uno una secuencia de polipéptidos (a) que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 en no más de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 residuo(s) de aminoácido, y (b) en los que el residuo de aminoácido en la secuencia de polipéptidos en la posición del residuo de aminoácido 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 ó 85 es idéntico al residuo de aminoácido en la posición correspondiente de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, un polipéptido seleccionado de SEC ID N°: 1-73), en los que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos, y/o inhibe una respuesta(s) inmunitaria(s). En algunos casos, el polipéptido se diferencia del

5 polipéptido seleccionado (por ejemplo, seleccionado de SEC ID N°: 1-73) en no más de 10, 9, 8, 7 ó 6 residuos de aminoácidos (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 residuos de aminoácidos), pero el aminoácido que ocupa una o más de las posiciones de residuos de aminoácidos 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 y 85 es idéntico al residuo de aminoácido incluido en esa posición en la secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, una
 10 seleccionada de SEC ID N°: 1-73) y no está deletado o sustituido con otro aminoácido. Algunos de tales polipéptidos comprenden una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos seleccionada en no más de 10, 9, 8, 7 ó 6 residuos de aminoácidos (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 residuos de aminoácidos) y que incluye residuos de aminoácidos en una o más de las posiciones de residuos de aminoácidos 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de
 15 aminoácidos en las posiciones correspondientes en la secuencia de polipéptidos seleccionada. Tales polipéptidos pueden diferenciarse de la secuencia de polipéptidos seleccionada por delección (delecciones) de aminoácidos, adición (adiciones) y/o sustitución (sustituciones) de aminoácidos en una posición (posiciones) que no está(n) especificada(s) como que tiene(n) un aminoácido idéntico al de la secuencia seleccionada. Están incluidos polipéptidos tales que tienen una afinidad o aidez de unión por hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD86) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o aidez de unión del ECD de hCTLA-4 o polipéptido LEA29Y por hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD), respectivamente. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o aidez de unión por hCD80 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD80) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o aidez de unión del polipéptido del ECD de hCTLA-4 por hCD80 o un fragmento del mismo, respectivamente. Algunos de tales polipéptidos
 20 comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud aproximadamente igual a la longitud de aminoácidos del ECD de hCTLA-4, por ejemplo, 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126, 123-125 ó 124 residuos de aminoácidos de longitud.

Algunos de tales polipéptidos pueden suprimir una o más de una variedad de respuestas inmunitarias que incluyen, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de moléculas inflamatorias, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta(s) de Ab dependiente(s) de linfocitos T). Algunos de tales polipéptidos tienen una mayor capacidad para inhibir una o más de tales respuestas inmunitarias que hCTLA-4, polipéptido del ECD de hCTLA-4 o polipéptido LEA29Y. Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos pueden inhibir la activación de linfocitos T o proliferación de linfocitos T en ensayos *in vitro*. Los Ejemplos 4-9, por ejemplo, comparan la capacidad de proteínas de fusión representativas de la invención que comprenden una secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de una proteína de fusión que comprende el ECD de hCTLA-4 o polipéptido LEA29Y para hacer lo mismo. Algunos de tales polipéptidos pueden inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto *in vivo*, tal como mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de al menos un polipéptido tal a un sujeto que necesita terapia inmunosupresora. Se espera que tales polipéptidos sean útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones del sistema inmunitario en los que se desea la supresión de una respuesta inmunitaria que incluyen, por ejemplo, procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios, procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano), y otros procedimientos descritos en otra parte en el presente documento.

En el presente documento también se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que comprende (i) al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con cualquier secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 y (ii) un residuo de fenilalanina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 70 de dichas secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en el que el polipéptido se une a hCD80 y/o hCD86 o un dominio extracelular de los mismos y/o inhibe una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas, inducción de marcadores de activación, producción de moléculas inflamatorias, inflamación, dolor con la palpación de las articulaciones, dolor, rigidez, niveles en suero de proteína reactiva C, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta de Ab dependiente de linfocitos T, etc.) en ensayos *in vitro* y/o procedimientos *in vivo*. Algunos de tales polipéptidos comprenden uno o más de los siguientes con respecto a la secuencia seleccionada: un residuo de ácido glutámico en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 24; un residuo de asparagina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 30; un residuo de isoleucina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 32; un residuo de metionina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 50; un residuo de lisina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 54; un residuo de ácido glutámico en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 55; un residuo de ácido aspártico en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 56; un residuo de prolina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 64; un residuo de serina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 104. Se espera que tales polipéptidos sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones, que incluyen procedimientos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos para inhibir trasplante de injerto de órgano, célula o tejido.

En el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que comprende (i) al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 36-46 y 55, y (ii) un residuo de ácido glutámico en una posición de aminoácido 55 de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada, en el que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos y/o suprime una respuesta inmunitaria. Respuestas inmunitarias que pueden ser suprimidas incluyen, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de moléculas inflamatorias, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta de Ab dependiente de linfocitos T). Tal secuencia de polipéptidos puede comprender además un residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 70. Tal secuencia de polipéptidos puede comprender además un residuo de prolina en la posición 64 y/o un residuo de asparagina en la posición 30. Tal secuencia de polipéptidos puede comprender además un residuo de metionina en la posición 50 y/o un residuo de lisina en la posición 54.

En el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que comprende (i) al menos el 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 28, 30, 36-46, 55-57 y 65-73, y (ii) un residuo de ácido glutámico en una posición de aminoácido 55 de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada, en el que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos y/o suprime una respuesta inmunitaria, tal como activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de moléculas inflamatorias, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta de Ab dependiente de linfocitos T. Tal secuencia de polipéptidos puede comprender además un residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 70. Tal secuencia de polipéptidos puede comprender además un residuo de prolina en la posición 64 y/o un residuo de asparagina en la posición 30. Tal secuencia de polipéptidos puede comprender además un residuo de metionina en la posición 50 y/o un residuo de lisina en la posición 54.

Cualquier polipéptido de la divulgación descrito anteriormente puede incluir adicionalmente un péptido que facilita la secreción de dicho polipéptido. Por tanto, en el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende (a) cualquier polipéptido como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante descrito anteriormente), y (b) un péptido que facilita la secreción del polipéptido expresado a partir de una célula huésped. El péptido es opcionalmente un péptido señal. El extremo C del péptido señal está normalmente ligado covalentemente al extremo N del polipéptido. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 182 o SEC ID N°: 216. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos 1-35, 1-36 ó 1-37 de SEC ID N°: 160.

Cualquier polipéptido de la divulgación descrito anteriormente puede comprender además un dominio transmembrana y/o dominio citoplásmico. Por tanto, en el presente documento se desvela proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende (a) cualquier polipéptido de la divulgación descrito anteriormente (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante descrito anteriormente), y (b) un dominio transmembrana. Tal proteína puede comprender opcionalmente además un péptido señal como se ha descrito anteriormente, en el que el extremo C del péptido señal está ligado covalentemente al extremo N del polipéptido de la divulgación. El extremo C del péptido señal está normalmente ligado covalentemente al extremo N del dominio transmembrana. El extremo C del dominio transmembrana está normalmente ligado covalentemente al extremo N del dominio citoplásmico. En algunos casos, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos 162-182 de SEC ID N°: 160. En algunos casos, el dominio citoplásmico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos 183-223 de SEC ID N°: 160. Cualquiera de los polipéptidos anteriormente descritos puede comprender uno o más de los residuos de aminoácidos que están glucosilados o pegilados.

En el presente documento también se desvelan multímeros de polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden dos o más polipéptidos, en los que al menos uno de los polipéptidos del multímero es un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación como se describe en el presente documento (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante). Un multímero tal comprende al menos un polipéptido de la divulgación y puede comprender además al menos un polipéptido adicional que no necesita ser un polipéptido de la divulgación. Por ejemplo, el multímero puede comprender al menos un polipéptido de la divulgación y al menos otro polipéptido que puede ser, por ejemplo, un polipéptido natural (por ejemplo, ECD de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig) y/o al menos otro polipéptido mutante (tal como un polipéptido mutante que no es un polipéptido de la invención). Algunos o todos de los polipéptidos en el multímero (o polipéptido multimérico) pueden ser idénticos entre sí o, en algunos casos, todos los polipéptidos en el multímero pueden ser diferentes entre sí. En algunos casos, el multímero de polipéptidos es un dímero que comprende dos polipéptidos de la divulgación, que opcionalmente pueden ser polipéptidos idénticos (es

decir, homodímero) o polipéptidos diferentes (es decir, heterodímero). En algunos casos, el multímero de polipéptidos es un tetrámero que comprende cuatro polipéptidos de la divulgación. El tetrámero puede comprender cuatro polipéptidos idénticos (es decir, homotetrámero) o cualquier combinación de cuatro polipéptidos de la divulgación de forma que al menos un polipéptido no sea idéntico a los otros tres polipéptidos (es decir, heterotetrámero). En el presente documento también se desvela un tetrámero que comprende cuatro polipéptidos del ECD de CTLA-4 WT idénticos (por ejemplo, ECD de hCTLA-4) o cuatro CTLA-4-Ig WT idénticos (por ejemplo, hCTLA-4-Ig). En algunos casos, el multímero puede unirse a CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera de ellos o ambos) y/o suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria en procedimientos *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, proliferación o activación de linfocitos T, producción de citocinas, etc.). Algunos de tales multímeros tienen mayor capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria *in vitro* y/o *in vivo* que hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2 o la proteína Orenicia®). Los polipéptidos de los multímeros pueden ligarse juntos, tal como por enlaces covalentes, tal como mediante enlaces disulfuro entre uno o más residuos de cisteína en el uno o más polipéptidos.

Algunos de tales tetrámeros de la divulgación comprenden una estructura esquemáticamente similar a la de un anticuerpo, pero en el que los dominios variables del anticuerpo están cada uno sustituidos con cualquier polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación descrito en el presente documento. La cadena pesada de un anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) fusionado con un dominio CH1 de inmunoglobulina (Ig) (por ejemplo, CH1 de IgG2), que está fusionado con una bisagra. La bisagra está fusionada con un dominio CH2 de Ig (por ejemplo, CH2 de IgG2), que está fusionado con un dominio CH3 de Ig (por ejemplo, CH3 de IgG2). La cadena ligera de un anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (V_L) fusionado con un dominio C kappa (C_K) o C lambda (C_λ) de Ig. Dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras están ligadas covalentemente juntas por uno o más enlaces disulfuro formados mediante residuos de cisteína en las cadenas pesadas y ligeras. En el presente documento también se desvela un tetrámero de CTLA-4 mutante en el que cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras está sustituido con un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación. Por tanto, tal tetrámero comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante fusionado con un dominio C_K o C_λ de Ig. Cada cadena pesada comprende un ECD de CTLA-4 mutante fusionado con un dominio CH1 de Ig (por ejemplo, CH1 de IgG2), que está fusionado con una bisagra. La bisagra está fusionada con un dominio CH2 de Ig (por ejemplo, CH2 de IgG2), que está fusionado con un dominio CH3 de Ig (por ejemplo, CH3 de IgG2). Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras están ligadas covalentemente juntas por uno o más enlaces disulfuro formados mediante residuos de cisteína en las cadenas pesadas y ligeras. Tal tetrámero puede describirse como un tetrámero de CTLA-4-Ig. Los procedimientos para construir tal tetrámero de CTLA-4-Ig son conocidos y serían entendidos por aquellos expertos en la materia. Una construcción de CD4-Ig tetramérica, que comprende un polipéptido de CD4 y que neutraliza cepas aisladas de tipo 1 del VIH primarias, se describe en Allaway, G.P. y col., AIDS Res. Hum. Retroviruses 11(5):533-9 (1995). El tetrámero puede comprender cuatro polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante idénticos o cualquier combinación de cuatro polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación de forma que al menos un ECD de CTLA-4 mutante no sea idéntico a los otros tres polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante. Algunos de tales tetrámeros pueden unirse a CD80 y/CD86 con una mayor avidéz de unión que hCTLA-4 (o hCTLA-4-Ig). Algunos de tales tetrámeros pueden suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria; en algunos casos, un tetrámero tal tiene una mayor capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria en ensayos *in vitro* o aplicaciones *in vivo* (por ejemplo, proliferación o activación de linfocitos T, producción de citocinas, etc.) que hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2 u Orenicia®). Se espera que los multímeros de la divulgación sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones que incluyen procedimientos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos para inhibir trasplante de injerto de órgano, célula o tejido.

En el presente documento también se desvelan multímeros conjugados aislados o recombinantes que comprenden dos o más conjugados, en los que al menos uno de los conjugados es un conjugado de la divulgación que comprende un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante). Algunos o todos de los conjugados en el multímero pueden ser idénticos entre sí, o todos los conjugados en el multímero pueden ser diferentes entre sí. En algunos casos, el multímero conjugado es un dímero que comprende dos conjugados o un tetrámero que comprende cuatro conjugados de la divulgación. Algunos de tales conjugados multímeros pueden unirse a CD80 y/CD86 (o un ECD de cualquiera de ellos o ambos) y/o suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria *in vitro* y/o *in vivo*. Moléculas conjugadas en multímeros pueden ligarse juntas, tal como por enlaces covalentes, tal como mediante enlaces disulfuro entre uno o más residuos de cisteína en los uno o más conjugados.

En el presente documento también se desvela un dímero de polipéptidos aislado o recombinante que comprende dos cualesquiera de los polipéptidos de la divulgación descritos anteriormente (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante descrito anteriormente), en el que el dímero tiene una avidéz de unión por CD86 humano o un dominio extracelular del mismo que es aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de un dímero que comprende dos dominios extracelulares de CTLA-4 humano por CD86 humano o un dominio extracelular del mismo, respectivamente.

En el presente documento se desvelan dímeros de polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden dos polipéptidos de la divulgación descritos anteriormente (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante descrito anteriormente), en los que el dímero tiene una avidéz de unión por hCD80 o un ECD del mismo que es

aproximadamente igual a o mayor que la avidez de unión de un dímero que comprende dos polipéptidos del ECD de hCTLA-4 (SEC ID N°: 159) por hCD80 o un ECD del mismo, respectivamente.

5 En algunos casos, el dímero tiene una avidez de unión por hCD80 o un ECD del mismo que es aproximadamente igual a o mayor que la avidez de unión de un dímero que comprende dos polipéptidos del ECD de hCTLA-4 por hCD80 o un ECD del mismo, respectivamente. En algunos casos, el dímero tiene una avidez de unión por hCD86 o un ECD del mismo que es mayor que la avidez de unión de un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y por hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168. En algunos casos, el dímero se disocia de la unión a hCD86 o un ECD del mismo a una velocidad que es inferior a la velocidad a la que un dímero que comprende dos polipéptidos del ECD de hCTLA-4 se disocia de la unión de hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente. En algunos casos, el dímero se disocia de la unión a hCD86 o un ECD del mismo a una velocidad que es inferior a la velocidad a la que un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y se disocia de la unión a hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168.

15 En algunos casos, el dímero se asocia con hCD86 o un ECD del mismo a una velocidad que es mayor que la velocidad a la que un dímero que comprende dos polipéptidos del ECD de hCTLA-4 se asocia con hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente. En algunos casos, el dímero se asocia con hCD86 o un ECD del mismo a una velocidad que es mayor que la velocidad a la que un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y se asocia con hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168.

20 En algunos casos, tal dímero que comprende un ECD de CTLA-4 mutante tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citocinas, etc.) que un dímero que comprende dos dominios extracelulares de CTLA-4 humano o dos polipéptidos LEA29Y.

25 Algunos de tales dímeros tienen una constante de disociación en equilibrio de CD86 (K_D) que es inferior a la constante de disociación en equilibrio de CD86 (K_D) de un dímero que comprende dos polipéptidos del ECD de hCTLA-4 o dos polipéptidos LEA29Y. Algunos de tales dímeros tienen una constante de disociación en equilibrio de CD86 (K_D) que es inferior a la constante de disociación en equilibrio de CD86 (K_D) de un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y, comprendiendo cada polipéptido LEA29Y la secuencia de polipéptidos expuesta en SEC ID N°: 168.

30 Algunos de tales multímeros que comprenden al menos dos polipéptidos de la divulgación (por ejemplo, un dímero que comprende dos polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación tiene una capacidad potenciada para suprimir una respuesta inmunitaria en comparación con un multímero de hCTLA-4 de longitud completa de la misma valencia (es decir, un multímero que comprende el mismo número de polipéptidos CTLA-4 de longitud completa). Algunos de tales multímeros que comprenden al menos dos polipéptidos de la divulgación tienen una capacidad potenciada para suprimir una respuesta inmunitaria en comparación con un multímero del ECD de hCTLA-4 de la misma valencia (es decir, un multímero que comprende el mismo número de polipéptidos del ECD de hCTLA-4).

35 Cualquier polipéptido de la divulgación descrito anteriormente puede comprender además una secuencia de polipéptidos adicional que potencia la solubilidad, tal como una secuencia de polipéptidos de inmunoglobulina (Ig), formando así, por ejemplo, una proteína de fusión soluble, como se trata en mayor detalle más adelante. Cada polipéptido de un multímero de polipéptidos puede comprender además una secuencia de polipéptidos adicional que potencia la solubilidad, tal como una secuencia de polipéptidos de Ig, formándose así, por ejemplo, una proteína de fusión soluble. Por tanto, por ejemplo, cada polipéptido de un dímero que comprende dos o más polipéptidos de la divulgación como se ha descrito anteriormente puede comprender además una secuencia de polipéptidos adicional que potencia la solubilidad, tal como una secuencia de polipéptidos de Ig, formándose así, por ejemplo, una proteína de fusión soluble.

45 Se espera que tales polipéptidos y dímeros de la divulgación sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones, que incluyen procedimientos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos para inhibir trasplante de injerto de órgano, célula o tejido.

50 Como se trata previamente, la secuencia de proteínas de hCTLA-4 madura normalmente empieza con el residuo de metionina en la posición de aminoácido 38 de la secuencia de proteínas hCTLA-4 de longitud completa mostrada en SEC ID N°: 160, y los residuos de aminoácidos de la secuencia de proteínas de hCTLA-4 madura se numeran normalmente empezando con este residuo de metionina como el primer aminoácido (es decir, que ocupa la posición de aminoácido 1).

55 Algunos polipéptidos CTLA-4 mutantes de la divulgación (incluyendo proteínas de fusión monoméricas y diméricas y polipéptidos multiméricos) incluyen al menos una sustitución de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente a una posición de aminoácido en la secuencia de proteínas de hCTLA-4 madura que está fuera de la superficie de separación de unión de hCTLA-4/hB7-2 clásica (véase, por ejemplo, Schwartz y col., Nature 410:604-608 (2001)), que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, cualquiera de las posiciones de aminoácido 24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70 y 85. En general, un experto en la materia no hubiera previsto que una sustitución de

aminoácidos en cualquiera de las posiciones anteriormente mencionadas (24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70 y/o 85) o cualquier combinación de una o más sustituciones seleccionadas del grupo de posiciones 24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70 y 85 tuviera una capacidad para potenciar la afinidad o avidez de unión de hCTLA-4 por hB7-2, tuviera una capacidad potenciada para inhibir la interacción de células positivas para CD28 con positivas para B7-2, o proporcionara una mayor capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria que, por ejemplo, ECD de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas, inducción de marcadores de activación, síntesis o producción de moléculas inflamatorias, producción de anticuerpos anti-colágeno, respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T y similares). Además, un experto en la materia no hubiera previsto que una sustitución (sustituciones) de aminoácidos particular(es) o combinación de sustituciones de aminoácidos particulares descrita en el presente documento en cualquiera de las posiciones anteriormente mencionadas (24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70 y/o 85) o cualquier combinación de tales posiciones tuviera capacidad para potenciar la afinidad o avidez de unión de hCTLA-4 por hB7-2, tuviera una capacidad potenciada para inhibir la interacción de células positivas para CD28 con positivas para B7-2, o proporciona una mayor capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria que, por ejemplo, ECD de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig.

15 Proteínas de fusión de CTLA-4 mutante

También se desvelan proteínas de fusión aisladas y recombinantes novedosas que comprenden un primer polipéptido que es al menos uno de los polipéptidos de la divulgación descritos anteriormente y en todo el presente documento (tal como un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación tal como, por ejemplo, un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante) ligado o fusionado con un segundo polipéptido, formándose así una proteína de fusión. El segundo polipéptido normalmente facilita la secreción o expresión del primer polipéptido. Polipéptidos a modo de ejemplo del ECD de CTLA-4 mutante incluyen aquellos que comprenden secuencias identificadas como SEC ID N°: 1-73. También se desvelan proteínas de fusión que comprenden dominios de inmunoglobulina (Ig) tales como dominios de Fc de Ig fusionados o unidos con restos activos biológicos de la invención tales como polipéptidos CTLA-4 mutantes de la divulgación. Se cree que las proteínas de fusión de la divulgación son útiles como agentes profilácticos y/o terapéuticos para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una variedad de enfermedades y trastornos y afecciones del sistema inmunitario en inmunomodulación y/o inmunosupresión es de beneficio, en ensayos de diagnóstico y para la preparación de medicamentos o agentes que tienen actividades o propiedades inmunomoduladoras y/o inmunosupresoras como se tratan en mayor detalle en otra parte en el presente documento.

Las proteínas de fusión de la divulgación que comprenden un polipéptido CTLA-4 mutante y un polipéptido de Ig (por ejemplo, Fc de Ig) se llaman típicamente proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. Cualquiera de las proteínas de fusión de la divulgación que incluyen proteínas de fusión monoméricas y diméricas de la divulgación descritas en mayor detalle más adelante y en los ejemplos puede comprender un polipéptido de Ig, tal como, por ejemplo, un polipéptido del Fc de Ig, como se describe en el presente documento y en otra parte anteriormente y más adelante. El segundo polipéptido puede ligarse directamente al primer polipéptido. Por ejemplo, el extremo N del segundo polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de Ig tal como un polipéptido del Fc de Ig) puede fusionarse covalentemente directamente con el extremo C del primer polipéptido de la divulgación (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante). Alternativamente, el segundo polipéptido puede ligarse indirectamente al primer polipéptido, tal como cuando una secuencia de aminoácidos de ligador que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más residuos de aminoácidos se incluye entre el primer y segundo polipéptidos. En los casos en los que un ligador se incluye, el extremo N de la secuencia del ligador de aminoácidos está normalmente covalentemente fusionado con el extremo C del primer polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) y el extremo N del segundo polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de Ig tal como un Fc de Ig) está normalmente covalentemente fusionado con el extremo C de la secuencia del ligador de aminoácidos.

En algunos casos, el segundo polipéptido comprende al menos una parte de un polipéptido de Ig tal como, por ejemplo, uno o más dominios de una región constante de la cadena pesada de Ig. El segundo polipéptido puede comprender una región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un polipéptido de Ig. En algunos casos, el segundo polipéptido comprende un dominio Fc de un polipéptido de Ig WT (es decir, polipéptido del Fc de Ig WT) tal como, por ejemplo, un dominio Fc de un polipéptido de Ig humana WT (es decir, polipéptido del Fc de Ig humana WT). Como se trata en otra parte, el polipéptido de Ig puede ser de diversas especies que incluyen, por ejemplo, mamífero, por ejemplo, ser humano, ratón, primate no humano (por ejemplo, mono, gorila), gato, perro, caballo, etc., y puede ser de diversas clases (por ejemplo, IgG, IgM, IgE, etc.) y subclases (por ejemplo, para IgG incluyen IgG1, IgG2, IgG4, etc.) y pueden comprender un dominio Fc o porción de cualquiera de tal polipéptido de Ig. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de polipéptidos de Ig de tales diversas especies se conocen en la técnica.

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión aisladas o recombinantes novedosas que comprenden cada una un polipéptido CTLA-4 mutante aislado o recombinante de los desvelados descritos anteriormente (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) covalentemente ligado o fusionado, tanto directamente como indirectamente (mediante una secuencia ligadora de aminoácidos), en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de Ig, es decir, el dominio Fc de un polipéptido de Ig. Cualquiera de las proteínas de fusión de las desveladas que incluyen proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas y diméricas de las desveladas descritas en mayor detalle más adelante y en los ejemplos puede comprender un polipéptido del Fc de Ig como se describe en el presente documento y en otra parte anteriormente y más adelante. Un polipéptido del Fc de Ig normalmente

comprende la región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 del polipéptido de Ig. El polipéptido del Fc de Ig puede derivarse de diversas especies que incluyen, por ejemplo, ser humano, ratón, primate, etc., y pueden comprender un polipéptido natural de Fc de Ig (por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG4 WT). Polipéptidos del Fc de IgG humana a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, IgG1 humana, IgG2 humana, IgG4 humana, etc. La secuencia de polipéptidos del Fc de IgG1 humana a modo de ejemplo se expone en SEC ID N°: 185. Las secuencias de polipéptidos de polipéptidos del Fc de IgG2 humana a modo de ejemplo se exponen en SEC ID N°: 184 y 218, respectivamente. Alternativamente, el polipéptido del Fc de Ig puede comprender un polipéptido de Ig mutante. Por ejemplo, un Fc de IgG1 mutante en el que uno o más residuos de cisteína han sido sustituidos con otro aminoácido (por ejemplo, un residuo de serina), eliminándose así uno o más enlaces disulfuro formados entre dos cadenas de Ig, o en el que uno o más residuos de prolina están sustituidos con otro aminoácido (por ejemplo, prolina) para reducir la función efectora (unión a receptor de Fc reducida), puede incluirse en una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante. La secuencia de polipéptidos de un polipéptido del Fc de IgG1 mutante a modo de ejemplo se muestra en SEC ID N°: 186. La divulgación en el presente documento desvela una proteína de fusión aislada o recombinante tal como un dímero de CTLA-4-Ig mutante o monómero de CTLA-4-Ig mutante que comprende al menos un polipéptido CTLA-4 mutante recombinante descrito anteriormente ligado en su extremo C al extremo N de un polipéptido del Fc de Ig recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184 (polipéptido del Fc de IgG2 humana), 185 (polipéptido del Fc de IgG1 humana), 186 (polipéptido del Fc de IgG1 mutante) y 218 (polipéptido del Fc de IgG2 humana sin residuo de lisina (K) del extremo C).

En un aspecto, la secuencia de polipéptidos predicha de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la desvelada comprende los siguientes segmentos: una secuencia de péptidos señal que facilita la secreción de la proteína de fusión (por ejemplo, péptido señal de hCTLA-4 (SEC ID N°: 182 o SEC ID N°: 216)); un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante que normalmente comprende, pero no necesariamente, de aproximadamente 118 a 130 residuos de aminoácidos, y normalmente aproximadamente 124 residuos de aminoácidos de longitud; y un polipéptido del Fc de Ig. Polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo incluyen aquellos descritos anteriormente y más adelante. En algunos casos no se incluye secuencia ligadora de aminoácidos entre el extremo C del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante y el extremo N del polipéptido del Fc de Ig humana; es decir, el extremo C de un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante está covalentemente fusionado directamente con el extremo N del polipéptido del Fc de Ig en el proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante. Sin embargo, si se desea, una CTLA-4-Ig mutante puede incluir un ligador (por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos) entre el extremo C del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante y el extremo N del polipéptido del Fc de Ig humana. El péptido señal de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante monomérica predicha de la desvelada se escinde normalmente del extremo N de la proteína de fusión CTLA-4 Ig mutante durante el procesamiento y, por tanto, la forma madura o secretada de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la desvelada no incluye normalmente una secuencia de péptidos señal. Un dímero de proteínas de fusión que comprende dos de tales proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas se forma normalmente durante el procesamiento celular por la creación de enlaces disulfuro covalentes entre (1) residuos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y Fc de IgG2 de una proteína de fusión monomérica tal y (2) residuos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y Fc de IgG2 de la segunda (normalmente, pero no necesariamente idéntica) proteína de fusión monomérica.

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión díméricas (también llamadas dímero de proteínas de fusión) que comprenden cada una dos proteínas de fusión monoméricas de la divulgación. El dímero puede comprender dos proteínas de fusión monoméricas idénticas o diferentes. La proteína de fusión dímica se forma por un enlace(s) entre las dos proteínas de fusión monoméricas. Una proteína de fusión dímica que comprende dos de tales proteínas de fusión monoméricas se forma normalmente durante el procesamiento celular por la generación de enlaces disulfuro covalentes entre residuos de cisteína en una proteína de fusión monomérica y residuos de cisteína en la segunda proteína de fusión monomérica. Por tanto, en algunos casos, una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la divulgación se expresa como un dímero que comprende dos proteínas de fusión monoméricas de la divulgación.

En el presente documento se desvela una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante dímica aislada o recombinante que comprende dos proteínas de fusión monoméricas, comprendiendo cada proteína de fusión monomérica un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación, como se describe en detalle anteriormente y adicionalmente más adelante, fusionado en su extremo C con un polipéptido del Fc de Ig. El dímero se forma durante el procesamiento celular por la generación de enlaces disulfuro covalentes entre residuos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y Fc de Ig de una proteína de fusión monomérica y residuos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y Fc de Ig de la segunda proteína de fusión monomérica. Las dos proteínas de fusión monoméricas normalmente comprenden, pero no necesariamente, secuencias idénticas. La forma secretada o madura de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante no incluye un péptido señal, ya que el péptido señal se escinde normalmente del extremo N de la proteína durante el procesamiento. La fusión CTLA-4-Ig mutante predicha incluye un péptido señal, cuyo extremo C está normalmente ligado covalentemente al extremo N de la proteína CTLA-4-Ig mutante. El extremo N de cada monómero de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante madura normalmente comprende una metionina (M).

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión diméricas que comprenden dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig monoméricas, en las que cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante monomérica comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante ligado en su extremo C al extremo N de un polipéptido del Fc de Ig, en las que el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada de cualquiera de SEC ID N°: 1-73. En algunas de tales proteínas de fusión diméricas, las dos proteínas de fusión monoméricas están ligadas covalentemente juntas por un enlace disulfuro covalente formado durante el procesamiento celular entre un residuo de cisteína en la posición 120 en cada secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante. Alternativamente, o además, las dos proteínas de fusión monoméricas están ligadas covalentemente juntas por un enlace disulfuro covalente formado entre uno o más residuos de cisteína en el polipéptido del Fc de Ig de la primera proteína de fusión monomérica y uno o más residuos de cisteína en el polipéptido del Fc de Ig de la segunda proteína de fusión monomérica. Las proteínas de fusión monoméricas pueden ligarse juntas por múltiples enlaces disulfuro (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más enlaces disulfuro) formados durante el procesamiento celular entre residuos de cisteína presentes en sus polipéptidos del Fc de Ig respectivos. En algunos casos, cada proteína de fusión monomérica comprende el mismo polipéptido del Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2 humana como se muestra en, por ejemplo, SEC ID N°: 184 ó 218), y enlace(s) disulfuro covalente(s) puede(n) generarse durante el procesamiento celular entre residuos de cisteína en posiciones equivalentes en cada polipéptido del Fc de Ig.

Un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo es el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante D3-12 que comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 11. Una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo de la divulgación es el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante D3-12 covalentemente ligado o fusionado directamente (sin ligador) en su extremo C con el extremo N del polipéptido del Fc de IgG2 humana mostrada en SEC ID N°: 218, formándose así la proteína de fusión D3-12-IgG2 mostrada en SEC ID N°: 205, o covalentemente ligado o fusionado directamente (sin ligador) en su extremo C con el extremo N del polipéptido del Fc de IgG2 humana mostrada en SEC ID N°: 184, formándose así la proteína de fusión D3-12-IgG2 mostrada en SEC ID N°: 74. La secuencia de SEC ID N°: 74 se diferencia de la de SEC ID N°: 205 por un residuo - es decir, un residuo de lisina adicional está presente en el extremo C de SEC ID N°: 74. Los presentes inventores han encontrado experimentalmente por análisis de espectrometría de masas con cromatografía líquida (EM-CL), o similares, que una proteína de fusión madura CTLA-4-Ig preparada en células CHO transfectando un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ECD de CTLA-4 mutante tal como, por ejemplo, la secuencia de polipéptidos del ECD de D3-12 mostrada en SEC ID N°: 11, y el polipéptido del Fc de hIgG2 mostrado en SEC ID N°: 184 no incluye normalmente el residuo de lisina (K) previsto del extremo C, como cabría esperar basándose en la secuencia de Fc de hIgG2 mostrada en SEC ID N°: 184.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 153 codifica el péptido señal de hCTLA-4 y la proteína de fusión D3-12-IgG2 e incluye el codón de terminación TAA en su extremo C. El codón AAA, que codifica un residuo de lisina, precede inmediatamente al codón de terminación TAA en la secuencia de SEC ID N°: 153. La secuencia de polipéptidos predicha de una proteína de fusión D3-12-IgG2 madura producida transfectando un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 153 en células CHO se muestra en SEC ID N°: 74. El péptido señal está ausente en la forma madura de la proteína de fusión D3-12-IgG2, ya que se ha escindido durante el procesamiento para formar la proteína de fusión madura. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado, basándose en análisis de EM-CL, que en tales casos la D3-12-IgG2 madura no incluye normalmente el residuo de lisina del extremo C previsto, como cabría esperar basándose en la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 153. Más bien, la secuencia de polipéptidos de D3-12-IgG2 madura resultante producida por tal procedimiento es la mostrada en SEC ID N°: 205. Se cree que la lisina del extremo C del polipéptido del Fc de IgG2 se escinde durante el procesamiento o antes de la secreción.

Se cree que la producción de la proteína D3-12-IgG2 usando otra línea celular de mamífero por transfección de tal vector que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 153 en tal célula de mamífero (por ejemplo, células COS y similares) produciría una proteína de fusión D3-12-IgG2 similar que carece del residuo de lisina del extremo C previsto en virtud de procesamiento análogo o mecanismo de secreción.

La proteína de fusión D3-12-IgG2 dimérica comprende dos monómeros de D3-12-IgG2 tales ligados juntos por uno o más enlaces disulfuro formados durante el procesamiento celular por la generación de enlaces disulfuro covalentes entre residuos de cisteína. D3-12-IgG2 y otras proteínas de fusión de la divulgación pueden prepararse, por ejemplo, usando procedimientos expuestos en el Ejemplo 3. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido D3-12 (por ejemplo, SEC ID N°: 90) puede clonarse en el vector de fusión de Fc de IgG2, células de mamífero pueden transfectarse con el vector y la proteína de fusión resultante puede expresarse (normalmente en forma dimérica), purificarse y evaluarse como se describe en el Ejemplo 3.

Otro polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo es el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante D3-54 que comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 36, y una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo comprende el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante D3-54 covalentemente ligado o fusionado directamente (sin ligador) en su extremo C con el extremo N del polipéptido del Fc de hIgG2 mostrado en SEC ID N°: 218 (sin la lisina del extremo C), formándose así la proteína de fusión D3-54-IgG2 mostrada en SEC ID N°: 211, o covalentemente ligado o fusionado directamente (sin ligador) en su extremo C con el extremo N del polipéptido del Fc de hIgG2 mostrado en SEC ID N°: 184 (con la lisina del extremo C), formándose así la proteína de fusión D3-54-

IgG2 mostrada en SEC ID N°: 197. Como se ha tratado anteriormente, el análisis experimental indica que la proteína de fusión D3-54-IgG2 madura preparada en células CHO no incluye normalmente el residuo de lisina del extremo C previsto. Se cree que la lisina del extremo C de Fc de hIgG2 se escinde durante el procesamiento o antes de la secreción, produciendo la secuencia de la proteína de fusión D3-54-IgG2 mostrada en SEC ID N°: 211. Además, como se observa anteriormente, D3-29-IgG2 puede prepararse usando procedimientos del Ejemplo 3. La proteína de fusión D3-54-IgG2 dimérica comprende dos monómeros de D3-54-IgG2 ligados juntos por uno o más enlaces disulfuro formados durante el procesamiento celular por la generación de enlaces disulfuro covalentes entre residuos de cisteína. La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID N°: 201 codifica las proteínas de fusión mostradas en SEC ID N°: 197 y 211.

Otras proteínas de fusión de la divulgación pueden comprender similarmente un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante ligado o fusionado con hIgG2 (SEC ID N°: 218 ó 184). Proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes maduras a modo de ejemplo de la divulgación incluyen, por ejemplo, las secuencias de polipéptidos de cada una de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222. Cada una de las secuencias de polipéptidos de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222 incluye un residuo de lisina del extremo C; este residuo de lisina del extremo C se escinde normalmente durante el procesamiento o antes de la secreción, produciendo las secuencias de polipéptidos sin la lisina del extremo C mostradas en SEC ID N°: 205-210, 211-214, 219 y 221, respectivamente.

La Figura 10 es un diagrama esquemático que muestra una configuración o estructura a modo de ejemplo de una proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante a modo de ejemplo de la divulgación. Dos proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes monoméricas idénticas se muestran esquemáticamente, comprendiendo cada una un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante maduro covalentemente ligado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG2 humana. Cada polipéptido de IgG2 humana incluye una bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de IgG2 humana. También se muestran residuos de aminoácidos a modo de ejemplo presentes en las uniones entre el ECD y los polipéptidos del Fc de Ig. Los residuos de aminoácidos en las uniones entre estos componentes pueden diferenciarse dependiendo de la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante y/o secuencia de polipéptidos de Ig. Esta proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante dimérica resulta de la formación de al menos un enlace disulfuro entre residuos de cisteína en posiciones análogas en los dos monómeros de proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes. Los residuos de cisteína (C) posiblemente implicados en la formación de enlaces disulfuro entre los dos monómeros están marcados con asteriscos. El péptido señal de cada proteína de fusión monomérica se escinde normalmente durante el procesamiento y, por tanto, la proteína de fusión (madura) secretada normalmente no incluye la secuencia de péptidos señal. La secuencia de polipéptidos del polipéptido de IgG2 humana, que comprende la bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de IgG2 humana, se muestra en SEC ID N°: 184. En un aspecto alternativo, la secuencia de polipéptidos del polipéptido de IgG2 humana, que comprende la bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de IgG2 humana, se muestra en SEC ID N°: 218; en este caso, el polipéptido de IgG2 no incluye el residuo de lisina (K) del extremo C, con respecto a la secuencia de SEC ID N°: 184.

Las propiedades de las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes de la divulgación, descritas en detalle en otra parte, pueden compararse con las propiedades de una o más proteínas de fusión de Ig de referencia tales como, por ejemplo, hCTLA-4-IgG1, hCTLA-4-IgG2, proteína de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig. Las propiedades que pueden compararse incluyen, por ejemplo, capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citocinas, etc.). La proteína de fusión hCTLA-4-IgG1 madura normalmente existe en disolución como un dímero de proteínas de fusión hCTLA-4-IgG1 que comprende dos proteínas hCTLA-4-IgG1 monoméricas idénticas, comprendiendo cada proteína de fusión hCTLA-4-IgG1 monomérica un polipéptido del ECD de hCTLA-4 (SEC ID N°: 159) ligado a un polipéptido del Fc de IgG1. La proteína de fusión madura hCTLA-4-IgG2 normalmente existe en disolución como un dímero de proteínas de fusión hCTLA-4-IgG2 que comprende dos proteínas hCTLA-4-IgG2 monoméricas idénticas, comprendiendo cada proteína de fusión hCTLA-4-IgG2 monomérica (SEC ID N°: 162) un polipéptido del ECD de hCTLA-4 (SEC ID N°: 159) ligado a un polipéptido del Fc de IgG2. La proteína de fusión Orenicia® madura es un dímero de proteínas de fusión que comprende dos proteínas de fusión Orenicia® monoméricas idénticas, comprendiendo cada proteína de fusión monomérica (SEC ID N°: 164) un polipéptido del ECD de hCTLA-4 (SEC ID N°: 159) ligado a un polipéptido de IgG1 mutante específico (SEC ID N°: 186). La proteína de fusión madura LEA29Y-Ig normalmente existe en disolución como un dímero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig que comprende dos proteínas de fusión LEA29Y-Ig monoméricas idénticas, comprendiendo cada proteína de fusión monomérica LEA29Y-Ig (SEC ID N°: 166) un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante específico (SEC ID N°: 168) ligado a un polipéptido de IgG1 mutante específico (SEC ID N°: 186). Se cree que los dos monómeros de proteína de fusión del dímero Orenicia® están ligados covalentemente juntos por un único enlace disulfuro formado entre el residuo de cisteína en la posición 120 de cada monómero de hCTLA-4-IgG1 mutante y que no se forman enlaces disulfuro entre los dos polipéptidos del Fc de IgG1 mutante.

Algunas proteínas de fusión CTLA-4 mutantes se unen a CD80 (por ejemplo, hCD80) y/o CD86 (por ejemplo, hCD86). Algunas de tales proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes se unen a una proteína de fusión CD80-Ig y/o una proteína de fusión CD86-Ig. Proteínas de fusión CD80-Ig a modo de ejemplo incluyen la proteína de fusión hCD80-mIg (SEC ID N°: 225) que comprende un ECD de CD80 humano ligado a un polipéptido del Fc de Ig murino; y la proteína de fusión hCD80-hIgG1 (SEC ID N°: 171), que comprende la secuencia de ECD de hCD80 ligado al polipéptido del Fc de IgG1 humana. Proteínas de fusión CD86-Ig a modo de ejemplo incluyen la proteína de fusión hCD86-mIg (SEC ID N°: 226), que comprende un ECD de hCD86 (SEC ID N°: 180) ligado a un polipéptido del Fc de

Ig murina; y la proteína de fusión hCD86-hIgG1 madura (SEC ID N°: 178), que comprende la secuencia de ECD de hCD86 (SEC ID N°: 180) ligada al polipéptido del Fc de IgG1 humana (SEC ID N°: 185). Secuencias de ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican proteínas de fusión hCD86-mIg y hCD80-mIg se muestran en SEC ID N°: 227 y 228, respectivamente.

5 En el presente documento se desvela una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, y (b) un polipéptido del Fc de Ig (por ejemplo, Fc de hIgG2), en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86, y/o proteína de fusión CD80-Ig y/o CD86-Ig, y/o presenta una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria. El polipéptido del Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 184, 185, 186 y 218. En algunos casos, el extremo C del polipéptido de (a) está ligado covalentemente al extremo N del polipéptido del Fc de Ig de (b). Algunas de tales proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes se unen a CD80 y/o CD86 (por ejemplo, hCD80 y/o hCD86), y/o una proteína de fusión CD80-Ig y/o CD86-Ig de mamífero. Una CD80-Ig puede comprender, por ejemplo, un ECD de CD80 humano ligado a un Fc de Ig (por ejemplo, hCD80-Ig). En una realización, una hCD80-Ig es un ECD de CD80 humano ligado a un Fc de Ig humana (hCD80-hIg); en otra realización, un hCD80-Ig es una ECD de CD80 humano ligado a un Fc de Ig murina (hCD80-mIg). En una realización, una hCD86-Ig es un ECD de CD86 humano ligado a un Fc de Ig humana (hCD86-hIg); en otra realización, una hCD86-Ig es un ECD de CD86 humano ligado a un Fc de Ig murina (hCD86-mIg). Algunas de tales proteínas de fusión tienen una capacidad para inhibir o suprimir una o más de una variedad de respuestas inmunitarias tales como, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2) o moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta(s) de Ab dependiente(s) de linfocitos T en ensayos y/o procedimientos *in vitro* y/o *in vivo*. Se espera que tales proteínas de fusión sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones que incluyen procedimientos para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunitario (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias), y procedimientos para inhibir el trasplante de injerto de órgano, célula o tejido, como se trata más adelante.

En el presente documento se desvela un dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes aisladas o recombinantes que comprende dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas ligadas por al menos un enlace disulfuro formado entre dos residuos de cisteína presentes en cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante monomérica. Cada monómero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes comprende: (a) un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, y (b) un polipéptido del Fc de Ig (por ejemplo, Fc de hIgG2), en el que el dímero de proteínas de fusión se une a CD80 y/o CD86, y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig, y/o presenta una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria. En algunos casos, el extremo C del polipéptido de (a) está covalentemente ligado o fusionado con el extremo N del polipéptido del Fc de Ig de (b). El polipéptido del Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184-186 y 218. En algunos casos, el dímero de proteínas de fusión se forma por un enlace disulfuro covalente entre un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 120 de cada secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante, o en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 120 en cada secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante con respecto a la secuencia de polipéptidos del ECD de hCTLA-4 mostrada en SEC ID N°: 159. Algunos de tales dímeros de proteínas de fusión tienen una capacidad para inhibir o suprimir una o más de una variedad de respuestas inmunitarias tales como, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2) o moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta(s) de Ab dependiente(s) de linfocitos T en ensayos y/o procedimientos *in vitro* y/o *in vivo*. Se espera que tales dímeros de proteínas de fusión sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones que incluyen procedimientos para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunitario (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias) y procedimientos para inhibir trasplante de injerto de órgano, célula o tejido, como se trata más adelante.

Algunos de tales monómeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tienen afinidades de unión por hCD86 o ECD de hCD86 que son al menos iguales a o mayores que aquellas de ECD de hCTLA-4 y LEA29 por hCD86 o ECD de hCD86, respectivamente. Véase, por ejemplo, Tabla 5 en el Ejemplo 4. El polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante presente en algunas de tales proteínas de fusión diméricas y monoméricas comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aminoácidos aproximadamente igual a la longitud de aminoácidos del ECD de hCTLA-4. Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene aproximadamente 110 a 138, 112 a 136, 114 a 134, 116 a 132, 118 a 130, 119 a 129, 120 a 128, 121 a 127, 122 a 126 ó 123 a 125 residuos de aminoácidos de longitud. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden una secuencia de 124 residuos de aminoácidos. Polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, aquellos que comprenden una secuencia de

polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en los que tal polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante se une a CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera de ellos o ambos), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria.

5 Algunos de tales dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tienen una avidéz de unión por hCD86 y/o hCD86-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de un dímero de proteínas de fusión hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero Orenicia® y/o dímero LEA29Y-Ig por hCD86 y/o hCD86-Ig, respectivamente. Algunos de tales dímeros de proteínas de fusión tienen una avidéz de unión por hCD86 y/o hCD86-mIg que es 2-10 veces (2x-10x), 5-10 veces (5x-10x), 10-20 veces (10x-20x), 20-40 veces (20x-40x) o superior a 40 veces (>40x) mayor que la avidéz de unión del dímero Orenicia® por hCD86 y/o hCD86-mIg. Véanse, por ejemplo, proteínas de fusión diméricas a modo de ejemplo de la divulgación en la Tabla 3 más adelante. Alternativamente o adicionalmente, algunos de tales dímeros de proteínas de fusión tienen una avidéz de unión por hCD80 y/o hCD80-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de un dímero hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero Orenicia® y/o dímero LEA29Y-Ig por hCD80 y/o hCD80-Ig, respectivamente. Algunos de tales dímeros de proteínas de fusión tienen una avidéz de unión por hCD80 y/o hCD80-mIg que es 0,5-2 veces (0,5x-2x), 2-4 veces (2x-4x) o superior a 2 veces (>2x) mayor que la avidéz de unión del dímero Orenicia® por hCD86 y/o hCD86-mIg. Véanse, por ejemplo, proteínas de fusión dimericas a modo de ejemplo de la divulgación en la Tabla 4 más adelante.

20 Algunos de tales dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes se disocian de la unión a hCD86 y/o hCD86-Ig a una velocidad que es inferior a la velocidad a la que un dímero hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero Orenicia® y/o dímero LEA29Y-Ig se disocia de la unión a hCD86 y/o hCD86-Ig, respectivamente. Algunas de tales proteínas de fusión se asocian con o se unen a hCD86 y/o hCD86-Ig a una velocidad que es al menos igual a o mayor que la velocidad a la que un dímero hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero Orenicia® y/o dímero LEA29Y-Ig se asocia con hCD86 y/o hCD86-Ig, respectivamente. Para algunos de tales dímeros de proteínas de fusión, la constante de disociación en equilibrio (K_D) para la reacción de unión entre CD86 (o CD86-Ig) y el dímero de proteínas de fusión de la invención es inferior a la constante de disociación en equilibrio (K_D) para la reacción de unión entre CD86 (o CD86-Ig) y un dímero hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero Orenicia® y/o dímero LEA29Y-Ig. Véanse, por ejemplo, dímeros de proteínas de fusión a modo de ejemplo de la divulgación en la Tabla 3. Para algunos de tales dímeros de proteínas de fusión, la constante de disociación en equilibrio (K_D) para la reacción de unión entre CD80 (o CD80-Ig) y el dímero de proteínas de fusión de la divulgación es aproximadamente igual a o inferior a la constante de disociación en equilibrio (K_D) para la reacción de unión entre CD80 (o CD80-Ig) y un dímero hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero Orenicia® o dímero LEA29Y-Ig. Véanse, por ejemplo, dímeros de proteínas de fusión a modo de ejemplo de la divulgación en la Tabla 4.

35 Algunos de tales dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tienen una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, inhibir la activación o proliferación de linfocitos T, inhibir la producción de citocinas, etc.) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de un dímero hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero Orenicia® y/o dímero LEA29Y-Ig para inhibir o suprimir dicha respuesta inmunitaria, respectivamente. Por ejemplo, algunos de tales dímeros de proteínas de fusión pueden inhibir la activación de linfocitos T o proliferación de linfocitos T en ensayos *in vitro*. Los Ejemplos 4-9 expuestos más adelante, por ejemplo, demuestran la capacidad de dímeros de proteínas de fusión representativos de la divulgación que comprenden una secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante representativa para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Algunos de tales dímeros pueden inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto *in vivo*, tal como mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de al menos un dímero tal a un sujeto que necesita terapia inmunosupresora. Se espera que algunos de tales dímeros de proteínas de fusión sean útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario en el que se desea inmunosupresión (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias) y procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula u órgano de un donante por un receptor.

Algunos de tales dímeros tienen capacidades variadas para modular o suprimir la señalización mediante CD28, ya que tienen diferentes avidéces de unión comparativas por CD80 y CD86. Tales dímeros son útiles en aplicaciones en las que se desea la manipulación diferencial de respuestas de linfocitos T que incluyen procedimientos terapéuticos y profiláctico para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunitario tales como, por ejemplo, enfermedades y trastornos de inmunodeficiencia (por ejemplo, AR, EM, psoriasis, etc.). En el Ejemplo 4 se muestran proteínas de fusión dimericas a modo de ejemplo que comprenden polipéptidos de la divulgación que tienen algunas de las avidéces de unión por CD80/CD86 diferenciales anteriormente descritas y propiedades inmunoinhibidoras.

Algunos de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de la proteína hCTLA-4 o un dímero hCTLA-4-Ig para suprimir o inhibir uno o más tipos de respuestas inmunitarias. Por ejemplo, algunos de tales dímeros tienen una capacidad para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en ensayos y/o aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*, tales como aquellos descritos anteriormente y más adelante, que es al menos aproximadamente

igual a o mayor que la capacidad de la proteína hCTLA-4 o un dímero hCTLA-4-Ig (por ejemplo, Orenicia®, dímero hCTLA-4-IgG2 o dímero hCTLA-4-IgG1) para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en tales aplicaciones. Adicionalmente, algunos de tales dímeros tienen una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citocinas, respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T) que es mayor que la capacidad de un dímero LEA29Y-Ig para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria. Los Ejemplos 4-9, por ejemplo, comparan la capacidad de proteínas de fusión diméricas representativas de la divulgación que comprenden una secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de hCTLA-4-IgG2 dimérica, Orenicia® y LEA29Y-Ig para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Véanse, por ejemplo, las Tablas 6-9 más adelante. Algunos de tales dímeros tienen tanto una capacidad para unirse a hCD80 y/o hCD86 (o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig) como una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en ensayos y/o aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*, tales como aquellos descritos anteriormente y en mayor detalle más adelante (por ejemplo, un procedimiento *in vivo* en el que se administra una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de al menos un dímero tal). Algunos de tales dímeros tienen una avidez de unión por hCD80 y/o hCD86 (o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidez de unión de la proteína hCTLA-4, una hCTLA-4-Ig dimérica (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2, Orenicia®) o LEA29Y-Ig dimérica por hCD80 y/o hCD86 (o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), respectivamente, y una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria que es al menos igual a o mayor que la capacidad de la proteína hCTLA-4, una hCTLA-4-Ig dimérica (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2, Orenicia®) o LEA29Y-Ig dimérica para inhibir una respuesta inmunitaria. Se espera que tales dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes sean útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones del sistema inmunitario, como se trata en mayor detalle más adelante.

En el presente documento se desvela un dímero de proteínas de fusión aisladas o recombinantes (por ejemplo, dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas (por ejemplo, dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas), en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en el que el dímero se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mlg y/o hCD86-mlg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria, incluyendo aquellas descritas anteriormente y adicionalmente más adelante. Cada una de las secuencias de polipéptidos expuestas en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222 es un ECD de CTLA-4 mutante maduro fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG2, y cada secuencia tal puede llamarse una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante. La secuencia de polipéptidos de cada una de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222 es idéntica a SEC ID N°: 205-214, 219 y 221, excepto que cada una de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222 incluye una lisina en el extremo C.

En el presente documento se desvela un monómero de proteínas de fusión aisladas o recombinantes que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos que comprende los residuos de aminoácidos 1-351 de cualquiera de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mlg y/o hCD86-mlg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria, incluyendo aquellas descritas anteriormente y adicionalmente más adelante.

En el presente documento se desvela un dímero de proteínas de fusión aisladas o recombinantes que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas, en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos que comprende los residuos de aminoácidos 1-351 de cualquiera de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en el que dicho dímero de proteínas de fusión proteína se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mlg y/o hCD86-mlg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria, incluyendo aquellas descritas anteriormente y adicionalmente más adelante.

En el presente documento se desvela una proteína de fusión CTLA-4-Ig monomérica mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en el que dicha proteína de fusión monomérica se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mlg y/o hCD86-mlg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria. Algunos de tales monómeros y dímeros de proteínas de fusión tienen una capacidad para inhibir o suprimir una o más respuestas inmunitarias que incluyen, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta(s) de Ab dependiente(s) de linfocitos T) en ensayos y/o procedimientos *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, *in vivo* en un sujeto que padece una enfermedad, trastorno o afección en el que la terapia inmunosupresora sería beneficiosa y al que

una cantidad terapéuticamente eficaz de tal proteína de fusión dimérica se administra como se trata en mayor detalle más adelante). Se espera que tales monómeros y dímeros de proteínas de fusión sean útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen procedimientos terapéuticos y/o profilácticos para tratar enfermedades del sistema inmunitario que incluyen aquellas tratadas más adelante.

5 En el presente documento se desvela un dímero de proteínas de fusión aisladas o recombinantes (por ejemplo, dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante monomérica), en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende: (1) un polipéptido (por ejemplo, polipéptido del dominio extracelular de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que
10 consiste en SEC ID N°: 1-73 en no más de 6 residuos de aminoácidos (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácidos), y en el que el residuo de aminoácido en la secuencia de polipéptidos en la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 u 85 es idéntico al residuo de aminoácido en la posición correspondiente de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, un polipéptido seleccionado de SEC ID N°: 1-73), y (2) un polipéptido del Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2), en el que el dímero de proteínas de fusión se une a CD80 y/o
15 CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citocinas, inducción de marcadores de activación o moléculas inflamatorias, producción de Ab anti-colágeno, respuestas de Ab dependientes de linfocitos T, etc.) en ensayos y/o procedimientos *in vitro* y/o *in vivo* como se trata en detalle más adelante. En el presente documento se desvela una proteína de fusión monomérica aislada o recombinante como se ha descrito anteriormente que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o induce una respuesta inmunitaria *in vitro* o *in vivo*. En el dímero de proteínas de fusión, las dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, monómero de CTLA-4-Ig mutante) están opcionalmente ligadas covalentemente juntas por uno o más enlaces disulfuro mediante residuos de cisteína en cada monómero, y los dos monómeros son normalmente idénticos entre sí. En algunos casos, el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante en tal dímero o monómero de proteínas de fusión se diferencia del polipéptido seleccionado (por ejemplo, seleccionado de
25 SEC ID N°: 1-73) en no más de 6 residuos de aminoácidos, pero el aminoácido que ocupa la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 u 85 es idéntico al residuo de aminoácido incluido en esa posición en la secuencia de polipéptidos seleccionada; es decir, un residuo de aminoácido en tal posición no puede deleccionarse o sustituirse. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante en una proteína de fusión tal comprenden una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos seleccionada en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos de aminoácidos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en la secuencia de polipéptidos seleccionada. Tal polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante puede diferenciarse de la secuencia de polipéptidos seleccionada por delección (delecciones) de aminoácidos, adición (adiciones) y/o sustitución (sustituciones) de aminoácidos. Una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservativa o no conservativa. Véase, por ejemplo, la sección "Variación de secuencias". Algunas de tales proteínas de fusión diméricas tienen una avidéz de unión por hCD86 o hCD86-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de hCTLA-4, hCTLA-4-Ig dimérica, LEA29Y-Ig dimérica o proteína Orencia® por hCD86 o hCD86-Ig, respectivamente. Algunas de tales proteínas de fusión monoméricas tienen una afinidad o avidéz de unión por hCD86, hCD86-Ig o ECD de hCD86 que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidéz de unión de hCTLA-4 monomérica, hCTLA-4-Ig monomérica o LEA29Y-Ig monomérica por hCD86, hCD86-Ig o ECD de hCD86, respectivamente. Alternativamente o adicionalmente, algunas de tales proteínas de fusión diméricas tienen una avidéz de unión por hCD80 o hCD80-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig por hCD80, respectivamente. Alternativamente o adicionalmente, algunas de tales proteínas de fusión monoméricas tienen una afinidad o avidéz de unión por hCD80, hCD80-Ig o ECD de hCD80 que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidéz de unión de hCTLA-4 monomérica o hCTLA-4-Ig monomérica por hCD80, hCD80-Ig, o ECD de hCD80, respectivamente. En algunos casos, el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante en tal dímero o monómero de proteínas de fusión comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud aproximadamente igual a la longitud de aminoácidos del ECD de hCTLA-4, por ejemplo, de aproximadamente 118-130, 119-129, 120-128, 121- 127, 122-126, 123-125 ó 124 residuos de aminoácidos de longitud. El extremo N del polipéptido del Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2, Fc de IgG1, Fc de IgG4, o un Fc de IgG mutante que reduce la función efectora o unión a receptor de Fc) puede ligarse o fusionarse covalentemente directamente o indirectamente (mediante un ligador que comprende, por ejemplo, de 1-10 residuos de aminoácidos) con el extremo C del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante. El polipéptido del Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184-186 y
55 218, por ejemplo, cualquiera de SEC ID N°: 184, 185, 186 y 218.

Algunos de tales dímeros y monómeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes pueden suprimir una o más de una variedad de respuestas inmunitarias que incluyen, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2) o moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta(s) de Ab dependiente(s) de linfocitos T. Algunos de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una mayor capacidad para inhibir una o más de tales respuestas inmunitarias que hCTLA-4, hCTLA-4-Ig dimérica o LEA29Y-Ig dimérica. Los Ejemplos 4-9, por ejemplo, proporcionan datos que comparan la capacidad de proteínas de fusión diméricas representativas de la divulgación que comprenden un polipéptido del ECD de
60

CTLA-4 mutante de la invención para inhibir la proliferación de linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de una hCTLA-4-Ig dimérica o LEA29Y-Ig dimérica para hacer eso. Algunos de tales monómeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una mayor capacidad para inhibir una o más de tales respuestas inmunitarias que hCTLA-4 monomérica, hCTLA-4-Ig monomérica o LEA29Y-Ig monomérica. Algunos de tales monómeros y dímeros pueden inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto *in vivo*, tal como mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de al menos un polipéptido tal a un sujeto que necesita terapia inmunosupresora. Se espera que tales proteínas de fusión sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones que incluyen procedimientos para tratar una enfermedad, trastorno o afección en el que la terapia inmunosupresora sería de beneficio, tal como procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos para inhibir trasplante de injerto de órgano, célula o tejido.

En el presente documento se desvela un dímero de proteínas aisladas o recombinantes (por ejemplo, dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas), en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende: (1) un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que (a) se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 en no más de 6 residuos de aminoácidos (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácidos), y (b) comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 u 85 con respecto a la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 159; y (2) un polipéptido del Fc de Ig, en el que el dímero de proteínas de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citocinas, inducción de marcadores de activación, inflamación, producción de anticuerpos anti-colágeno, respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T, etc.) en ensayos y/o procedimientos *in vitro* y/o *in vivo* como se describen en mayor detalle más adelante. En el presente documento también se desvela una proteína de fusión monomérica aislada o recombinante, como se ha descrito anteriormente, que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o induce una respuesta inmunitaria *in vitro* o *in vivo*. En algunos casos, CD80 es hCD80 y CD86 es hCD86. En el dímero de proteínas de fusión, las dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, monómero de CTLA-4-Ig mutante) están opcionalmente ligadas covalentemente juntas por uno o más enlaces disulfuro mediante residuos de cisteína en cada monómero, y los dos monómeros son normalmente idénticos entre sí. El extremo N del polipéptido del Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2, Fc de IgG1, Fc de IgG4 o un Fc de IgG mutante que reduce la función efectora o unión a receptor de Fc) puede ligarse o fusionarse covalentemente directamente o indirectamente (mediante un ligador que comprende, por ejemplo, de 1-10 residuos de aminoácidos) con el extremo C del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante. El polipéptido del Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184-186 y 218.

Algunos de tales dímeros o monómeros de proteínas de fusión comprenden un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud aproximadamente igual a la longitud de aminoácidos del ECD de hCTLA-4, por ejemplo, 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126 ó 123-125 residuos de aminoácidos de longitud. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante en tal dímero o monómero de proteínas de fusión comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene 124 residuos de aminoácidos de longitud. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden 2, 3, 4, 5 ó 6 sustituciones de aminoácidos en las posiciones con respecto a la secuencia expuesta en SEC ID N°: 159 seleccionada del grupo que consiste en la posición 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 y 85. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden además una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a la posición 104 y/o 30 con respecto a SEC ID N°: 159. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden al menos una sustitución de aminoácidos con respecto a SEC ID N°: 159 en la posición 70 (opcionalmente S70F), posición 64 (opcionalmente S64P), posición 50 (opcionalmente A50M), posición 54 (opcionalmente M54K/V, por ejemplo, M54K), posición 65 (opcionalmente I65S), posición 56 (opcionalmente N56D), posición 55 (opcionalmente G55E), posición 85 (opcionalmente M85A) y/o posición 24 (opcionalmente A24E/S, por ejemplo, A24E). Cualquier polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante tal puede comprender además una sustitución de aminoácidos con respecto a SEC ID N°: 159 en la posición 104 (opcionalmente L104E/D, por ejemplo, L104E), posición 30 (opcionalmente T30N/D/A, por ejemplo, T30N, T30D o T30A) y/o posición 32 (opcionalmente V32I). Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden al menos una sustitución en una posición de aminoácido con respecto a SEC ID N°: 159 seleccionada del grupo que consiste en A50M, M54K, G55E, N56D, S64P, I65S y S70F. Algunos de tales polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden 2, 3, 4, 5 ó 6 sustituciones en las posiciones de aminoácido con respecto a SEC ID N°: 159 seleccionadas del grupo que consiste en A50M, M54K, G55E, N56D, S64P, I65S y S70F.

Algunos de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante presentan una avidéz de unión por CD86 (por ejemplo, hCD86) o CD86-Ig dimérica (por ejemplo, hCD86-Ig) que es aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de la proteína hCTLA-4, hCTLA-4-Ig dimérica (por ejemplo, CTLA-4-IgG1 o CTLA-4-IgG2), proteína Orenicia® o LEA29Y-Ig dimérica por CD86 o CD86-Ig dimérica, respectivamente. Algunos de tales dímeros tienen una avidéz de unión por CD80 (por ejemplo, hCD80) o CD80-Ig dimérica (por ejemplo, hCD80-Ig) que es mayor que la avidéz de unión de hCTLA-4, una hCTLA-4-Ig dimérica, proteína Orenicia® y/o LEA29Y-Ig dimérica por CD80 o CD80-Ig dimérica, respectivamente.

Algunos de tales monómeros de CTLA-4-Ig mutante presentan una afinidad o aidez de unión por CD86 (por ejemplo, hCD86) o CD86-Ig (por ejemplo, hCD86-Ig) que es aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o aidez de unión de hCTLA-4 monomérica, hCTLA-4-Ig monomérica o LEA29Y-Ig monomérica por CD86 o CD86-Ig, respectivamente. Algunos de tales monómeros tienen una afinidad o aidez de unión por CD80 (por ejemplo, hCD80) o CD80-Ig (por ejemplo, hCD80-Ig) que es mayor que la afinidad o aidez de unión de hCTLA-4 monomérica o hCTLA-4-Ig monomérica (por ejemplo, CTLA-4-IgG1 o CTLA-4-IgG2 monomérica) por CD80 o CD80-Ig dimérica, respectivamente.

Algunos de tales dímeros y monómeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad para suprimir o inhibir una o más respuestas inmunitarias que incluyen aquellas descritas anteriormente y en todo el presente documento (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citocinas, inducción de marcadores de activación, inflamación, producción de anticuerpos anti-colágeno, respuestas de anticuerpos dependientes de linfocitos T), en ensayos y/o procedimientos *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, *in vivo* en un sujeto que padece una enfermedad, trastorno o afección en la que sería de beneficio terapia inmunosupresora y al que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un dímero de CTLA-4-Ig mutante tal). Algunos de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante inhiben una o más de tales respuestas inmunitarias a un mayor grado que hCTLA-4, una hCTLA-4-Ig dimérica (por ejemplo, CTLA-4-IgG1 o CTLA-4-IgG2 diméricas), proteína Orenia® y/o LEAY29-Ig dimérica. Algunos de tales monómeros de CTLA-4-Ig mutante inhiben una o más de tales respuestas inmunitarias a un mayor grado que hCTLA-4 monomérica, hCTLA-4-Ig monomérica y/o LEAY29-Ig monomérica. Se espera que tales dímeros y monómeros de CTLA-4-Ig mutante sean de uso beneficioso en una variedad de aplicaciones que incluyen procedimientos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos para inhibir trasplante de injerto de órgano, célula o tejido.

Cualquiera de tal dímero o monómero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes diméricas o monoméricas descrito anteriormente puede incluir adicionalmente un péptido que facilita la secreción de la proteína de fusión de una célula huésped. El péptido es opcionalmente un péptido señal. El extremo C del péptido señal está normalmente ligado covalentemente al extremo N de una proteína de fusión. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 182 o SEC ID N°: 216. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos 1-35, 1-36 ó 1-37 de SEC ID N°: 160. Además, como se trata más adelante, cualquiera de tal proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante monomérica o dimérica descrita anteriormente puede comprender uno o más de los residuos de aminoácidos que están glucosilados o pegilados.

En el presente documento también se desvela una proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante madura/secretada que tiene 352 aminoácidos de longitud y comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante que comprende 124 residuos de aminoácidos y un polipéptido del Fc de IgG2 humana que comprende 228 residuos de aminoácidos. Polipéptidos a modo de ejemplo del ECD de CTLA-4 mutante incluyen aquellos polipéptidos que comprenden secuencias identificadas por cualquiera de SEC ID N°: 1-73. Proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden una secuencia de polipéptidos identificada por cualquiera de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222. Si se desea, los aminoácidos de una proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante madura pueden enumerarse empezando con el primer residuo de aminoácido de CTLA-4-IgG2 mutante (es decir, el primer residuo del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante). En algunos aspectos, el primer residuo de la proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante (o ECD de CTLA-4 mutante) es metionina y, por tanto, la numeración de aminoácidos de la proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante (o ECD de CTLA-4 mutante) empezaría con metionina (designada residuo de aminoácido 1).

En el presente documento también se desvelan proteínas de fusión multiméricas aisladas o recombinantes que comprenden dos o más proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes descritas anteriormente. En algunos casos, el multímero es un dímero de proteínas de fusión que comprende dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes, que pueden ser proteínas de fusión idénticas (es decir, homodímeros) o proteínas de fusión diferentes (es decir, heterodímeros). En algunos casos, el multímero es una proteína de fusión tetramérica que comprende cuatro polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación. El tetrámero puede comprender cuatro polipéptidos idénticos del ECD de CTLA-4 mutante (es decir, homotetrámero) o cualquier combinación de cuatro polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación de forma que los cuatro polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante no sean idénticos (es decir, heterotetrámero). Algunos de tales multímeros se unen a CD80 and/CD86 (y/o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig) y/o suprimen o inhiben una respuesta inmunitaria.

En el presente documento se desvelan formas solubles de cualquiera de los polipéptidos, proteínas de fusión y multímeros descritos anteriormente. También se incluyen formas solubles del conjugado descritas más adelante. Moléculas solubles de la divulgación - por ejemplo, polipéptidos solubles, proteínas de fusión diméricas, proteínas de fusión monoméricas, multímeros y conjugados de la divulgación - no están ligados o unidos a una célula. Algunas de tales moléculas solubles pueden estar en disolución o pueden circular, por ejemplo, en un líquido (por ejemplo, en un cuerpo del sujeto). Un péptido señal puede usarse normalmente para facilitar la secreción de una molécula tal, pero el péptido señal se escinde durante la secreción de la molécula de una célula huésped. Por tanto, en la mayoría de los casos, una molécula soluble, tal como un polipéptido soluble, proteína de fusión dimérica, proteína de fusión

monomérica o multímero, no incluye un péptido señal. Como se ha tratado anteriormente, un polipéptido del dominio extracelular de CTLA-4 mutante de la divulgación puede ligarse a una molécula de Ig que incluye, por ejemplo, una parte de un polipéptido de Ig tal como, por ejemplo, un polipéptido del Fc de Ig que produce una proteína de fusión soluble. Por tanto, en el presente documento se desvelan proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes solubles que comprenden cualquier polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante como se describe en el presente documento fusionado o ligado a al menos una parte de un polipéptido de Ig tal como, por ejemplo, un Fc de Ig natural (por ejemplo, Fc de IgG2 humana) o polipéptido mutante de Fc de Ig. Tales proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes solubles pueden ser proteínas de fusión monoméricas o diméricas e incluyen aquellos monómeros y dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes descritos en detalle anteriormente y en otra parte, que incluyen los ejemplos más adelante. Como se describe en detalle anteriormente y en otra parte en el presente documento, algunas de tales proteínas de fusión monoméricas y diméricas solubles pueden tener una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 y/o una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T) en aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*.

Se espera que tales moléculas solubles de la divulgación sean de particular beneficio en una variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, procedimientos terapéuticos y profilácticos para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunitario (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias) y procedimientos profilácticos y terapéuticos para inhibir trasplante de injerto de célula, órgano o tejido. Moléculas solubles de la divulgación - por ejemplo, polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante recombinante soluble, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas y diméricas, conjugados de ECD de CTLA-4 mutante, conjugados de CTLA-4-Ig mutante, multímeros que comprenden polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante, multímeros que comprenden conjugados de CTLA-4 mutante o conjugados de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación - que se unen a CD80 y/o CD86, cuando se administran a un sujeto en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz, inhiben la interacción entre CD80 y/o CD86 endógeno y CD28 endógeno, suprimiendo así en el sujeto una respuesta del sistema inmunitario o ataque del sistema inmunitario en los tejidos, órganos y/o células del cuerpo sano del sujeto. En los casos en los que un sujeto sea el receptor de tejidos, órganos y/o células del cuerpo sano de un donante (por ejemplo, tal como cuando el sujeto receptor ha recibido un injerto de tejido o trasplante de célula u órgano del donante), tales moléculas solubles inhiben la interacción entre CD80 y/o CD86 endógeno y CD28 endógeno, inhibiendo así una respuesta o ataque perjudicial por el sistema inmunitario del sujeto en los tejidos, órganos o células del cuerpo sano donados al sujeto por el donante. Suprimiendo una respuesta o ataque del sistema inmunitario en tejidos del cuerpo sano pueden disminuirse los efectos secundarios (por ejemplo, dolor, inflamación de articulaciones, etc.) asociados a tal respuesta o ataque del sistema inmunitario en tejidos, órganos o células sanos en el sujeto, y la lesión resultante de tal respuesta o ataque puede retardarse o prevenirse.

Procedimientos para medir afinidades y avides de unión de polipéptidos de la invención descritos anteriormente que incluyen, por ejemplo, polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes diméricas y monoméricas y multímeros de la divulgación serían conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, tecnología Biacore™ (GE Healthcare), microcalorimetría por valoración isotérmica (MicroCal LLC, Northampton, MA), ELISA, procedimientos de expresión en fago por afinidad de unión y procedimientos de FACS. Los procedimientos Biacore se describen en detalle en el Ejemplo 4 más adelante. FACS u otros procedimientos de clasificación se describen en mayor detalle anteriormente y en otra parte en el presente documento. Los procedimientos para medir avides de unión de polipéptidos de la divulgación por hCD80 y/o hCD86 por ELISA en fago se describen en el Ejemplo 2 más adelante.

Los procedimientos para detectar y medir respuestas de linfocitos T inducidas por moléculas de la divulgación (incluyendo, por ejemplo, polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes diméricas y monoméricas y multímeros de la invención) son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. La activación de linfocitos T se caracteriza comúnmente por acontecimientos fisiológicos que incluyen, por ejemplo, síntesis de citocinas asociadas a linfocitos T (por ejemplo, producción de IFN- γ) e inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2). Los linfocitos T CD4+ reconocen sus péptidos inmunogénicos en el contexto de moléculas de clase II del MHC, mientras que los linfocitos T CD8+ reconocen sus péptidos inmunogénicos en el contexto de moléculas de clase I del MHC. Procedimientos a modo de ejemplo para evaluar y medir la capacidad de moléculas de la divulgación descritas anteriormente para inhibir o suprimir la activación de linfocitos T y/o proliferación de linfocitos T o para bloquear la señalización mediante CD86 y/o CD80 se describen en los Ejemplos 5-8 y en otra parte en el presente documento.

Los polipéptidos, proteínas de fusión monoméricas y diméricas y multímeros de la divulgación que incluyen aquellos tratados anteriormente comprenden opcionalmente además un aminoácido adicional tal como una metionina, añadida al extremo N y/o una marca de péptido para la purificación o identificación. Los polipéptidos de la divulgación que incluyen aquellos tratados anteriormente comprenden opcionalmente además una subsecuencia de purificación de polipéptidos tal como, por ejemplo, una subsecuencia que está seleccionada de una marca de epítipo, una marca FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST.

Además, como se trata en mayor detalle más adelante, la divulgación incluye ácidos nucleicos aislados, recombinantes o sintéticos que codifican todos los polipéptidos, proteínas de fusión y multímeros de la divulgación descritos anteriormente y en detalle adicional más adelante.

Identidad de secuencias

Como se ha tratado anteriormente, en el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en el que el polipéptido se une a CD80 o CD86 o un dominio extracelular de cualquiera y/o tiene una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria. También se describe en detalle más adelante un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en el que el polipéptido tiene una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 y/o un ECD del mismo, y/o tiene una capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos.

El grado al que una secuencia (polipéptido o ácido nucleico) es similar a otra proporciona una indicación de propiedades estructurales y funcionales similares para las dos secuencias. Por consiguiente, en el contexto de la presente divulgación, las secuencias que tienen una secuencia similar a cualquier secuencia de ejemplo dada son un rasgo de la presente divulgación. Secuencias que tienen porcentaje de identidades de secuencia como se define más adelante son un rasgo de la divulgación. Puede usarse una variedad de procedimientos de determinación de las relaciones de secuencia que incluyen alineamiento manual y alineamiento y análisis de secuencias asistido por ordenador. Está disponible una variedad de programas informáticos para realizar el alineamiento de secuencias, o pueden producirse por un experto.

Como se observa anteriormente, las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos empleadas en la invención objeto no necesitan ser idénticas, pero pueden ser sustancialmente idénticas a la secuencia correspondiente de un ácido nucleico de la invención o polipéptido de la invención, respectivamente. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden someterse a diversos cambios tales como una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, tanto conservativas como no conservativas, incluyendo en las que, por ejemplo, tales cambios podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso tal como en su uso terapéutico o profiláctico o aplicación de administración o diagnóstico. Los ácidos nucleicos de la invención también pueden someterse a diversos cambios tales como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones de forma que un codón particular codifique el mismo aminoácido o un aminoácido diferente, produciendo tanto una variación silenciosa (por ejemplo, la mutación en una secuencia de nucleótidos produce una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, cuando el aminoácido codificado no es alterado por la mutación del ácido nucleico) o variación no silenciosa, una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, una o más adiciones o inserciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, escisión de o una o más truncaciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Los ácidos nucleicos también pueden modificarse para incluir uno o más codones que proporcionen la expresión óptima en un sistema de expresión (por ejemplo, bacteriano o de mamífero), mientras que, si se desea, dicho uno o más codones todavía codifican el (los) mismo(s) aminoácido(s). Tales cambios de ácidos nucleicos podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso terapéutico o profiláctico o aplicación de administración o diagnóstico. Los ácidos nucleicos y polipéptidos pueden modificarse en varias formas, mientras que comprendan una secuencia sustancialmente idéntica (como se define más adelante) a una secuencia en un ácido nucleico o polipéptido respectivo de la invención.

El término "idéntica" o "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son el mismo cuando se comparan y alinean para similitud máxima, como se determina usando el algoritmo de comparación de secuencias que se describe más adelante o por inspección visual. El "porcentaje de identidad de secuencias" ("% de identidad") de una secuencia objeto con una secuencia de referencia (es decir, consulta) significa que la secuencia objeto es idéntica (es decir, es una base de aminoácido por aminoácido para una secuencia de polipéptidos, o una base de nucleótido por nucleótido para una secuencia de polinucleótidos) por un porcentaje especificado con la secuencia de consulta con respecto a una longitud de comparación.

El porcentaje de identidad de secuencias ("% de identidad de secuencias" o "% de identidad") de una secuencia objeto con respecto a una secuencia de consulta puede calcularse del siguiente modo. Primero, el alineamiento óptimo de las dos secuencias se determina usando un algoritmo de comparación de secuencias con parámetros de alineamiento específicos. Esta determinación del alineamiento óptimo puede realizarse usando un ordenador, o puede calcularse manualmente como se describe más adelante. Entonces, las dos secuencias óptimamente alineadas se comparan con respecto a la longitud de comparación, y se determina el número de posiciones en el alineamiento óptimo en las que residuos idénticos se producen en ambas secuencias, proporcionando el número de posiciones coincidentes. El número de posiciones coincidentes se divide entonces entre el número total de posiciones de la longitud de comparación (que, a menos que se especifique de otro modo, es la longitud de la secuencia de consulta), y el resultado se multiplica luego por 100, dando el porcentaje de identidad de secuencias de la secuencia objeto con respecto a la secuencia de consulta.

Con respecto a secuencias de polipéptidos, normalmente una secuencia se considera una “secuencia de consulta” (por ejemplo, una secuencia de polipéptidos de la invención) con la que se comparan una o varias de otras secuencias, es decir, “secuencia(s) objeto” (por ejemplo, secuencias presentes en una base de datos de secuencias). El algoritmo de comparación de secuencias usa los parámetros de alineamiento diseñados para determinar el alineamiento óptimo entre la secuencia de consulta y la(s) secuencia(s) objeto. Cuando se compara una secuencia de consulta con una base de datos de secuencias tal como, por ejemplo, la base de datos GENBANK® (Genetic Sequence Data Bank; U.S. Department of Health and Human Services) o la base de datos GENESEQ® (Thomson Derwent; también disponible como la base de datos DGENE® en STN), normalmente sólo la secuencia de consulta y los parámetros de alineamiento se entran en el ordenador; se devuelven alineamientos óptimos entre la secuencia de consulta y cada secuencia objeto hasta un número especificado de secuencias objeto.

1. Determinación del alineamiento óptimo

Dos secuencias de polipéptidos están “óptimamente alineadas” cuando se alinean usando parámetros definidos, es decir, una matriz de sustitución de aminoácidos definida, penalización por existencia de hueco (también llamada penalización por apertura de huecos) y penalización por extensión de hueco, de manera que llegan a la mayor puntuación de similitud posible para el par de secuencias. La matriz BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22):10915-10919) se usa frecuentemente como matriz de sustitución de puntuación por defecto en algoritmos de alineamiento de secuencias de polipéptidos (tal como BLASTP, descrito más adelante). La penalización por existencia de hueco se impone para la introducción de un único hueco de aminoácidos en una de las secuencias alineadas, y la penalización por extensión de hueco es impuesta para cada posición de residuo en el hueco. A menos que se establezca de otro modo, los parámetros de alineamiento empleados en el presente documento son: matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por existencia de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1. La puntuación de alineamiento se define por las posiciones de aminoácido de cada secuencia en las que un alineamiento empieza y termina (por ejemplo, una ventana de alineamiento), y opcionalmente por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias, de manera que llegan a la mayor puntuación de similitud posible.

Aunque el alineamiento óptimo entre dos o más secuencias puede determinarse manualmente (como se describe más adelante), el procedimiento se facilita por el uso de un algoritmo de alineamiento implementado por ordenador tal como BLAST® (National Library of Medicine), por ejemplo, BLASTP para secuencias de polipéptidos y BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos, descrito en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, y puesto a disposición del público mediante diversas fuentes tales como la página web del Centro nacional para información biotecnológica (NCBI). Si se usa una interfaz BLAST computerizada, si existe la opción de usar un “filtro de baja complejidad”, esta opción debería desactivarse (es decir, sin filtro).

El alineamiento óptimo entre dos secuencias de polipéptidos también puede determinarse por un cálculo manual del algoritmo BLASTP (es decir, sin ayuda de un ordenador) usando los mismos parámetros de alineamiento especificados anteriormente (matriz = BLOSUM62, penalización por apertura de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1). Para empezar, las dos secuencias se alinean inicialmente por inspección visual. Entonces se calcula una puntuación de alineamiento inicial del siguiente modo: para cada posición individual de un alineamiento (es decir, para cada par de residuos alineados) se asigna un valor numérico según la matriz BLOSUM62 (Figura 13). La suma de los valores asignados a cada par de residuos en un alineamiento es la puntuación de alineamiento. Si las dos secuencias que se alinean son altamente similares, este alineamiento inicial proporciona frecuentemente la mayor puntuación de alineamiento posible. Un alineamiento con la mayor puntuación de alineamiento posible es el alineamiento óptimo basado en los parámetros de alineamiento empleados.

Ejemplos del cálculo manual de puntuaciones de alineamiento para dos secuencias se proporcionan en las Figuras 14A-14D. La Figura 14A muestra el cálculo de una puntuación de alineamiento para un alineamiento arbitrario (alineamiento 14A) de una secuencia de “consulta”, identificada en el presente documento como los residuos 39-53 de la secuencia del ECD de CTLA-4 humano (SEC ID N°: 159), y una secuencia “objeto”, identificada en el presente documento como los residuos 40-54 de D3 (SEC ID N°: 61). El valor numérico asignado por la matriz BLOSUM62 para cada par alineado de aminoácidos se muestra debajo de cada posición en el alineamiento.

La Figura 14B muestra la puntuación de alineamiento para el alineamiento *óptimo* de las dos mismas secuencias. Para ayudar en la visualización, cada par idéntico de aminoácidos en un alineamiento se muestra en negrita. Un alineamiento en la Figura 14B (alineamiento 14B) más adelante produce la mayor puntuación de alineamiento posible (la suma de los valores se muestra debajo de cada posición alineada) de estas dos secuencias; cualquier otro alineamiento de estas dos secuencias, con o sin hueco, produciría una menor puntuación de alineamiento.

En algunos casos podría obtenerse una mayor puntuación de alineamiento introduciendo uno o más huecos en un alineamiento. Siempre que un hueco se introduce en un alineamiento se asigna una penalización por apertura de hueco y además se evalúa una penalización por extensión de hueco para cada posición de residuo dentro de ese hueco. Por tanto, usando los parámetros de alineamiento descritos anteriormente (incluyendo penalización por apertura de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1), un hueco de un residuo en un alineamiento se correspondería con un valor de $-(11+(1 \times 1)) = -12$ asignado al hueco; un hueco de dos residuos se correspondería con un valor de $-(11+(2 \times 1)) = -13$ asignado al hueco, etc. Este cálculo se repite para cada hueco nuevo introducido

en un alineamiento.

Lo siguiente es un ejemplo que demuestra cómo la introducción de un hueco en un alineamiento puede producir una mayor puntuación de alineamiento, a pesar de la penalización por hueco. La Figura 14C muestra un alineamiento (alineamiento 14C) de una secuencia de "consulta", identificada en el presente documento como los residuos 39-53 de la secuencia del ECD de CTLA-4 humano (SEC ID N°: 159), y una secuencia "sujeto", identificada en el presente documento como los residuos 41-55 de D3 (SEC ID N°: 61), pero en estos casos con los aminoácidos 49-50 deletreados. El alineamiento 14C, que es el mejor alineamiento posible sin introducción de ningún hueco, produce una puntuación de alineamiento de 34.

La alineamiento en la Figura 14D (alineamiento 14D) muestra el efecto de la introducción de un hueco de dos residuos en la secuencia inferior sobre una puntuación de alineamiento. A pesar de la penalización por huecos totales de 13 (la penalización por apertura de hueco de 11, y 2 veces la penalización por extensión de hueco de 1), la puntuación de alineamiento global de las dos secuencias aumenta a 43. El alineamiento D inferior produce la mayor puntuación de alineamiento posible y, por tanto, es el alineamiento óptimo de estas dos secuencias; cualquier otro alineamiento de estas dos secuencias (con o sin huecos) produciría una menor puntuación de alineamiento.

Debe entenderse que los ejemplos de cálculos de alineamiento de secuencias descritos anteriormente, que usan secuencias relativamente cortas, sólo se proporcionan para fines ilustrativos. En la práctica, los parámetros de alineamiento empleados (matriz BLOSUM62, penalización por apertura de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1) están generalmente previstos para secuencias de polipéptidos de 85 aminoácidos de longitud o más. La página web de NCBI proporciona los siguientes parámetros de alineamiento para secuencias de otras longitudes que son adecuados para el cálculo de alineamiento asistido por ordenador, además de manual, usando el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. Para secuencias de 50-85 aminoácidos de longitud, parámetros óptimos son la matriz BLOSUM80 (Henikoff y Henikoff, arriba), penalización por apertura de hueco = 10 y penalización por extensión de hueco = 1. Para secuencias de 35-50 aminoácidos de longitud, parámetros óptimos son la matriz PAM70 (Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. & Orcutt, B.C. (1978) "A model of evolutionary change in proteins" en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supl. 3, M.O. Dayhoff (ed.), pág. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC.), penalización por apertura de hueco = 10 y penalización por extensión de hueco = 1. Para secuencias de menos de 35 aminoácidos de longitud, parámetros óptimos son la matriz PAM30 (Dayhoff, M.O., arriba), penalización por apertura de hueco = 9 y penalización por extensión de hueco = 1.

2. Cálculo de la identidad en porcentaje

Una vez se han alineado óptimamente las secuencias, la identidad en porcentaje de la secuencia objeto con respecto a la secuencia de consulta se calcula contando el número de posiciones en el alineamiento óptimo que contienen pares de residuos idénticos, dividiendo entre el número de residuos en la longitud de comparación (también llamada la ventana de comparación) que, a menos que se especifique de otro modo, es el número de residuos en la secuencia de consulta, y multiplicando el número resultante por 100. Refiriéndose de nuevo a los alineamientos anteriores, en cada ejemplo la secuencia designada como la secuencia de consulta (superior) tiene 15 aminoácidos de longitud. En el alineamiento B, 12 pares de residuos de aminoácidos alineados (mostrados en negrita) son idénticos en el alineamiento óptimo de la secuencia de consulta (superior) con la secuencia objeto (inferior). Por tanto, esta secuencia objeto particular tiene $(12/15) \times 100 = 80\%$ de identidad con la longitud *entera* de la secuencia de consulta de 15 residuos; en otras palabras, la secuencia objeto en el alineamiento B tiene al menos el 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de consulta. En el alineamiento D, 11 pares de residuos de aminoácidos (mostrados en negrita) en el alineamiento óptimo son idénticos; por tanto, esta secuencia objeto particular tiene $(11/15) \times 100 = 73,3\%$ de identidad con la longitud *entera* de la secuencia de consulta de 15 residuos; en otras palabras, la secuencia objeto en el alineamiento D tiene al menos el 73% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de consulta.

Como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" (o "sustancialmente idéntica") normalmente significa que cuando dos secuencias de aminoácidos (es decir, una secuencia de consulta y una secuencia objeto) se alinean óptimamente usando el algoritmo BLASTP (manualmente o mediante ordenador) usando parámetros apropiados descritos anteriormente, la secuencia objeto tiene al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de consulta. En algunos casos, la identidad sustancial existe sobre una longitud de comparación de al menos 100 residuos de aminoácidos tales como, por ejemplo, al menos 110, 115, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 200, 250, 300, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 375, 400, 450 ó 500 residuos de aminoácidos.

Similarmente, como se aplica en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos, el término identidad sustancial (o sustancialmente idéntica) significa que cuando dos secuencias de ácidos nucleicos (es decir, una secuencia de consulta y una objeto) se alinean óptimamente usando el algoritmo BLASTN (manualmente o mediante ordenador) usando parámetros apropiados descritos más adelante, la secuencia objeto tiene al menos aproximadamente el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias de ácidos nucleicos con la secuencia de consulta. Parámetros usados para los alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos son: recompensa por apareamiento 1, penalización por desapareamiento -3,

penalización por existencia de hueco 5, penalización por extensión de hueco 2 (las matrices de sustitución no se usan en el algoritmo BLASTN). En algunos casos, la identidad sustancial existe sobre una longitud de comparación de al menos 300 residuos de nucleótidos, por ejemplo, al menos 330, 345, 354, 357, 360, 363, 366, 369, 362, 365, 375, 390, 405, 420, 435, 450, 600, 750, 900, 1035, 1038, 1041, 1044, 1047, 1050, 1053, 1056, 1059, 1062, 1065, 1068, 1071, 1074, 1077, 1080, 1200, 1350 ó 1500 residuos de nucleótidos.

Pueden usarse otros programas de alineamiento de secuencias conocidos en la técnica. El programa ALIGN produce un alineamiento global (general) óptimo de las dos secuencias de proteínas o ácidos nucleicos elegidas usando una modificación del algoritmo de programación dinámica descrito por Myers y Miller CABIOS 4:11-17 (1988). El programa ALIGN normalmente, aunque no es necesario, se usa con huecos terminales ponderados. Si las penalizaciones por apertura de hueco y extensión de hueco están disponibles, frecuentemente se fijan entre aproximadamente -5 a -15 y 0 a -3, respectivamente, más preferentemente aproximadamente -12 y -0,5 a -2, respectivamente, para el alineamiento de secuencias de aminoácidos, y -10 a -20 y -3 a -5, respectivamente, más comúnmente aproximadamente -16 y -4, respectivamente, para alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos. El programa ALIGN se describe adicionalmente en Pearson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 (1988), y Pearson y col., Meth. Enzymol. 18:63-98 (1990).

Alternativamente, y particularmente para el análisis de múltiples secuencias (es decir, comparación de más de tres secuencias), puede usarse el programa CLUSTALW (descrito en, por ejemplo, Thompson y col., Nucl. Acids Res. 22:4673-4680 (1994)). El programa CLUSTALW es un algoritmo adecuado para alineamientos de múltiples secuencias de ADN y aminoácidos (Thompson y col., Nucl. Acids Res. 22:4673-4680 (1994)). CLUSTALW realiza múltiples comparaciones por emparejamiento entre grupos de secuencias y las ensambla en un alineamiento múltiple basado en homología. En un aspecto, las penalizaciones por apertura de hueco y por extensión de hueco están fijadas a 10 y 0,05, respectivamente. Alternativamente o adicionalmente, el programa CLUSTALW se ejecuta usando parámetros "dinámicos" (frente a "rápidos"). Normalmente, el análisis de secuencias de nucleótidos con CLUSTALW se realiza usando la matriz BESTFIT, mientras que las secuencias de aminoácidos se evalúan usando un conjunto variable de matrices BLOSUM dependiendo del nivel de identidad entre las secuencias (por ejemplo, como se usa por el programa CLUSTALW versión 1.6 disponible por San Diego Supercomputer Center (SDSC) o la versión W 1.8 disponible de European Bioinformatics Institute, Cambridge, RU). Preferentemente, los parámetros de CLUSTALW se fijan a los parámetros por defecto de SDSC CLUSTALW (por ejemplo, con respecto a penalizaciones por hueco hidrófilo especiales en análisis de secuencias de aminoácidos). El programa CLUSTALW se describe adicionalmente en, por ejemplo, Higgins y col., CABIOS 8(2):189-91 (1992), Thompson y col., Nucleic Acids Res. 22:4673-80 (1994), y Jeanmougin y col., Trends Biochem. Sci. 2:403-07 (1998).

En un formato alternativo, la identidad o identidad en porcentaje entre un par particular de secuencias de aminoácidos alineadas se refiere al porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos que se obtiene por el análisis CLUSTALW (por ejemplo, versión W 1.8), contando el número de coincidencias idénticas en un alineamiento y dividiendo tal número de coincidencias idénticas por el mayor de (i) la longitud de las secuencias alineadas, y (ii) 96, y usando los siguientes parámetros ClustalW por defecto para lograr alineamientos por emparejamiento lento/preciso - penalización por apertura de hueco: 10; penalización por extensión de hueco: 0,10; matriz de peso de proteínas: serie Gonnet; matriz de peso de ADN: IUB; alineamientos por emparejamiento conmutación lenta/rápida = alineamiento SLOW o FULL.

Otro algoritmo útil para determinar la identidad en porcentaje o porcentaje de similitud es el algoritmo FASTA, que se describe en Pearson y col., Proc Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) y Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996). Los parámetros típicos usados en un alineamiento FASTA de secuencias de ADN para calcular la identidad en porcentaje se optimizan, matriz BL50 15: -5, k-tuple = 2; penalización por unión = 40, optimización = 28; penalización por hueco = - 12, penalización por longitud de hueco = -2; y anchura = 16.

Otros algoritmos adecuados incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que facilitan el análisis de al menos dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos, alineando una secuencia seleccionada contra múltiples secuencias en una base de datos (por ejemplo, GenSeq) o, cuando se modifican por un algoritmo adicional tal como BL2SEQ, entre dos secuencias seleccionadas. El software para realizar los análisis BLAST está públicamente disponible del Centro nacional para información biotecnológica (NCBI) (dirección del sitio de la web universal ncbi.nlm.nih.gov). El algoritmo BLAST implica identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) que identifican palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que tanto coinciden como satisfacen alguna puntuación T umbral con valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul y col., arriba). Estas palabras iniciales vecinas actúan de semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contienen. Las palabras iniciales se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para que, en la medida de lo posible, pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos de apareamiento; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para aparear residuos; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se usa para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras iniciales en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada se cae por la cantidad X de su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada tiende a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros

W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) puede usarse con una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP (por ejemplo, BLASTP 2.0.14; 29 de junio de 2000) puede usarse con una longitud de palabra de 3 y una esperanza (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) usa alineamientos (B) de 50, esperanza (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas. De nuevo, como con otros algoritmos adecuados, la rigurosidad de comparación puede aumentarse hasta que el programa identifique sólo secuencias que están más estrechamente relacionadas con aquellas en el listado de secuencias en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 85, 90, 91, 92, 93, 49, 95, 96, 97, 98, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada de SEC ID N°: 1-79, 197-200, 205-214 y 219-222; o ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 85, 90, 91, 92, 93, 49, 95, 96, 97, 98, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de nucleótidos seleccionada de cualquiera de SEC ID N°: 80-158, 201-204, 223 y 224, o una secuencia de nucleótidos complementaria de la misma.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud o identidad entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de la similitud o identidad proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)) que proporciona una indicación de la probabilidad a la que un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con respecto al ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, tal como inferior a aproximadamente 0,01 o inferior a aproximadamente 0,001.

El análisis del programa BLAST también puede modificarse o alternativamente puede modificarse por programas de filtrado de baja complejidad tales como los programas DUST o SEG, que están preferentemente integrados en las operaciones del programa BLAST (véase, por ejemplo, Wootton y col., Comput. Chem. 17:149-63 (1993), Altschul y col., Nat. Genet. 6:119-29 (1991), Hancock y col., Comput. Appl. Biosci. 10:67-70 (1991), y Wootton y col., Meth. Enzymol. 266:554-71 (1996)). En tales aspectos, si se usa una relación lambda, parámetros útiles para la relación son entre 0,75 y 0,95, que incluyen entre 0,8 y 0,9. Si se usan costes por existencia de hueco (o puntuaciones por hueco) en tales aspectos, el coste por existencia de hueco normalmente está fijado entre aproximadamente -5 y -15, más normalmente aproximadamente -10, y el coste por hueco por residuo normalmente se fija entre aproximadamente 0 y -5, tal como entre 0 y -3 (por ejemplo, -0,5). Pueden usarse parámetros de hueco similares con otros programas según convenga. Los programas BLAST y los principios que los subyacen se describen adicionalmente en, por ejemplo, Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990), Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68 (199) (como se modifica por Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77 (1993)), y Altschul y col., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1997).

Otro ejemplo de un algoritmo útil se incorpora en el software PILEUP. El programa PILEUP crea un alineamiento de múltiples secuencias de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos por emparejamiento progresivos para mostrar la relación y porcentaje de identidad de secuencias o porcentaje de similitud de secuencias. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-360, que es similar al procedimiento descrito por Higgins & Sharp (1989) CABIOS 5:151-153. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de múltiples alineamientos empieza con el alineamiento por emparejamiento de las dos secuencias más similares que producen una agrupación de dos secuencias alineadas. Entonces, esta agrupación se alinea con la siguiente secuencia más relacionada o agrupación de secuencias alineadas. Dos agrupaciones de secuencias se alinean por una simple extensión del alineamiento por emparejamiento de dos secuencias individuales. El alineamiento final se logra por una serie de alineamientos por emparejamiento progresivos. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros de programa. Usando PILEUP, una secuencia de referencia se compara con otras secuencias de prueba para determinar la relación del porcentaje de identidad de secuencias (o porcentaje de similitud de secuencias) usando parámetros especificados. Parámetros a modo de ejemplo para el programa PILEUP son: peso de hueco por defecto (3,00), peso por longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos terminales ponderados. PILEUP es un componente del paquete de software de análisis de secuencias GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux y col. (1984) Nucl. Acids Res. 12:387-395).

Otros algoritmos útiles para realizar análisis de identidad incluyen el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, y la búsqueda por el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444. Implementaciones computerizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA) se proporcionan en the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI.

60 Variación de secuencias

Como se ha tratado anteriormente, en el presente documento se desvela un polipéptido del dominio extracelular de

CTLA-4 mutante aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que (a) se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 en no más de 6 residuos de aminoácidos (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácidos), en el que el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos, y/o inhibe una respuesta inmunitaria. Tal(es) sustitución (sustituciones) de aminoácidos incluye(n) sustitución (sustituciones) de aminoácidos conservativas.

Como ejemplo no limitante, un polipéptido de la divulgación puede tener una secuencia de polipéptidos que se diferencia de SEC ID N°: 1 en un total de hasta 6 aminoácidos (que pueden ser una combinación de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones, que incluyen aquellas descritas anteriormente). En algunos casos, ninguna, alguna o todas las sustituciones son sustituciones según un grupo de sustitución definido más adelante.

Las sustituciones de aminoácidos según la invención pueden incluir, pero no se limitan a, una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Una sustitución de residuos de aminoácidos conservativa normalmente implica intercambiar un miembro dentro de una clase funcional de residuos de aminoácidos por un residuo que pertenece a la misma clase funcional (residuos de aminoácidos idénticos se consideran funcionalmente homólogos o conservados en el cálculo de porcentaje de homología funcional). Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Un ejemplo se proporciona en la Tabla 1, que expone seis grupos a modo de ejemplo que contienen aminoácidos que pueden considerarse "sustituciones conservativas" entre sí.

Tabla 1. Grupos de sustitución conservativa de residuos de aminoácidos

1	Alanina (A)	Glicina (G)	Serina (S)	Treonina (T)
2	Ácido aspártico (D)	Ácido glutámico (E)		
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)		
4	Arginina (R)	Lisina (K)	Histidina (H)	
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M)	Valina (V)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptófano (W)	

Pueden preverse otros grupos de sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden agruparse por función o estructura o composición química similar (por ejemplo, ácido, básico, alifático, aromático, que contiene azufre). Por ejemplo, una agrupación alifática puede comprender: glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí incluyen: aromáticos: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); que contienen azufre: metionina (M), cisteína (C); básicos: arginina (R), lisina (K), histidina (H); ácidos: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); residuos sin carga no polares, cisteína (C), metionina (M) y prolina (P); residuos sin carga hidrófilos: serina (S), treonina (T), asparagina (N) y glutamina (Q). Véase también Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company, para agrupaciones adicionales de aminoácidos. El listado de una secuencia de polipéptidos en el presente documento, conjuntamente con los grupos de sustitución anteriores, proporciona un listado explícito de todas las secuencias de polipéptidos conservativamente sustituidas.

Existen sustituciones más conservativas dentro de las clases de residuos de aminoácidos descritas anteriormente, que también pueden ser adecuadas o alternativamente pueden ser adecuadas. Los grupos de conservación para sustituciones que son más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Por tanto, en el presente documento se desvela, por ejemplo, en un aspecto particular, un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o el 99% de identidad con SEC ID N°: 1 (o cualquiera de SEC ID N°: 1-79, 197-200, 205-214 y 219-222) y que se diferencia de la secuencia de SEC ID N°: 1 en su mayoría (por ejemplo, al menos el 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%), si no la totalidad, por tales sustituciones de aminoácidos más conservativas.

Grupos adicionales de sustituciones de aminoácidos que también puede ser adecuados pueden determinarse usando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) *PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES* (2ª ed. 1993), W.H. Freeman and Company. En algunos aspectos, al menos el 33%, 50%, 60%, 70%, o más (por ejemplo, al menos el 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97% o más) de las sustituciones en una variante de secuencia de aminoácidos comprende sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos de la invención con residuos que están dentro de la misma clase de homología funcional (como se determina por cualquier sistema de clasificación adecuado, tal como aquellas descritas anteriormente) que los residuos de aminoácidos de la secuencia de polipéptidos que sustituyen.

Variaciones conservativamente sustituidas de una secuencia de polipéptidos de la presente invención incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, normalmente inferior al 10%, 9%, 8%, 7% o el 6% de los aminoácidos de la

secuencia de polipéptidos, o más normalmente inferior al 5%, 4%, 3%, 2% o el 1%, de los aminoácidos de la secuencia de polipéptidos, con un aminoácido conservativamente seleccionado del mismo grupo de sustitución conservativa.

5 En el presente documento se desvelan polipéptidos que comprenden variaciones de aminoácidos de una secuencia de polipéptidos descrita en el presente documento. Como se ha tratado anteriormente, en un aspecto, la divulgación incluye polipéptidos aislados o recombinantes (por ejemplo, polipéptidos CTLA-4 mutantes tales como, por ejemplo, polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante), comprendiendo cada uno una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, y se unen a CD80 y/o CD86 o un fragmento de polipéptido de CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera de ellos o ambos), y/o suprime una respuesta inmunitaria. Tales polipéptidos pueden variar por una o más deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos, que incluyen una o más sustituciones conservativas o no conservativas, siempre que, sin embargo, los polipéptidos posean las propiedades funcionales descritas. En el presente documento se desvelan variantes de polipéptidos que comprenden variaciones conservativamente modificadas de cualquier polipéptido tal descrito en el presente documento tales como, por ejemplo, una que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-73.

20 Como también se ha tratado anteriormente, en el presente documento se desvelan proteínas de fusión aisladas o recombinantes (por ejemplo, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes) que comprenden cada una una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en las que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o suprime una respuesta inmunitaria como se desvela en el presente documento. Tales proteínas de fusión pueden variar por una o más deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos que incluyen una o más sustituciones conservativas o no conservativas, siempre que, sin embargo, las proteínas de fusión posean las propiedades funcionales descritas. En el presente documento se desvelan variantes de polipéptidos que comprenden variaciones conservativamente modificadas de cualquier proteína de fusión tal descrita en el presente documento tal como, por ejemplo, una que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222.

30 También se desvelan variantes de polipéptidos de cualquier polipéptido aislado o recombinante de la divulgación descritas anteriormente o en otra parte en el presente documento, en las que la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptidos se diferencia de la secuencia de polipéptidos respectiva del polipéptido de referencia por una o más sustituciones de residuos de aminoácidos conservativas, aunque sustituciones no conservativas son algunas veces permisibles o incluso preferibles (ejemplos de tales sustituciones no conservativas se tratan adicionalmente en el presente documento). Por ejemplo, la secuencia de la variante de polipéptidos puede variar de una secuencia de polipéptidos CTLA-4 mutantes por una o más sustituciones de residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante con uno o más residuos de aminoácidos que tienen peso similar (es decir, un residuo que tiene homología de peso con el residuo en la secuencia de polipéptidos respectiva que sustituye). El peso (y correspondientemente el tamaño) de los residuos de aminoácidos de un polipéptido puede afectar significativamente la estructura del polipéptido. La conservación en peso u homología se basa en si un aminoácido correspondiente no idéntico está asociado a una puntuación positiva en una de las matrices basadas en peso descritas en el presente documento (por ejemplo, matriz BLOSUM50; matriz PAM250).

45 Similar a las clases de aminoácidos funcionales anteriormente descritas, los residuos de aminoácidos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos de conservación basados en peso (que se dividen entre grupos de conservación "fuertes" y "débiles"). Los ocho grupos de conservación fuertes basados en peso comúnmente usados son Ser Thr Ala, Asn Glu Gln Lys, Asn His Gln Lys, Asn Asp Glu Gln, Gln His Arg Lys, Met Ile Leu Val, Met Ile Leu Phe, His Tyr y Phe Tyr Trp. Los grupos de conservación débiles basados en peso incluyen Cys Ser Ala, Ala Thr Val, Ser Ala Gly, Ser Thr Asn Lys, Ser Thr Pro Ala, Ser Gly Asn Asp, Ser Asn Asp Glu Gln Lys, Asn Asp Glu Gln His Lys, Asn Glu Gln His Arg Lys, Phe Val Leu Ile Met y His Phe Tyr. Algunas versiones del programa de análisis de secuencias CLUSTAL W proporcionan un análisis de grupos de conservación fuertes y débiles basados en peso en la salida de un alineamiento, ofreciendo así una técnica conveniente para determinar la conservación basada en peso (por ejemplo, CLUSTAL W proporcionada por SDSC, que normalmente se usa con los parámetros por defecto de SDSC). En algunos aspectos, al menos el 33%, 50%, 60%, 70%, 80% o el 90% de las sustituciones en tal variante de polipéptidos comprende sustituciones en las que un residuo dentro de una conservación basada en peso sustituye un residuo de aminoácido de la secuencia de polipéptidos que está en el mismo grupo de conservación basado en peso. En otras palabras, un porcentaje de sustituciones tal está conservado en términos de características de peso de residuos de aminoácidos.

60 La secuencia de una variante de polipéptidos puede diferenciarse de un polipéptido CTLA-4 mutante de la invención por una o más sustituciones de aminoácidos con uno o más residuos de aminoácidos que tienen un perfil de hidropatía similar (es decir, que presentan hidrofilia similar) a los residuos (originales) sustituidos del polipéptido CTLA-4 mutante. Un perfil de hidropatía puede determinarse usando el índice de Kyte y Doolittle, siendo las puntuaciones para cada aminoácido que se produce naturalmente en el índice del siguiente modo: I (+4,5), V (+4,2), L (+3,8), F (+2,8), C (+2,5), M (+1,9); A (+1,8), G (-0,4), T (-0,7), S (-0,8), W (-0,9), Y (-1,3), P (-1,6), H (-3,2); E (-

3,5), Q (-3,5), D (-3,5), N (-3,5), K (-3,9) y R (-4,5). (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.554.101 y Kyte & Doolittle, J. Molec. Biol. 157:105-32 (1982) para discusión adicional). Al menos el 75%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de variante que no son idénticos a los residuos correspondientes en la secuencia de polipéptidos CTLA-4 mutante idéntica o funcionalmente homóloga desvelada en el presente documento ("homólogo más relacionado"), cuyo homólogo puede seleccionarse de cualquiera de SEC ID N°: 1-73, presenta menos de +/-2 de cambio en la hidrofilia, que incluye menos de un +/-1 de cambio en hidrofilia y menos de un +/-0,5 de cambio en la hidrofilia con respecto al residuo de aminoácido no idéntico en la posición correspondiente en el homólogo más relacionado. El polipéptido de variante puede presentar un cambio total en la hidrofilia con respecto a su homólogo más relacionado seleccionado del grupo de SEC ID N°: 1-73 de menos de aproximadamente 150, menos de aproximadamente 100, y/o menos de aproximadamente 50 (por ejemplo, menos de aproximadamente 30, 20 ó 10).

Ejemplos de sustituciones de aminoácidos típicas que retienen hidrofilia similar o idéntica incluyen sustituciones de arginina-lisina, sustituciones de glutamato-aspartato, sustituciones de serina-treonina, sustituciones de glutamina-asparagina y sustituciones de valina-leucina-isoleucina. Algoritmos y software, tal como el programa GREASE disponible del SDSC, proporcionan una forma conveniente para evaluar rápidamente el perfil de hidropatía de una secuencia de aminoácidos. Debido a que una proporción sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente el 33%), si no la mayoría (al menos el 50%) o casi todas (por ejemplo, aproximadamente el 65, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99%) de las sustituciones de aminoácidos en la secuencia de una variante de polipéptidos, tendrá frecuentemente una puntuación de hidropatía similar a la del residuo de aminoácido que sustituyen en la secuencia de polipéptidos (de referencia), se espera que la secuencia de la variante de polipéptidos presente una salida del programa GREASE similar a la de la secuencia de polipéptidos. Por ejemplo, en un aspecto particular puede esperarse que una variante de polipéptidos de SEC ID N°: 61 tenga una salida del programa GREASE (o programa similar) que es más parecida a la salida de GREASE obtenida entrando la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 61 que la obtenida usando un polipéptido CTLA-4 WT (por ejemplo, hCTLA-4), que puede determinarse por inspección visual o comparación ayudada por ordenador de la salida gráfica (por ejemplo, revestimiento/alineamiento gráfico) y/o numérica proporcionada sometiendo la secuencia de variante de prueba y SEC ID N°: 1 al programa.

La conservación de residuos de aminoácidos en términos de homología funcional, homología en peso y características de hidropatía también se aplican a otras variantes de secuencias de polipéptidos proporcionadas por la divulgación que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, variantes de secuencias de polipéptidos de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-79197-200, 205-214 y 219-222.

En el presente documento se desvela al menos una variante de polipéptido tal que comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de polipéptidos recombinante seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante tiene al menos una sustitución de residuos de aminoácidos tal seleccionada según conservación u homología basada en peso o perfil de hidropatía similar como se ha tratado anteriormente. Tales variantes de polipéptidos descritas anteriormente normalmente tienen una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 y/o una capacidad para suprimir al menos un tipo de respuesta inmunitaria como se ha descrito anteriormente y en mayor detalle más adelante en los ejemplos.

Secuencias de péptidos señal

Los polipéptidos de la invención también pueden comprender además cualquier número y tipo adecuado de secuencias de aminoácidos adicionales tales como uno o más fragmentos de péptidos. En una realización, un polipéptido tal de la invención comprende además un péptido señal. Generalmente, el péptido señal dirige el polipéptido recombinante al retículo endoplásmico cuando el polipéptido recombinante se expresa en una célula animal. Puede incluirse una secuencia señal que dirige el tráfico y/o secreción de orgánulos de al menos una parte del polipéptido tras la expresión en una célula. Tales secuencias están normalmente presentes en la forma inmadura (es decir, no completamente procesada) del polipéptido, y posteriormente son eliminadas/degradadas por proteasas celulares para llegar a la forma madura de la proteína. Por ejemplo, un polipéptido CTLA-4 mutante o proteína de fusión de la invención puede incluir cualquier secuencia señal adecuada o combinaciones de secuencias señal que dirigen el polipéptido a compartimentos intracelulares tales como una secuencia que dirige el polipéptido a transportar (por ejemplo, translocar) (por ejemplo, de forma que la proteína sea procesada por y liberada de) al retículo endoplásmico o ruta secretora (por ejemplo, el RE, golgi, y otros orgánulos y compartimentos celulares relacionados secretados), el núcleo y/o que dirige el polipéptido a secretar de la célula, translocada en una membrana celular, o elige como diana una segunda célula diferente de la célula de la que es secretada la proteína. A este respecto, el polipéptido puede incluir una secuencia de elección de diana intracelular (o "señal de clasificación") que dirige el polipéptido a un compartimento(s) endosómico(s) y/o lisosómico(s) u otro compartimento rico en MHC II para promover la presentación y respuesta de linfocitos T CD4+ y/o CD8+, tal como una señal de clasificación de elección de diana lisosómica/endosómica derivada de la proteína 1 de membrana asociada a lisosoma (por ejemplo, LAMP-1 - véase, por ejemplo, Wu y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1161-75 (1995) y Raviprakash y col., Virology 290:74-82 (2001)), una parte u homólogo de la misma (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.633.234), u otra secuencia de elección de diana lisosómica, endosómica y/o de RE adecuada (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.248.565). En algunos aspectos puede ser deseable que la secuencia de elección de diana intracelular se localice próxima o adyacente a una secuencia(s) de epítipo demostrada(s)/identificada(s) dentro del polipéptido, que puede(n) identificarse por técnicas conocidas en la técnica,

aumentando así la probabilidad de presentación de linfocitos T de fragmentos de polipéptidos que comprenden tal(es) epítipo(s). Tales polipéptidos pueden expresarse a partir de un ADN aislado, recombinante o sintético o ARN liberado a un huésped celular por uno o más de los vectores de transferencia de nucleótidos que incluyen, por ejemplo, uno o más de los vectores de transferencia de genes descritos adicionalmente en el presente documento.

- 5 El polipéptido puede comprender una secuencia señal que dirige el polipéptido al retículo endoplásmico (RE) (por ejemplo, facilita la translocalización por el RE del polipéptido) cuando el polipéptido se expresa en una célula de mamífero. El polipéptido puede comprender cualquier secuencia que elija como diana RE adecuado. En la técnica se conocen muchas secuencias que eligen como diana RE. Ejemplos de tales secuencias señal se describen en la patente de EE.UU. nº 5.846.540. Secuencias señal de RE/de la secreción comúnmente empleadas incluyen la
10 secuencia señal del factor alfa de levadura y secuencias señal víricas de mamífero tales como secuencia señal del virus del herpes gD. Péptidos señal a modo de ejemplo para la producción de *E. coli* incluyen las secuencias señal STII o lpp de *E. coli*. Otros ejemplos de secuencias señal se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.690.898, 5.284.768, 5.580.758, 5.652.139 y 5.932.445. Secuencias señal adecuadas pueden identificarse usando habilidad conocida en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el programa SignalP (descrito en, por ejemplo, Nielsen
15 y col. (1997) *Protein Engineering* 10:1-6), que está públicamente disponible del Center para análisis biológico de secuencias en la dirección del sitio de la web universal designada cbs.dtu.dk/services/SignalP, o software de análisis de secuencias similar capaz de identificar dominios similares a secuencia señal. Técnicas relacionadas para identificar péptidos señal adecuados se proporcionan en Nielsen y col., *Protein Eng.* 10(1):1-6 (1997). Las secuencias pueden analizarse manualmente para características comúnmente asociadas a secuencias señal como se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente europea nº 0 621 337, Zheng y Nicchitta (1999) *J. Biol. Chem.*
20 274(51): 36623-30, y Ng y col. (1996) *J. Cell Biol.* 134(2):269-78.

Aspectos adicionales

- Cualquier polipéptido de la invención (incluyendo cualquier proteína de fusión de la invención) puede estar presente como parte de una secuencia de polipéptidos mayor tal como se produce tras la adición de uno o más dominios o
25 subsecuencias para la estabilización o detección o purificación del polipéptido. Tales dominios o subsecuencias pueden fusionarse covalentemente con el polipéptido de la invención, como entendería fácilmente un experto y sería capaz de construir. Una subsecuencia de purificación de polipéptidos puede incluir, por ejemplo, una marca de epítipo, una marca FLAG, una secuencia de polihistidina, una fusión GST o cualquier otra subsecuencia o "marca" de detección/purificación conocida en la técnica. Estos dominios o subsecuencias adicionales tienen tanto poco
30 como ningún efecto sobre la actividad del polipéptido de la invención, o pueden eliminarse por etapas de procesamiento después de la síntesis tales como mediante tratamiento con una proteasa, inclusión de una inteína o similares.

- Cualquier polipéptido de la invención (incluyendo cualquier proteína de fusión de la invención) también puede comprender uno o más aminoácidos modificados. El aminoácido modificado puede ser, por ejemplo, un aminoácido
35 glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto de lípido y/o un aminoácido conjugado con un agente derivatizante. La presencia de aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, (a) aumentar la semivida del polipéptido en suero y/o semivida *in vivo* funcional, (b) reducir la antigenicidad o inmunogenicidad de polipéptidos, (c) aumentar la estabilidad durante el almacenamiento de polipéptidos, (d) aumentar la biodisponibilidad, (e) disminuir la función efectora, y/o (f) disminuir o inhibir la autoasociación no deseada (por
40 ejemplo, formación de agregados) entre dos o más moléculas de la invención (tal como entre dos o más dímeros de proteínas de fusión de la invención). El (Los) aminoácido(s) se modifican, por ejemplo, co-traduccionalmente o post-traduccionalmente durante la producción recombinante (por ejemplo, glucosilación ligada en N en los motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican por medios sintéticos.

- 45 Los polipéptidos de la invención (incluyendo proteínas de fusión de la invención) descritos en el presente documento pueden modificarse adicionalmente en una variedad de formas por, por ejemplo, modificación post-traducciona y/o modificación o variación sintética. Por ejemplo, los polipéptidos o proteínas de fusión de la invención pueden glucosilarse adecuadamente, normalmente mediante expresión en una célula de mamífero. Por ejemplo, la divulgación incluye polipéptidos glucosilados que pueden unirse a CD86 y/o CD80 y/o tienen una capacidad para
50 suprimir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, proliferación o activación de linfocitos T) como se describe en otra parte en el presente documento, en el que cada polipéptido glucosilado dicho comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 1-79, 197-200, 205-214 y 219-222.

- Los polipéptidos de la invención pueden someterse a cualquier número de formas adicionales adecuadas de
55 modificación o variación post-traducciona y/o sintética. Por ejemplo, la invención proporciona miméticos de proteínas de los polipéptidos de la invención. Los miméticos de péptidos se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.668.110 y las referencias citadas en su interior.

- En otro aspecto, un polipéptido o proteína de fusión de la invención puede modificarse mediante la adición de grupos
60 protectores a las cadenas laterales de uno o más de los aminoácidos del polipéptido o proteína de fusión. Tales grupos protectores pueden facilitar el transporte del polipéptido o proteína de fusión mediante membrana(s), si se

desea, o mediante cierto(s) tejido(s), por ejemplo, reduciendo la hidrofilia y aumentando la lipofilia del polipéptido o proteína de fusión. Ejemplos de grupos protectores adecuados incluyen grupos protectores de éster, grupos protectores de amina, grupos protectores de acilo y grupos protectores de ácido carboxílico, que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.121.236). Las proteínas de fusión sintéticas de la invención pueden tomar cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la proteína de fusión puede modificarse estructuralmente de su configuración que se produce naturalmente para formar un péptido cíclico u otro péptido estructuralmente modificado.

Los polipéptidos de la invención también pueden ligarse a uno o más polímeros no proteináceos, normalmente a un polímero sintético hidrófilo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno, usando técnicas muy conocidas en la técnica, tal como se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.179.337, 4.301.144, 4.496.689, 4.640.835, 4.670.417 y 4.791.192, o un polímero similar tal como poli(alcohol vinílico) o polivinilpirrolidona (PVP).

La invención incluye conjugados que comprenden al menos un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante, CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante multimérico, CTLA-4-Ig mutante multimérica) y un resto de no polipéptido. El término "conjugado" (o indistintamente "polipéptido conjugado") está previsto que indique una molécula heterogénea (en el sentido de material compuesto o quimérico) formada por la unión covalente de uno o más polipéptidos a uno o más restos de no polipéptido. El término "unión covalente" significa que el polipéptido y el resto de no polipéptido están tanto directamente covalentemente unidos entre sí como bien están indirectamente covalentemente unidos entre sí mediante un resto o restos intervinientes tales como un resto o restos de puente, espaciador o enlace usando un grupo de unión presente en el polipéptido. Preferentemente, el conjugado es soluble a concentraciones y condiciones relevantes, es decir, soluble en fluidos fisiológicos tales como sangre. Ejemplos de polipéptidos conjugados de la invención incluyen polipéptidos glucosilados y/o PEGilados. El término "polipéptido no conjugado" puede usarse como parte de polipéptido del conjugado. Un conjugado tal normalmente se une a CD80 (por ejemplo, hCD80) y/o CD86 (por ejemplo, hCD86) y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos (incluyendo hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria tal puede comprender, pero no se limita a, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis/producción de citocinas, inducción de marcadores de activación, producción de moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno y/o respuesta de Ab dependiente de linfocitos T. Polipéptidos a modo de ejemplo incluyen aquellos que tienen al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-79, 197-200, 205-214 y 219-222.

Está previsto que el término "resto de no polipéptido" indique una molécula que puede conjugarse con un grupo de unión de un polipéptido de la invención. Ejemplos preferidos de tal molécula incluyen moléculas de polímero, restos de azúcar, compuestos lipófilos o agentes derivatizantes orgánicos. Cuando se usa en el contexto de un conjugado como se describe en el presente documento se entenderá que el resto de no polipéptido está ligado a la parte de polipéptido del conjugado mediante un grupo de unión del polipéptido.

El término "molécula de polímero" se define como una molécula formada por enlace covalente de dos o más monómeros, en la que ninguno de los monómeros es un residuo de aminoácido, excepto cuando el polímero es albúmina humana u otra proteína de plasma abundante. El término "polímero" puede usarse indistintamente con el término "molécula de polímero".

Un sitio de N-glucosilación tiene la secuencia N-X-S/T/C, en la que X es cualquier residuo de aminoácido, excepto prolina, N es asparagina y S/T/C es tanto serina, treonina como cisteína, preferentemente serina o treonina, y lo más preferentemente treonina.

Un "sitio de O-glucosilación" comprende el grupo OH de un residuo de serina o treonina.

Está previsto que el término "grupo de unión" indique un grupo de residuos de aminoácidos del polipéptido que puede acoplarse al resto de no polipéptido relevante, tal como una molécula de polímero o un resto de azúcar. Ejemplos no limitantes de grupos de unión útiles y algunos restos de no polipéptido correspondientes se proporcionan en la Tabla 2 dada a continuación.

Tabla 2. Grupos de unión útiles y ejemplos de restos de no polipéptido correspondientes

Grupo de unión	Aminoácido	Ejemplos de restos de no polipéptido	Ejemplos de procedimiento de conjugación / PEG activado	Referencia
-NH ₂	Extremo N, Lys	Polímero, por ejemplo, PEG	mPEG-SPA mPEG2-NHS mPEG2-butyrAL D	Catálogo de 2003 de Nektar Inc.; véase también Nektar Therapeutics, catálogo de 2005-06

(continuación)

Grupo de unión	Aminoácido	Ejemplos de restos de no polipéptido	Ejemplos de procedimiento de conjugación / PEG activado	Referencia
-COOH	Extremo C, Asp, Glu	Polímero, por ejemplo, PEG Resto de azúcar	mPEG-Hz Acoplamiento <i>in vitro</i>	Catálogo de 2003 de Nektar Inc.; véase también Nektar Therapeutics, catálogo de 2005-06
-SH	Cys	Polímero, por ejemplo, PEG Resto de azúcar	mPEG-VS mPEG2-MAL (mPEG-maleimida) Acoplamiento <i>in vitro</i>	Catálogo de 2003 de Nektar Inc.; Nektar Therapeutics, catálogo de 2005-06; Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9(3,4):249-304 (1992)
-OH	Ser, Thr, OH-	Resto de azúcar	Glucosilación ligada en O <i>in vivo</i>	
-CONH ₂	Asn como parte de un sitio de N-glucosilación	Resto de azúcar	N-glucosilación <i>in vivo</i>	
Residuo aromático	Phe, Tyr, Trp	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	
-CONH ₂	Gln	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Yan y Wold, Biochemistry, 1984, Jul 31; 23(16): 3759-65
Aldehído Cetona	Hidrato de carbono oxidado	Polímero, por ejemplo, PEG, PEG-hidrazida	PEGilación	Andresz y col., 1978, Makromol. Chem. 179:301; documentos WO 92/16555, WO 00/23114
Guanidino	Arg	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Lundblad y Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, FL
Anillo de imidazol	His	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	como para guanidina

5 Para N-glucosilación *in vivo*, el término "grupo de unión" se usa en una forma no convencional para indicar los residuos de aminoácidos que constituyen un sitio de N-glucosilación (con la secuencia N-X-S/T/C en la que X es cualquier residuo de aminoácido, excepto prolina, N es asparagina y S/T/C es tanto serina, treonina como cisteína, preferentemente serina o treonina, y lo más preferentemente treonina). Aunque el residuo de asparagina del sitio de N-glucosilación es con el que el resto de azúcar se une durante la glucosilación, tal unión no puede lograrse a menos que estén presentes los otros residuos de aminoácidos del sitio de N-glucosilación. Por consiguiente, cuando el resto de no polipéptido es un resto de azúcar y la conjugación va a lograrse por N-glucosilación, el término "residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para el resto de no polipéptido" como se usa a propósito de alteraciones de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención debe entenderse como uno, dos o todos los residuos de aminoácidos que constituyen un sitio de N-glucosilación que va a alterarse en de tal forma que tanto un sitio de N-glucosilación funcional se introduzca en la secuencia de aminoácidos, se elimine de dichas secuencias, como un sitio de N-glucosilación funcional sea retenido en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, sustituyendo un residuo de serina, que ya constituye parte de un sitio de N-glucosilación, con un residuo de treonina y viceversa).

15 El término "introducir" (es decir, un residuo de aminoácido "introducido", "introducción" de un residuo de aminoácido) pretende significar principalmente la sustitución de un residuo de aminoácido existente con otro residuo de aminoácido, pero también puede significar la inserción de un residuo de aminoácido adicional.

20 El término "eliminar" (es decir, un residuo de aminoácido "eliminado", "eliminación" de un residuo de aminoácido) pretende significar principalmente la sustitución del residuo de aminoácido a eliminar por otro residuo de aminoácido, pero también puede significar la delección (sin sustitución) del residuo de aminoácido a eliminar.

El término "residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para el resto de no polipéptido" está previsto que indique que el residuo de aminoácido es uno con el que se une el resto de no polipéptido (en el caso de un residuo de aminoácido introducido) o se habría unido (en el caso de un residuo de aminoácido eliminado).

25 Eliminando y/o introduciendo residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de unión para el resto de no polipéptido es posible adaptar específicamente el polipéptido de la invención de manera que haga la molécula más

5 susceptible a conjugación con el resto de no polipéptido de elección, optimizar el patrón de conjugación (por ejemplo, para garantizar una distribución óptima de restos de no polipéptido sobre la superficie del polipéptido y así, por ejemplo, proteger eficazmente epítopes y otras partes superficiales del polipéptido sin alterar significativamente la función del mismo). Por ejemplo, por la introducción de grupos de unión, el polipéptido se altera en el contenido de
 10 residuos de aminoácidos específicos con los que se une el resto de no polipéptido relevante, por lo que se logra una conjugación más eficiente, específica y/o extensiva. Eliminando uno o más grupos de unión es posible evitar la conjugación con el resto de no polipéptido en partes del polipéptido en las que tal conjugación es desventajosa, por ejemplo, con un residuo de aminoácido localizado en o próximo a un sitio funcional del polipéptido (ya que la conjugación en un sitio tal puede producir la inactivación o unión a CD80 o CD86 reducida o actividad
 15 inmunosupresora reducida del conjugado resultante). Además, puede ser ventajoso eliminar un grupo de unión localizado próximo a otro grupo de unión.

El residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para un resto de no polipéptido, tanto si es un residuo existente como un residuo eliminado o introducido, se selecciona basándose en la naturaleza del resto de no polipéptido y, en algunos casos, basándose en el procedimiento de conjugación que va a usarse. Por ejemplo,
 20 cuando el resto de no polipéptido es una molécula de polímero, tal como una molécula derivada de polietilenglicol (PEG) o poli(óxido de alquileo) (POA), los residuos de aminoácidos que pueden funcionar como grupo de unión pueden seleccionarse del grupo que consiste en cisteína, lisina (y/o el grupo amino del extremo N del polipéptido), ácido aspártico, ácido glutámico, histidina y arginina. Cuando el resto de no polipéptido es un resto de azúcar, el grupo de unión es un sitio de N- u O-glucosilación *in vivo* o *in vitro*, preferentemente un sitio de N-glucosilación.

25 En algunos casos, en la parte del polipéptido CTLA-4 mutante de un conjugado de la invención, grupos de unión localizados en o próximos a los sitios de unión a receptor se eliminan, tal como por sustitución del residuo de aminoácido que comprende tal grupo. En algunos casos, los residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de unión con un resto de no polipéptido, tal como cisteína o lisina, no son frecuentemente introducidos en o próximos al sitio de unión a receptor del polipéptido CTLA-4 mutante.

30 Un polipéptido CTLA-4 mutante de la invención puede modificarse, de manera que proteja y así modifique o destruya o de otro modo inactive un epítope presente en el polipéptido CTLA-4 mutante, por conjugación con un resto de no polipéptido. Epítopes de polipéptidos CTLA-4 mutantes pueden identificarse por uso de procedimientos conocidos en la técnica, también conocidos como mapeo de epítopes, véase, por ejemplo, Romagnoli y col., J. Biol. Chem. 380(5):553-9 (1999), DeLisser HM, Methods Mol Biol, 1999, 96:11-20, Van de Water y col., Clin. Immunol. Immunopathol. 85(3):229-35 (1997), Saint-Remy JM, Toxicology 119(1):77-81 (1997).

El número exacto de grupos de unión disponibles para la conjugación y presentes en el polipéptido CTLA-4 mutante depende del efecto que se desea conseguir por la conjugación. El efecto a obtener depende, por ejemplo, de la naturaleza y el grado de conjugación (por ejemplo, la identidad del resto de no polipéptido, el número de restos de no polipéptido deseables o posibles para conjugarse con el polipéptido, cuándo deben conjugarse o cuándo debe evitarse la conjugación, etc.). Por ejemplo, si se desea inmunogenicidad reducida, el número (y localización) de grupos de unión debería ser suficiente para proteger la mayoría o todos los epítopes. Esto se obtiene normalmente cuando se protege una mayor proporción del polipéptido CTLA-4 mutante. La protección eficaz de epítopes se alcanza normalmente cuando el número total de grupos de unión disponibles para la conjugación está en el intervalo de 1-6 grupos de unión, por ejemplo, 1-5, tal como en el intervalo de 1-3, tal como 1, 2 ó 3 grupos de unión.

40 La semivida *in vivo* funcional puede depender del peso molecular del conjugado y, por tanto, el número de grupos de unión necesarios para proporcionar el aumento de la semivida depende del peso molecular del resto de no polipéptido en cuestión. Algunos de tales conjugados comprenden 1-6, por ejemplo, 1-5, tal como 1-3, por ejemplo, 1, 2 ó 3 restos de no polipéptido, teniendo cada uno un peso molecular de aproximadamente 100-2000 Daltons (Da), tal como aproximadamente 200 Da, aproximadamente 300 Da, aproximadamente 400 Da, aproximadamente 600
 45 Da, aproximadamente 900 Da, aproximadamente 1000 Da, o aproximadamente 2-40 kDa, tal como aproximadamente 2 kDa, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 30 kDa, aproximadamente 40 kDa o aproximadamente 60 kDa.

En el conjugado de la invención, algunos, la mayoría o sustancialmente todos los grupos de unión conjugables son ocupados por el resto de no polipéptido relevante.

50 El conjugado de la invención puede presentar una o más de las siguientes propiedades mejoradas: (a) aumento de la semivida en suero y/o semivida *in vivo* funcional, (b) antigenicidad o inmunogenicidad reducida, (c) aumento de la estabilidad durante el almacenamiento, (d) aumento de la biodisponibilidad, (e) disminución de la función efectora, o (f) disminución o inhibición de la auto-asociación (por ejemplo, disminución de la formación de agregados) entre dos o más moléculas de la invención. Por ejemplo, el conjugado puede presentar una inmunogenicidad reducida con respecto a hCTLA-4 o con respecto al polipéptido no conjugado correspondiente, por ejemplo, una reducción de al menos el 10%, tal como una reducción de al menos el 25%, tal como una reducción de al menos el 50%, por ejemplo, una reducción de al menos el 75% en comparación con el polipéptido no conjugado o en comparación con un hCTLA-4. El conjugado puede presentar un aumento de la semivida *in vivo* funcional y/o aumento de la semivida en suero con respecto a una molécula de referencia tal como hCTLA-4 o con respecto al polipéptido no conjugado correspondiente. Conjugados preferidos particulares son tales conjugados en los que la relación entre la semivida *in*
 60

vivo funcional (o semivida en suero) de dicho conjugado y la semivida *in vivo* funcional (o semivida en suero) de dicha molécula de referencia es al menos 1,25, tal como al menos 1,50, tal como al menos 1,75, tal como al menos 2, tal como al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7, tal como al menos 8. La semivida se determina convenientemente en un animal experimental, tal como rata o mono, y puede basarse en administración intravenosa o subcutánea. En otro aspecto, el conjugado puede presentar un aumento de la biodisponibilidad con respecto a una molécula de referencia tal como un hCTLA-4 o un péptido no conjugado correspondiente.

La molécula de polímero que va a acoplarse con el polipéptido puede ser cualquier molécula de polímero adecuada, tal como un homopolímero o heteropolímero natural o sintético, normalmente con un peso molecular en el intervalo de 300-100.000 Da, tal como 300-20.000 Da, más preferible en el intervalo de 500-10.000 Da, incluso más preferentemente en el intervalo de 500-5000 Da.

Ejemplos de homopolímeros incluyen un poliol (es decir, poli-OH), una poliamina (es decir, poli-NH₂) y un ácido policarboxílico (es decir, poli-COOH). Un heteropolímero es un polímero que comprende uno o más grupos de acoplamiento diferentes tales como, por ejemplo, un grupo hidroxilo y un grupo amina. Ejemplos de moléculas de polímero adecuadas incluyen moléculas de polímero seleccionadas del grupo que consiste en poli(óxido de alquileo) (PAO), que incluye polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, poli(alcohol vinílico) (PVA), poli-carboxilato, poli-(vinilpirrolidona), polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido málico, dextrano que incluye carboximetildextrano, o cualquier otro biopolímero adecuado para reducir la inmunogenicidad y/o aumentar la semivida *in vivo* funcional y/o semivida en suero. Otro ejemplo de una molécula de polímero es albúmina humana u otra proteína plasmática abundante. Generalmente, los polímeros derivados de polialquilenglicol son biocompatibles, no tóxicos, no antigénicos, no inmunogénicos, tienen diversas propiedades de solubilidad en agua y son fácilmente eliminados de organismos vivos.

El PEG es la molécula de polímero preferida para ser usada ya que sólo tiene pocos grupos reactivos que pueden reticularse en comparación con, por ejemplo, polisacáridos tales como dextrano y similares. En particular, el PEG monofuncional, por ejemplo, monometoxipolietilenglicol (mPEG), es de interés ya que su química de acoplamiento es relativamente simple (sólo un grupo reactivo está disponible para conjugarse con grupos de unión en el polipéptido). Por consiguiente, se elimina el riesgo de reticulación, los conjugados de polipéptido resultantes son más homogéneos y la reacción de las moléculas de polímero con el polipéptido es más fácil de controlar. Cuando la molécula está PEGilada, normalmente comprende 1, 2, 3, 4 ó 5 moléculas de polietilenglicol (PEG). Cada molécula de PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 5 kDa (kilodalton) a 100 kDa que incluye, por ejemplo, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 40 kDa. Moléculas de PEG adecuadas están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. y Enzon, Inc. y pueden seleccionarse de SS-PEG, NPC-PEG, aldehído-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC, SC-PEG, mPEG tresilado (documento US 5.880.255), u oxicarbonil-oxi-N-dicarboxiimida-PEG (documento US 5.122.614).

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado aislado o sintético que comprende: (a) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante, CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante multimérico, CTLA-4-Ig mutante multimérica); y (b) al menos un resto de no polipéptido tal como, por ejemplo, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1, 2 ó 3 restos de no polipéptido unidos al polipéptido, en el que el conjugado se une a CD80 (por ejemplo, hCD80) y/o CD86 (por ejemplo, hCD86) y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos (incluyendo hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T). Polipéptidos a modo de ejemplo incluyen aquellos que tiene al menos el 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-79, 197-200, 205-214 y 219-222. En algunos casos, el conjugado comprende un resto de no polipéptido. En algunos casos, el conjugado comprende dos, tres, cuatro o más restos de no polipéptido. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos del polipéptido del conjugado comprende además una o más sustituciones que introducen cada una un grupo de unión para el resto de no polipéptido (por ejemplo, por sustitución de un residuo de aminoácido de la secuencia de polipéptidos con un residuo diferente que comprende un grupo de unión para el resto de no polipéptido, o por inserción en la secuencia de polipéptidos de un residuo de aminoácido adicional que comprende un grupo de unión para el resto de no polipéptido).

Un conjugado puede comprender dos o más polipéptidos de la invención. En algunos casos, un resto de no polipéptido está covalentemente unido a cualquiera de ellos o ambos de tales polipéptidos. Si el conjugado comprende dos o más polipéptidos idénticos de la invención, el mismo tipo y número de restos de no polipéptido están normalmente unidos a cada uno de tal polipéptido, normalmente del mismo modo al (a los) grupo(s) de unión correspondiente(s) en cada polipéptido. Como se observa anteriormente, el resto de no polipéptido puede comprender, por ejemplo, una molécula de azúcar, que opcionalmente puede unirse a un sitio de N-glucosilación, o un polímero tal como, por ejemplo, un resto de polietilenglicol. El resto de polietilenglicol puede unirse covalentemente a un residuo de cisteína o residuo de lisina del polipéptido de la invención. En algunos casos, el resto de polietilenglicol está covalentemente unido al grupo amino del extremo N del polipéptido. Un conjugado que comprende un CTLA-4-Ig mutante de la invención puede describirse como un conjugado de CTLA-4-Ig mutante de la invención. También están incluidos multímeros de conjugados. Los conjugados multiméricos incluyen dos o más

conjugados, en los que al menos un conjugado es un conjugado de la invención que comprende al menos un polipéptido de la invención. Los conjugados en un conjugado multimérico pueden ser, pero no necesitan ser, idénticos entre sí.

5 Como se ha tratado anteriormente, los polipéptidos de la invención, que incluyen proteínas de fusión de la invención, pueden someterse comúnmente a glucosilación. Los polipéptidos y proteínas de fusión de la invención pueden someterse adicionalmente a (o modificarse de forma que se sometan a) otras formas de modificación post-traduccionales que incluyen, por ejemplo, hidroxilación, unión a lípido o derivado de lípido, metilación, miristilación, pegilación, fosforilación y sulfatación. Otras modificaciones post-traduccionales que pueden hallarse en un polipéptido o proteína de fusión de la invención incluyen incluir acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formilación, formación de anclajes GPI, yodación, oxidación, procesamiento proteolítico, prenilación, racemización, selenilación, arginilación y ubiquitinación. Otras modificaciones de proteínas comunes se describen en, por ejemplo, Creighton, arriba, Seifter y col., Meth. Enzymol. 18:626-646 (1990), y Rattan y col., Ann. NY Acad. Sci. 663:48-62 (1992). Las modificaciones post-traduccionales para polipéptidos o proteínas de fusión expresados a partir de ácidos nucleicos en células huésped varían dependiendo de qué tipo de huésped o en qué tipo de célula huésped se expresa el péptido. Por ejemplo, la glucosilación no se produce frecuentemente en huéspedes bacterianos tales como *E. coli* y varía considerablemente en sistemas de baculovirus con respecto a sistemas de células de mamífero. Por consiguiente, cuando se desea la glucosilación (que normalmente es el caso para la mayoría de los polipéptidos de la presente invención), un polipéptido o proteína de fusión debería expresarse (producirse) en un huésped glucosilante, generalmente una célula eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero o una célula de insecto). Las modificaciones al polipéptido o proteína de fusión en términos de modificación post-traduccionales pueden verificarse por cualquier técnica adecuada que incluye, por ejemplo, difracción de rayos X, obtención de imágenes por RMN, espectrometría de masas y/o cromatografía (por ejemplo, cromatografía de fase inversa, cromatografía de afinidad, o GLC).

El polipéptido o proteína de fusión también puede comprender o alternativamente puede comprender cualquier número adecuado de aminoácidos que no se producen naturalmente (por ejemplo, β -aminoácidos) y/o aminoácidos alternativos (por ejemplo, selenocisteína) o análogos de aminoácidos tales como aquellos enumerados en MANUAL OF PATENT EXAMINING PROCEDURE § 2422 (7ª revisión - 2000), que puede incorporarse por síntesis de proteínas, tales como mediante síntesis de proteínas en fase sólida (como se describe en, por ejemplo, Merrifield, Adv. Enzymol. 32:221-296 (1969) y otras referencias citadas en el presente documento). Un polipéptido o proteína de fusión de la invención puede modificarse adicionalmente por la inclusión de al menos un aminoácido modificado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, (a) aumentar la semivida en suero del polipéptido o proteína de fusión, (b) reducir la antigenicidad del polipéptido o proteína de fusión, o (c) aumentar la estabilidad durante el almacenamiento del polipéptido o proteína de fusión. El (Los) aminoácido(s) se modifica(n), por ejemplo, co-traduccionalmente o post-traduccionalmente durante la producción recombinante (por ejemplo, sitio de glucosilación ligado a N en los motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifica(n) por medios sintéticos. Ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glucosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranylgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado y similares. Toda la bibliografía está repleta de referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos. Se encuentran protocolos de ejemplo en Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, Towata, NJ. El aminoácido modificado puede seleccionarse de un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotilado, un aminoácido conjugado con un resto de lípido y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.

La invención proporciona además polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) que tiene las características anteriormente descritas que comprenden además secuencias de aminoácidos adicionales que afectan la función biológica (por ejemplo, inmunogenicidad, elección de diana y/o semivida) del polipéptido (o proteína de fusión).

50 Un polipéptido o proteína de fusión de la invención puede incluir adicionalmente una secuencia de elección de diana distinta de, o además de, una secuencia señal. Por ejemplo, el polipéptido o proteína de fusión puede comprender una secuencia que elige como diana un receptor sobre un tipo de célula particular (por ejemplo, un monocito, célula dendrítica o célula asociada) para proporcionar administración elegida como diana del polipéptido a tales células y/o tejidos relacionados. Secuencias señal se describen anteriormente, e incluyen secuencias de localización en / anclaje a membrana (por ejemplo, secuencias de transferencia de la terminación, secuencias de anclaje GPI) y similares.

Un componente de fusión particularmente útil para un polipéptido de la invención (incluyendo una proteína de fusión de la invención) es una secuencia de péptidos que facilita la purificación del polipéptido, por ejemplo, una subsecuencia de purificación de polipéptidos. Un polinucleótido de la invención puede comprender una secuencia codificante fusionada en marco con una secuencia de aminoácidos de marcador que, por ejemplo, facilita la purificación del polipéptido codificado. Tales dominios de péptido que facilitan la purificación o subsecuencias de purificación de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metales tales como módulos de

5 histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados tales como un péptido de hexa-histidina u otra secuencia de polihistidina, una secuencia que codifica una marca tal se incorpora en el vector pQE disponible de QIAGEN, Inc. (Chatsworth, California), una secuencia que se une a glutatión (por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST)), una marca de hemaglutinina (HA) (correspondiente a un epítoto derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe; Wilson y col., Cell 37:767 (1984)), secuencias de proteína de unión a maltosa, el epítoto FLAG utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle, WA) (epítotos FLAG comercialmente disponibles también están disponibles de Kodak (New Haven, Connecticut)), una marca de epítoto E (marca de E), tiorredoxina (TRX), avidina y similares. Las marcas de epítotos que facilitan la purificación se han descrito en la materia (véase, por ejemplo, Whitehorn y col., Biotechnology 13:1215-19 (1995)). Un polipéptido puede incluir una marca de e-his que puede comprender una secuencia de polihistidina y una secuencia anti-e-epítoto (catálogo de Pharmacia Biotech); marcas de e-his pueden prepararse por técnicas convencionales. La inclusión de una secuencia de ligador de polipéptido escindible por proteasa entre el dominio de purificación y el polipéptido es útil para facilitar la purificación. Los residuos de histidina facilitan la purificación sobre IMIAC (cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado (IMIAC)), como se describe en Porath y col. Protein Expression and Purification 3:263-281 (1992)), mientras que el sitio de escisión de enterocinasas proporciona un procedimiento para separar el polipéptido de la proteína de fusión. Los vectores pGEX (Promega; Madison, WI) también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción a perlas de ligando-agarosa (por ejemplo, glutatión-agarosa en el caso de fusión de GST) seguido de elución en presencia de ligando libre. Ejemplos adicionales de subsecuencias que facilitan la purificación de polipéptidos y el uso de los mismos para la purificación de proteínas se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 00/15823. Después de la expresión del polipéptido de interés y el aislamiento del mismo por tales constituyentes de fusión o de otro modo como se ha descrito anteriormente, las etapas de replegamiento de proteínas pueden usarse, según se desee, en completar la configuración del polipéptido maduro.

Una proteína de fusión de la invención también puede incluir uno o más fragmentos de péptidos o porciones de péptido adicionales que promueven la detección de la proteína de fusión. Por ejemplo, un fragmento o porción de péptido indicador (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), β -galactosidasa, o un dominio detectable de la misma) puede incorporarse en la proteína de fusión. Moléculas marcadoras adicionales que pueden conjugarse con el polipéptido de la invención incluyen radionúclidos, enzimas, fluoróforos, ligandos de molécula pequeña y similares. Tales componentes de fusión promotores de la detección son particularmente útiles en proteínas de fusión usadas en técnicas de diagnóstico tratadas en otra parte en el presente documento.

En otro aspecto, un polipéptido de la invención puede comprender un componente de fusión que promueve la estabilidad del polipéptido, secreción del polipéptido (distinto de por elección de señal como diana), o ambos. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender un dominio de inmunoglobulina (Ig) tal como un polipéptido IgG que comprende una región bisagra de Fc, un dominio CH2 y un dominio CH3, que promueve la estabilidad y/o secreción del polipéptido.

Los fragmentos de péptidos o porciones de péptidos de proteínas de fusión pueden asociarse en cualquier forma adecuada. Los diversos fragmentos o porciones de polipéptidos de la proteína de fusión pueden asociarse covalentemente (por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o disulfuro). Los fragmentos o porciones de polipéptidos pueden fusionarse directamente (por ejemplo, el extremo C de una secuencia antigénica o inmunogénica de la invención puede fusionarse con el extremo N de una secuencia de purificación o secuencia inmunogénica heteróloga). La proteína de fusión puede incluir cualquier número adecuado de enlaces modificados, por ejemplo, isósteros, dentro de o entre las porciones de péptido. Alternativamente o adicionalmente, la proteína de fusión puede incluir un péptido ligador entre uno o más fragmentos o porciones de polipéptidos que incluye una o más secuencias de aminoácidos que no forman parte de las porciones de péptido biológicamente activas. Puede usarse cualquier péptido ligador adecuado. Un ligador tal puede tener cualquier tamaño adecuado. Normalmente, el ligador tiene menos de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos, menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos y/o menos de 10 residuos de aminoácidos. El ligador puede comprender o consistir predominantemente en residuos de aminoácidos neutros. Ligadores adecuados se describen generalmente en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.990.275, 6.010.883, 6.197.946, y la solicitud de patente europea 0 035 384. Si se desea la separación de fragmentos de péptido o porciones de péptido puede usarse un ligador que facilita la separación. Un ejemplo de un ligador tal se describe en la patente de EE.UU. n° 4.719.326. Pueden ser ventajosos ligadores "flexibles", que están normalmente compuestos por combinaciones de residuos de glicina y/o de serina. Ejemplos de tales ligadores se describen en, por ejemplo, McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990), Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988), Glockshuber y col., Biochemistry 29:1362-1367 (1990), y Cheadle y col., Molecular Immunol. 29:21-30 (1992), Bird y col., Science 242:423-26 (1988), y las patentes de EE.UU. n° 5.672.683, 6.165.476 y 6.132.992.

El uso de un ligador también pueden reducir la respuesta inmunitaria no deseada a la proteína de fusión creada por la fusión de los dos fragmentos de péptido o porciones de péptido, que puede producir que un epítoto de MHC I y/o MHC II no previsto esté presente en la proteína de fusión. Además del uso de un ligador, secuencias de epítoto no deseables identificadas o secuencias adyacentes pueden PEGilarse (por ejemplo, por inserción de residuos de lisina para promover la unión de PEG) para proteger epítotos identificados de la exposición. Otras técnicas para reducir la

inmunogenicidad de la proteína de fusión de la invención que pueden usarse en asociación con la administración de la proteína de fusión incluyen las técnicas proporcionadas en la patente de EE.UU. nº 6.093.699.

Preparación de polipéptidos

5 Los procedimientos recombinantes para producir y aislar polipéptidos de la invención (incluyendo proteínas de fusión de la invención) se describen más adelante. Además de la producción recombinante, los polipéptidos pueden producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart y col. (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co, San Francisco; Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc 85:2149-2154). La síntesis de péptidos puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Por ejemplo, las subsecuencias pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos para proporcionar polipéptidos CTLA-4 mutantes o fragmentos funcionales de los mismos. Alternativamente, tales secuencias pueden pedirse de cualquier número de compañías especializadas en la producción de polipéptidos. Lo más comúnmente, los polipéptidos de la invención se producen expresando ácidos nucleicos codificantes y recuperando polipéptidos, por ejemplo, como se describe más adelante.

La invención proporciona procedimientos para producir polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) de la invención. Un procedimiento tal comprende introducir en una población de células cualquier ácido nucleico descrito en el presente documento, que está operativamente ligado a una secuencia reguladora eficaz para producir el polipéptido codificado, cultivar las células en un medio de cultivo para producir el polipéptido y aislar el polipéptido de las células o del medio de cultivo. Se utiliza una cantidad de ácido nucleico suficiente para facilitar la captación por las células (transfección) y/o expresión del polipéptido. El medio de cultivo puede ser cualquiera descrito en el presente documento y en los ejemplos. Medios adicionales son conocidos para aquellos expertos en la materia. El ácido nucleico se introduce en tales células por cualquier procedimiento de administración descrito en el presente documento que incluye, por ejemplo, inyección, dispositivo de inyección sin aguja, pistola de genes, electroporación (por ejemplo, dispositivo de electroporación de ADN, Inovio Biomedical Corp. (San Diego)), administración transdérmica, captación pasiva, etc. El ácido nucleico de la invención puede ser parte de un vector, tal como un vector de expresión recombinante, que incluye un vector de plásmido de ADN, vector vírico o cualquier vector descrito en el presente documento. El ácido nucleico o vector que comprende un ácido nucleico de la invención puede prepararse y formularse como se describe en el presente documento; anteriormente, y en los ejemplos más adelante. Un ácido nucleico o vector de expresión tal puede introducirse en una población de células de un mamífero *in vivo*, o células seleccionadas del mamífero (por ejemplo, células tumorales) pueden eliminarse del mamífero y el vector de expresión del ácido nucleico introducirse *ex vivo* en la población de tales células en una cantidad suficiente de forma que resulte la captación y expresión del polipéptido codificado. O, un ácido nucleico o vector que comprende un ácido nucleico de la invención se produce usando células cultivadas *in vitro*. En un aspecto, el procedimiento de producir un polipéptido de la invención comprende introducir en una población de células un vector de expresión recombinante que comprende cualquier ácido nucleico descrito en el presente documento en una cantidad y fórmula de forma que resulte la captación del vector y expresión del polipéptido; administrar el vector de expresión a un mamífero por cualquier formato de introducción/administración descrito en el presente documento; y aislar el polipéptido del mamífero o de un subproducto del mamífero. Células huésped adecuadas, vectores de expresión, procedimientos para transfectar células huésped con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la invención, cultivos celulares y procedimientos para producir y recuperar tal polipéptido de un cultivo celular se describen en detalle más adelante en la sección titulada "Ácidos nucleicos de la invención". Procedimientos de producción adicionales se tratan en los ejemplos, más adelante.

45 Como se observa anteriormente, los polipéptidos de la invención (que incluyen proteínas de fusión de la invención) pueden someterse a diversos cambios, tales como una o más inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos o ácidos nucleicos, tanto conservativas como no conservativas, que incluyen en las que, por ejemplo, tales cambios podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso, por ejemplo, en su uso terapéutico o profiláctico o aplicación de administración o diagnóstico. Procedimientos para preparar variantes de polipéptidos usando sustituciones, deleciones, inserciones y adiciones de aminoácidos son rutina en la materia. Polipéptidos y variantes de los mismos que tienen la capacidad deseada para unirse a CD80 y/o CD86, o un fragmento de los mismos (por ejemplo, ECD), o una capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria *in vitro* o *in vivo* como se describe en detalle en otra parte en el presente documento, se identifican fácilmente por ensayos conocidos para aquellos expertos en la materia y por los ensayos descritos en el presente documento. Véanse, por ejemplo, los ensayos presentados en los ejemplos más adelante.

Los ácidos nucleicos de la invención, tratados en mayor detalle más adelante, también pueden someterse a diversos cambios tales como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones de forma que un codón particular codifique el mismo aminoácido o uno diferente, produciendo tanto una sustitución conservativa como no conservativa, o una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos en la secuencia. Los ácidos nucleicos también pueden modificarse para incluir uno o más codones que proporcionan expresión óptima en un sistema de expresión (por ejemplo, célula de mamífero o sistema de expresión de mamífero), mientras que, si se desea, dicho uno o más codones todavía codifican el mismo (los mismos) aminoácido(s). Procedimientos para preparar variantes

de ácidos nucleicos usando sustituciones, deleciones, inserciones y adiciones de ácidos nucleicos, y codones degenerados, son rutina en la materia, y variantes de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos que tienen las propiedades deseadas descritas en el presente documento (por ejemplo, una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86, y/o suprimir una respuesta inmunitaria *in vitro* o *in vivo*) son fácilmente identificados usando los ensayos descritos en el presente documento. Tales cambios de ácidos nucleicos podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso terapéutico o profiláctico o aplicación de administración o diagnóstico. En un aspecto, los ácidos nucleicos y polipéptidos pueden modificarse en varias formas mientras que comprendan una secuencia de ácidos nucleicos o de polipéptidos sustancialmente idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de un ácido nucleico que codifica el polipéptido CTLA-4 mutante respectivo o el polipéptido CTLA-4 mutante de la invención, respectivamente.

10 Ácidos nucleicos

La divulgación proporciona ácidos nucleicos aislados o recombinantes (también denominados en el presente documento polinucleótidos), denominados conjuntamente "ácidos nucleicos de la divulgación" (o "polinucleótidos de la divulgación"), que codifican polipéptidos de la divulgación. Los ácidos nucleicos de la divulgación, que incluyen todos los descritos más adelante, son útiles en la producción recombinante (por ejemplo, expresión) de polipéptidos de la divulgación, normalmente mediante expresión de un vector de expresión de plásmidos que comprende una secuencia que codifica el polipéptido o fragmento del mismo; como agentes terapéuticos; como profilácticos; como herramientas de diagnóstico; como sondas de diagnóstico para la presencia de ácidos nucleicos complementarios o parcialmente complementarios (incluyendo para la detección de un ácido nucleico de CTLA-4 natural). Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la divulgación, que incluyen todos descritos más adelante, son útiles debido a que codifican polipéptidos que son útiles en suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de anticuerpos anti-colágeno y/o respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T) en aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo* que incluyen, por ejemplo, procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos y afecciones del sistema inmunitario en los que se desea la supresión de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, procedimientos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios y procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula u órgano de un donante por un receptor). Los ácidos nucleicos de la divulgación también pueden incorporarse en vectores de expresión útiles para terapia génica, vacunación de ADN y terapia inmunosupresora. Usos adicionales de los ácidos nucleicos y vectores de la divulgación que comprenden tales ácidos nucleicos se describen en otra parte en el presente documento.

En un aspecto, en el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier polipéptido (incluyendo cualquier proteína de fusión, etc.) de la divulgación descrito anteriormente en la sección titulada "Polipéptidos de la divulgación" y en otra parte en el presente documento. La divulgación también proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una combinación de dos o más de cualquier polipéptido (incluyendo cualquier proteína de fusión) descrito anteriormente y en otra parte en el presente documento. También se incluye un ácido nucleico que codifica cualquier polipéptido de la divulgación tal como, por ejemplo, un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante que comprende una secuencia de codones sustancialmente optimizada para la expresión en un huésped de mamífero, tal como un ser humano.

Por ejemplo, en el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo, en el que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 o un fragmento de polipéptido de CD80 y/o CD86 (por ejemplo, un dominio extracelular de CD80 y/o CD86), y/o suprimen una respuesta inmunitaria *in vitro* y/o *in vivo*, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. Detalles adicionales referentes a las propiedades y características funcionales de tales polipéptidos se tratan anteriormente en "Polipéptidos de la divulgación". Algunos de tales ácidos nucleicos codifican un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aminoácidos aproximadamente igual a la longitud de aminoácidos del ECD de hCTLA-4; como, por ejemplo, 110-138, 112-132, 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126, 123-125 ó 124 residuos de aminoácidos. Ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican los polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante comprenden las secuencias expuestas en SEC ID N°: 1-73, pero no se limitan a, por ejemplo, los ácidos nucleicos que tienen las secuencias de nucleótidos expuestas en SEC ID N°: 80-152, respectivamente. Por ejemplo, un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica el polipéptido mostrado en SEC ID N°: 1 (el clon D3-1) es el ácido nucleico mostrado en SEC ID:80. También se incluyen fragmentos de cualquiera de tales ácidos nucleicos, en los que tal fragmento codifica un polipéptido que se une a CD80 y/o CD86 y/o un ECD de cualquiera de ellos o ambos, y/o tiene una capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos (a) que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 en no más de 6 residuos de aminoácidos (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6

residuos de aminoácidos), y (b) en el que el residuo de aminoácido en la secuencia de polipéptidos en la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 u 85 es idéntico al residuo de aminoácido en la posición correspondiente de dichas secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en el que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos, y/o inhibe una respuesta inmunitaria *in vitro* y/o *in vivo*, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. Es decir, el residuo de aminoácido en tal posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 u 85 en tal secuencia de polipéptidos seleccionada no está deletado o sustituido. Algunos de tales ácidos nucleicos codifican polipéptidos que comprenden una secuencia que se diferencia de la secuencia de polipéptidos seleccionada en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos de aminoácidos en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y/o 14 posiciones seleccionadas de las posiciones de aminoácido 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticas a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en la secuencia de polipéptidos seleccionada. Tales polipéptidos pueden diferenciarse de la secuencia de polipéptidos seleccionada por delección (delecciones) de aminoácidos, adición (adiciones) y/o sustitución (sustituciones) de aminoácidos. Una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución conservativa o no conservativa. Sustituciones conservativas a modo de ejemplo se tratan en la sección titulada "Variación de secuencias". Algunos de tales polipéptidos comprenden una secuencia que tiene una longitud de aproximadamente 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126, 123-125 ó 124 residuos de aminoácidos. Detalles adicionales de las propiedades y características funcionales de tales polipéptidos se tratan anteriormente. Ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, aquellos que comprenden las secuencias de nucleótidos expuestas en SEC ID N°: 80-152.

En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que comprende (i) al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con cualquier secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 y (ii) un residuo de fenilalanina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 70 de dichas secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en el que el polipéptido se une a hCD80 y/o hCD86 o un ECD del mismo y/o inhibe una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. Algunos de tales ácidos nucleicos codifican polipéptidos que comprenden uno o más de los siguientes con respecto a la secuencia seleccionada: un residuo de ácido glutámico en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 24; un residuo de asparagina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 30; un residuo de isoleucina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 32; un residuo de metionina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 50; un residuo de lisina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 54; un residuo de ácido glutámico en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 55; un residuo de ácido aspártico en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 56; un residuo de prolina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 64; un residuo de serina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 65; y un residuo de ácido glutámico en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 104. Algunos de tales ácidos nucleicos codifican polipéptidos que comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aproximadamente 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126, 123-125 ó 124 residuos de aminoácidos. Detalles adicionales de las propiedades y características funcionales de tales polipéptidos se tratan anteriormente.

En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica cualquier multímero de cualquier polipéptido descrito anteriormente (por ejemplo, dímero, tetrámero, etc.). Como se ha tratado en mayor detalle en otra parte, un dímero que comprende dos polipéptidos de la divulgación (incluyendo dos proteínas de fusión) se forma normalmente durante el procesamiento celular por la generación de uno o más enlaces disulfuro covalentes entre residuo(s) de cisteína en un polipéptido y residuo(s) de cisteína en el segundo polipéptido. Similarmente pueden formarse otros multímeros. Por ejemplo, en el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de polipéptidos recombinantes que comprende dos polipéptidos, en el que cada polipéptido tal comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en el que el dímero se une a hCD80 y/o hCD86 y/o inhibe una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos.

En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica cualquier proteína de fusión de la invención, que incluye cualquier proteína de fusión multimérica de la divulgación (por ejemplo, dímeros, tetrámeros, etc.). En el presente documento también se desvela ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, y (b) un polipéptido de Ig, en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. El polipéptido de Ig puede comprender un polipéptido del Fc de Ig que incluye, por ejemplo, un polipéptido del Fc de Ig que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184-186 y 218. Una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión monoméricas tales se forma normalmente durante el

procesamiento celular por la generación de enlaces disulfuro covalentes entre residuos de cisteína en una proteína de fusión monomérica y residuos de cisteína en la segunda proteína de fusión monomérica. Similarmente pueden formarse otros multímeros. Detalles adicionales de las propiedades y características funcionales de tales proteínas de fusión se tratan anteriormente.

5 En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de proteínas (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante monomérica), comprendiendo cada proteína de fusión monomérica: (a) un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una
 10 secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o el 100% de identidad con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, y (b) un polipéptido de Ig, en el que el dímero de proteínas de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. Las dos proteínas de fusión monoméricas, tras la expresión, se ligan
 15 juntas mediante al menos un enlace disulfuro formado entre los dos residuos de cisteína presentes en cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante monomérica. El polipéptido de Ig puede comprender un polipéptido del Fc de Ig que incluye, por ejemplo, un polipéptido del Fc de Ig que comprende una secuencia que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184-186 y 218. En algunos casos, el extremo C del polipéptido de (a) está covalentemente ligado o fusionado con el
 20 extremo N del polipéptido del Fc de Ig de (b). Detalles adicionales de las propiedades y características funcionales de tales dímeros se tratan anteriormente.

Un codón de terminación (por ejemplo, tga) está normalmente incluido en el extremo C de cada secuencia de ácidos nucleicos cuando la secuencia se incluye en un vector de expresión para la expresión de una proteína de interés. Por ejemplo, cada una de las secuencias de nucleótidos de la invención que codifica un polipéptido CTLA-4 mutante
 25 o proteína de fusión CTLA-4 mutante puede incluir opcionalmente adicionalmente un codón de terminación en el extremo C tal como TAA. Un codón de terminación diferente puede estar sustituido con TAA, tal como un codón de terminación TGA. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión natural (por ejemplo, hCTLA-4-Ig, hCD86-Ig, etc.) también puede incluir un codón de terminación en su extremo C. Cada una de las secuencias de nucleótidos puede incluir opcionalmente adicionalmente en el extremo N una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal para facilitar la secreción de un polipéptido CTLA-4 mutante o proteína de
 30 fusión.

Dímeros de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo incluyen aquellos que comprenden las secuencias de polipéptidos mostradas en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222. Ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican las proteínas de fusión CTLA-4 Ig mutantes de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222 se exponen en SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224, respectivamente. Las secuencias de la proteína de fusión de
 35 SEC ID N°: 205-210, 211-214, 219 y 221 son idénticas a las secuencias de proteína de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222, respectivamente, excepto que las secuencias de proteínas de SEC ID N°: 205-210 no incluyen el residuo de lisina (K) del extremo C; como se ha explicado anteriormente, se cree que el residuo de lisina previsto del extremo C, que está codificado por el codón AAA inmediatamente precedente al codón de terminación TAA de cada secuencia de polinucleótidos tal, se escinde de la proteína de fusión resultante durante el procesamiento o
 40 secreción. Las secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224 codifican las secuencias de proteínas de fusión de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222, respectivamente, cada una de las cuales produce después de la escisión/pérdida del residuo K del extremo C las secuencias de la proteína de fusión mostradas en SEC ID N°: 205-210, 211-214, 219 y 221, respectivamente.

Cada una de las secuencias de polinucleótidos SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224 también incluyen en su
 45 extremo N una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal mostrado en SEC ID N°: 181 ó 215, péptido señal que se escinde en último lugar para formar la proteína de fusión madura. Los residuos de nucleótidos 1-111 de cada una de las secuencias de polinucleótidos de SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224, como se cuentan desde el extremo N de cada secuencia de polinucleótidos tal (los residuos de nucleótidos 1-111 se exponen en SEC ID N°: 215), codifican el péptido señal de hCTLA-4 WT de 37 residuos de aminoácidos mostrado en SEC ID N°: 216,
 50 péptido señal que se escinde en último lugar tras la expresión del monómero o dímero de proteínas de fusión de CTLA-4 mutante maduro; por tanto, para cada una de las secuencias de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224, el primer codón que codifica el primer residuo de aminoácido (metionina) de la proteína de fusión de IgG2 madura está compuesto por los residuos de nucleótidos 112-114 de dichas secuencias de nucleótidos. Como se observa anteriormente, en algunos casos, la secuencia de péptidos señal puede comprender
 55 sólo los residuos de aminoácidos 1-35 como se muestra en SEC ID N°: 182 y la secuencia de nucleótidos que codifica este péptido señal de 35 residuos de aminoácido se muestra en SEC ID N°: 181. Sin embargo, los residuos de lisina (K) y alanina (A) codificados en las posiciones 36 y 37, respectivamente (codificados por los dos codones AAA-GCC), no están presentes en la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante madura resultante y se cree que se escinden de la proteína de fusión madura CTLA-4-Ig mutante durante el procesamiento. La secuencia de proteínas CTLA-4 mutantes maduras normalmente empieza con el residuo de metionina presente en la posición del residuo de
 60 aminoácido 38 de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante codificada.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de proteínas de fusión (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante monomérica), en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en el que el dímero de proteínas de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. También se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica tal proteína de fusión monomérica que se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria. Dímeros a modo de ejemplo de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante incluyen aquellos que comprenden secuencias de polipéptidos mostradas en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222; ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican tales proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes, que se expresan como dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes, incluyen aquellas que comprenden secuencias de polinucleótidos mostradas en SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224, respectivamente. Dímeros de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo adicionales comprenden las secuencias de polipéptidos de SEC ID N°: 205-210, 211-214, 219 y 222, que se expresan como dímeros de proteínas de fusión; estas proteínas de fusión carecen del residuo de lisina del extremo C debido a que normalmente se escinde durante el procesamiento o antes de la secreción. Ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican estas secuencias de proteína de fusión con la lisina del extremo C (la lisina se escinde posteriormente) incluyen las secuencias de polinucleótidos de SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224, respectivamente.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de fusión, en el que dicha proteína de fusión comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222, en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 153-158, 201-204 y 223-224, en el que tal ácido nucleico codifica un dímero de proteínas CTLA-4-Ig mutantes que se une a CD80 y/o CD86 (y/o a CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de proteínas de fusión (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante monomérica), en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende: (1) un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 en no más de 6 residuos de aminoácidos, y en el que el residuo de aminoácido en la secuencia de polipéptidos en la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 u 85 es idéntico al residuo de aminoácido en la posición correspondiente de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, un polipéptido seleccionado de SEC ID N°: 1-73), y (2) un polipéptido del Fc de Ig, en el que el dímero se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. Detalles adicionales de las propiedades y características funcionales de tales dímeros se tratan anteriormente. También se desvela un ácido nucleico recombinante o aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión monomérica tal que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de proteínas de fusión (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, dos CTLA-4-Ig mutantes monoméricas), en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende: (1) un polipéptido del dominio extracelular de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que (a) se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 en no más de 6 residuos de aminoácidos, y (b) comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70 u 85 con respecto a la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 159; y (2) un polipéptido de Ig, en el que el dímero de proteínas de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. Detalles adicionales de las propiedades y características funcionales de tales dímeros se tratan anteriormente. El polipéptido de Ig puede comprender un polipéptido del Fc de Ig que incluye, por ejemplo, un polipéptido del Fc de Ig que comprende una secuencia que tiene al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184-186 y 218. Algunos de tales polipéptidos de (a) comprenden al menos una sustitución en una posición de aminoácido con respecto a SEC ID N°: 159 seleccionada del grupo que consiste en A50M, M54K, G55E, N56D, S64P, I65S y S70F. Algunos de tales polipéptidos de (a) comprenden además una sustitución de aminoácidos con respecto a SEC ID N°: 159 en la posición 104 (por ejemplo, L104E/D),

posición 30 (por ejemplo, T30N/D/A) y/o posición 32 (por ejemplo, V32I). También se desvela un ácido nucleico recombinante o aislado que codifica tal proteína de fusión monomérica que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria.

5 En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un dímero de proteínas de fusión (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante monomérica), en el que cada proteína de fusión monomérica tal comprende: (1) un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que (i) tiene al menos el 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73 y (ii) incluye un residuo de fenilalanina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 70 de dichas secuencias de polipéptidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73; y (2) un polipéptido de Ig, en el que el dímero de proteínas de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria, o una secuencia de polinucleótidos complementaria de los mismos. El polipéptido de Ig codificado puede comprender un polipéptido del Fc de Ig que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 184-186 y 218. Algunos de tales dímeros codificados comprenden uno o más de los siguientes con respecto a dicha secuencia de polipéptidos seleccionada de (1)(i): un residuo de Glu en una posición correspondiente a la posición 24; una Asn en una posición correspondiente a la posición 30; un residuo de Ile en una posición correspondiente a la posición 32; un residuo de Met en una posición correspondiente a la posición 50; un residuo de Lys en una posición correspondiente a la posición 54; un residuo de Glu en una posición correspondiente a la posición 55; un residuo de Asp en una posición correspondiente a la posición 56; un residuo de Pro en una posición correspondiente a la posición 64; un residuo de Ser en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 65; y un residuo de Glu en una posición correspondiente a la posición 104. Detalles adicionales de las propiedades y características funcionales de tales dímeros se tratan anteriormente. También se desvela un ácido nucleico recombinante o aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión monomérica tal que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria.

También se desvelan fragmentos de cualquiera de tales ácidos nucleicos de la divulgación descritos anteriormente, en los que tales fragmentos codifican un polipéptido que se une a hCD80 y/o hCD86 y/o un ECD de cualquiera de ellos o ambos, y/o tiene una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria. Muchos fragmentos de estos ácidos nucleicos expresarán polipéptidos que se unen a hCD80 y/o hCD86 o un ECD de los mismos, o suprimen una respuesta inmunitaria, propiedades que pueden identificarse fácilmente con experimentación razonable. Los fragmentos de nucleótidos normalmente comprenden al menos 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 950, 1000 o más bases de nucleótidos.

35 La divulgación incluye un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una proteína que comprende un péptido señal y un polipéptido desvelado en el presente documento (que incluye una proteína de fusión dimerica o monomérica), tal como un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, que se une a CD80 y/o CD86 y/o suprime una respuesta inmunitaria en ensayos y/o procedimientos *in vitro* o *in vivo* como se describen en detalle en otra parte en el presente documento. La secuencia de péptidos señal codificada, que dirige la secreción del polipéptido maduro mediante una membrana de célula procarionota o eucariota, está normalmente ligada covalentemente al extremo amino de dicho polipéptido. Puede usarse una variedad de péptidos señal que incluyen, por ejemplo, la secuencia de péptidos señal expuesta en SEC ID N°: 182, que está codificada por, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 181, o la secuencia de péptidos señal expuesta en SEC ID N°: 216, que está codificada por, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 215. La divulgación también incluyen un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una proteína que comprende un péptido señal, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante, dominio transmembrana y/o dominio citoplásmico como se trata detalle anteriormente.

La secuencia de péptidos señal de la proteína CTLA-4 humana de longitud completa puede usarse para dirigir la expresión o secreción de un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante recombinante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención. En un aspecto, el péptido señal (SP) de la proteína hCTLA-4 comprende los residuos de aminoácidos 1-37 de la proteína hCTLA-4; esta secuencia de péptidos señal se muestra en SEC ID N°: 216. En este caso, la proteína hCTLA-4 madura normalmente empieza con el residuo de metionina en la posición 38, y los residuos de aminoácidos de la proteína hCTLA-4 madura se numeran por consiguiente empezando con este residuo de metionina que se designa el primer aminoácido (es decir, que ocupa la posición 1). Por tanto, un péptido señal que comprende la secuencia de péptidos mostrada en SEC ID N°: 216 puede fusionarse o ligarse con el extremo amino (N) de un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención, tal como por un enlace covalente, de forma que se facilite la expresión o secreción del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, respectivamente. Un ácido nucleico a modo de ejemplo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de péptidos señal de hCTLA-4 de SEC ID N°: 216 se expone en SEC ID N°: 215.

Cuando la secuencia de péptidos señal de SEC ID N°: 216 se fusiona para ligarse al extremo N de un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, tras la expresión o secreción de dicho polipéptido

o proteína de fusión, el péptido señal se escinde; el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante maduro resultante o la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante madura normalmente empieza con el residuo de metionina en la posición 38, y los residuos de aminoácidos del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante maduro o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante madura se numeran por consiguiente empezando con este residuo de metionina que se designa el primer aminoácido (es decir, que ocupa la posición 1).

La divulgación incluye un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEC ID N°: 216) y un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-73), en el que el péptido señal está ligado covalentemente al extremo N del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante. También es divulgación un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEC ID N°: 216) y una CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222), en el que el péptido señal está ligado covalentemente al extremo N de la CTLA-4-Ig mutante. También es divulgación un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, SEC ID N°: 215) que codifica un péptido señal (por ejemplo, SEC ID N°: 216) y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-73) o una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222).

En un aspecto alternativo, el péptido señal de la proteína hCTLA-4 de longitud completa comprende los residuos 1-35 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa; este péptido señal comprende la secuencia de péptidos mostrada en SEC ID N°: 182. Sin embargo, en este caso, los dos residuos de aminoácidos lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 están normalmente ausentes de la proteína hCTLA-4 secretada madura como se ha determinado por secuenciación de proteínas. Por tanto, la proteína hCTLA-4 madura resultante empieza similarmente con el residuo de metionina en la posición 38, y los residuos de aminoácidos de la proteína hCTLA-4 madura son numerados por consiguiente empezando con este residuo de metionina en la posición 38 de la proteína hCTLA-4 que se designa el primer aminoácido de la proteína hCTLA-4 madura. Debido a que los residuos de aminoácidos lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 de longitud completa no están presentes en la proteína hCTLA-4 madura resultante, se cree que han sido escindidos de la proteína hCTLA-4 madura durante el procesamiento. Un ácido nucleico a modo de ejemplo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de péptidos señal de hCTLA-4 (SEC ID N°: 182) se muestra en SEC ID N°: 181.

Un péptido señal que comprende la secuencia de péptidos mostrada en SEC ID N°: 182 puede fusionarse o ligarse con el extremo N de un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención, tal como por un enlace covalente, de forma que se facilite la expresión o secreción del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, respectivamente. Cuando la secuencia de péptidos señal de SEC ID N°: 182 está fusionada o ligada con el extremo N de un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, tras la expresión o secreción del polipéptido o proteína de fusión, el péptido señal se escinde; sin embargo, el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante maduro resultante o la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante madura normalmente empieza con el residuo de metionina en la posición 38, y los residuos de aminoácidos del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante maduro o la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante madura se numeran por consiguiente empezando con este residuo de metionina que se designa el primer aminoácido (es decir, que ocupa la posición 1). Debido a que los residuos de aminoácidos lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 de longitud completa no están presentes en el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante maduro resultante o la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante madura, se cree que han sido escindidos de dicho polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante durante el procesamiento.

La divulgación incluye un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEC ID N°: 182) y un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-73), en el que el péptido señal está ligado covalentemente al extremo N del polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante. También se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEC ID N°: 182) y una CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222), en el que el péptido señal está ligado covalentemente al extremo N de la CTLA-4-Ig mutante. También se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, SEC ID N°: 181) que codifica un péptido señal (por ejemplo, SEC ID N°: 182) y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 1-73) o una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada del grupo de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222).

Un ácido nucleico como se desvela en el presente documento puede comprender además una o más secuencias de nucleótidos adicionales adecuadas. Por ejemplo, dado que un polipéptido de la divulgación (que incluye una proteína de fusión de la invención) puede comprender una o más secuencias de polipéptidos adicionales tales como, por ejemplo, una subsecuencia de purificación de polipéptidos (tal como, por ejemplo, una subsecuencia está seleccionada de una marca de epítipo, una marca FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión GST), secuencia de péptidos señal, etc., la divulgación incluye ácidos nucleicos que codifican todos de tales polipéptidos que comprenden tales secuencias adicionales. Péptidos señal a modo de ejemplo, que tras la expresión están

normalmente ligados covalentemente al extremo N de un polipéptido de la invención, se tratan anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptidos de cualquiera de SEC ID N°: 1-79, 197-200, 205-214 y 219-222 puede comprender además un ácido nucleico que codifica un péptido señal, tal como la secuencia de péptidos señal de SEC ID N°: 182 tal como, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 181, o la secuencia de péptidos señal expuesta en SEC ID N°: 216, que está codificada por, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 215. Tales secuencias de nucleótidos pueden fusionarse directamente juntas, en marco de lectura apropiado, de forma que el ácido nucleico resultante comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

Un ácido nucleico de la invención puede aislarse por cualquier técnica adecuada, de las cuales se conocen varias en la técnica. Un ácido nucleico aislado de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que se prepara en una célula huésped y se purifica posteriormente sustancialmente por cualquier técnica de purificación de ácidos nucleicos adecuada) puede re-introducirse en una célula huésped o re-introducirse en un entorno celular u otro biológico o composición en el que ya no es la especie de ácido nucleico dominante y ya no se separa de otros ácidos nucleicos.

Casi cualquier ácido nucleico aislado o recombinante de la invención puede insertarse en o fusionarse con una molécula de ácido nucleico más grande adecuada (incluyendo por ejemplo, pero no se limita a, un cromosoma, un plásmido, un vector o casete de expresión, un genoma vírico, una secuencia génica, un elemento de expresión lineal, un genoma bacteriano, un genoma de planta o un cromosoma artificial tal como un cromosoma artificial de mamífero (MAC), o los homólogos de levadura y bacterianos del mismo (es decir, un YAC o un BAC) para formar un ácido nucleico recombinante usando técnicas convencionales. Como otro ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención puede fusionarse con secuencias de nucleótidos más pequeñas tales como secuencias promotoras, secuencias inmunoestimulantes y/o secuencias que codifican otros aminoácidos, tales como otros epítopes de antígeno y/o las secuencias de ligador para formar un ácido nucleico recombinante.

En algunos casos, un ácido nucleico recombinante o sintético puede generarse por técnicas de síntesis química aplicadas fuera del contexto de una célula huésped (por ejemplo, un ácido nucleico producido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o técnicas de síntesis química, ejemplos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento).

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) de la invención pueden tener cualquier composición química adecuada que permita la expresión de un polipéptido de la invención u otra actividad biológica deseada (por ejemplo, hibridación con otros ácidos nucleicos). Los polinucleótidos de la invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, e incluyen ARNm, ARNc, ARN y ADN recombinante o sintético, y ADNc. Los ácidos nucleicos de la invención son normalmente moléculas de ADN, y normalmente moléculas de ADN bicatenarias. Sin embargo, también se proporcionan ADN monocatenario, ARN monocatenario, ARN bicatenario y ácidos nucleicos de ADN/ARN híbridos o combinaciones de los mismos que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la invención. Un ácido nucleico de la invención puede incluir cualquier base de nucleótido adecuada, análogo de base y/o esqueleto (por ejemplo, un esqueleto formado por, o que incluye, un enlace fosfotioato, en vez de fosfodiéster, por ejemplo, ADN que comprende un esqueleto de fosfotioato o fosforotioato). Un ácido nucleico de la invención, si es monocatenario, puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (es decir, antisentido o complementaria). Además de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia codificante de un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante), el polinucleótido de la invención puede comprender una o más secuencias de nucleótidos codificantes adicionales de forma que codifiquen, por ejemplo, una proteína de fusión, secuencia que elige diana (distinta de una secuencia señal), o similares (de los cuales más ejemplos particulares se tratan adicionalmente en el presente documento), y/o pueden comprender secuencias de nucleótidos no codificantes tales como intrones, secuencia terminadora o regiones sin traducir de 5' y/o 3', regiones que pueden ser eficaces para la expresión de la secuencia codificante en un huésped adecuado y/o elementos de control tales como un promotor (por ejemplo, promotor que se produce naturalmente o recombinante o redistribuidos).

Modificaciones a un ácido nucleico son particularmente tolerables en la 3ª posición de una secuencia de codones de ARNm que codifica un polipéptido tal. En aspectos particulares, al menos una parte del ácido nucleico comprende un esqueleto de fosfotioato, incorporando al menos un análogo de nucleótidos sintético en lugar de o además de los nucleótidos que se producen naturalmente en la secuencia de ácidos nucleicos. También o alternativamente, el ácido nucleico puede comprender la adición de bases distintas de guanina, adenina, uracilo, timina y citosina. Tales modificaciones pueden asociarse a semivida prolongada y, por tanto, pueden ser deseables en vectores de ácidos nucleicos de la invención. Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos recombinantes y vectores de ácidos nucleicos (tratados adicionalmente más adelante), ácidos nucleicos o vectores que comprenden al menos una de las modificaciones anteriormente mencionadas, o cualquier combinación adecuada de los mismos, en los que el ácido nucleico persiste más tiempo en un huésped de mamífero que un ácido nucleico sustancialmente idéntico sin una modificación o modificaciones tales. Ejemplos de nucleótidos modificados y/o no citosina, no adenina, no guanina, no timina que pueden incorporarse en una secuencia de nucleótidos de la invención se proporcionan en, por ejemplo, MANUAL OF PATENT EXAMINING PROCEDURE § 2422 (7ª revisión - 2000).

Debe entenderse que un ácido nucleico que codifica al menos uno de los polipéptidos de la invención (que incluye una proteína de fusión de la invención), que incluye aquellos descritos anteriormente y en otra parte en el presente

documento, no se limita a una secuencia que codifica directamente la expresión o producción de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que produce un polipéptido de la invención mediante expresión similar a inteína (como se describe en, por ejemplo, Colson y Davis (1994) *Mol. Microbiol.* 12(3):959-63, Duan y col. (1997) *Cell* 89(4):555-64, Perler (1998) *Cell* 92(1):1-4, Evans y col. (1999) *Biopolymers* 51(5):333-42, y de Grey, *Trends Biotechnol.* 18(9):394-99 (2000)), o una secuencia de nucleótidos que comprende intrones de auto corte y empalme (u otros transcritos de ARN auto corte y empalme), que forman una secuencia codificante de polipéptidos recombinantes intermedios (como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.010.884). El ácido nucleico también puede comprender o alternativamente puede comprender secuencias que producen otras modificaciones de corte y empalme al nivel de ARN para producir un transcrito de ARNm que codifica el polipéptido y/o al nivel de ADN a modo de mecanismos de corte y empalme en trans antes de la transcripción (principios relacionados con tales mecanismos se describen en, por ejemplo, Chabot, *Trends Genet.* (1996) 12(11):472-78, Cooper (1997) *Am. J. Hum. Genet.* 61(2):259-66, y Hertel y col. (1997) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9(3):350-57). Debido a la degeneración inherente del código genético, varios ácidos nucleicos pueden codificar cualquier polipéptido particular de la invención. Por tanto, por ejemplo, cualquiera de los ácidos nucleicos particulares descritos en el presente documento puede modificarse por sustitución de uno o más codones con un codón equivalente (con respecto al aminoácido requerido por el codón) basándose en la degeneración del código genético. Otras secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene la misma secuencia o una funcionalmente equivalente como una secuencia de polipéptidos de la invención también pueden usarse para sintetizar, clonar y expresar tal polipéptido.

En general, cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención puede modificarse para aumentar la expresión en un huésped particular usando las técnicas ejemplificadas en el presente documento con respecto a los ácidos nucleicos anteriormente descritos que codifican un polipéptido de la invención (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante). Cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención como se describe en el presente documento puede optimizarse por codones para la expresión en un mamífero particular (normalmente seres humanos). En la técnica se conocen una variedad de técnicas para la optimización de codones. Codones que se utilizan casi siempre en un huésped particular se llaman codones óptimos, y aquellos no utilizados muy frecuentemente se clasifican como codones raros o de bajo uso (véase, por ejemplo, Zhang, S. P. y col. (1991) *Gene* 105:61-72). Los codones pueden estar sustituidos para reflejar el uso de codones preferido del huésped, un procedimiento llamado "optimización de codones" o "control del sesgo de codones por especie". La secuencia codificante que comprende codones preferidos por un huésped procarionta o eucarionta particular puede usarse para aumentar la velocidad de traducción o para producir transcritos de ARN recombinantes que tienen propiedades deseables tales como una semivida más larga en comparación con transcritos producidos a partir de una secuencia optimizada. Se conocen técnicas para producir secuencias optimizadas por codones (véase, por ejemplo, E. y col. (1989) *Nuc. Acids Res.* 17:477-508). Los codones de terminación de la traducción también pueden modificarse para reflejar la preferencia del huésped. Por ejemplo, los codones de terminación preferidos para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA, respectivamente. El codón de terminación preferido para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* prefieren usar UAA como codón de terminación (véase, por ejemplo, Dalphin, M.E. y col. (1996) *Nuc. Acids Res.* 24:216-218). La disposición de codones en contexto con otros codones también puede influir en las propiedades biológicas de secuencias de ácidos nucleicos, y modificaciones de ácidos nucleicos para proporcionar una disposición de contexto de codones comunes para un huésped particular también se contempla por los inventores. Por tanto, una secuencia de ácidos nucleicos de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos optimizada por codones, es decir, optimizada por frecuencia de codones y/u optimizada por emparejamiento de codones (es decir, contexto de codones) para una especie particular (por ejemplo, el polipéptido puede expresarse de una secuencia de polinucleótidos optimizada para la expresión en seres humanos por sustitución de codones humanos "raros" basándose en la frecuencia de codones, o contexto de codones, tal como usando técnicas tales como aquellas descritas en Buckingham y col. (1994) *Biochimie* 76(5):351-54 y las patentes de EE.UU. nº 5.082.767, 5.786.464 y 6.114.148).

Los ácidos nucleicos de la invención pueden modificarse por truncación o uno o más residuos de la porción del extremo C de la secuencia. Adicionalmente, una variedad de codones de parada o terminación pueden incluirse al final de la secuencia de nucleótidos como se trata adicionalmente más adelante.

Uno o más ácidos nucleicos de la invención pueden incluirse en un vector, célula o entorno de huésped en el que una secuencia de nucleótidos codificante de la invención es un gen heterólogo.

Los polinucleótidos de la invención incluyen secuencias de polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido de la invención (o fragmento de polipéptido del mismo) que se une a CD80 y/o CD86 y/o suprime una respuesta inmunitaria, polinucleótidos que se hibridan bajo al menos condiciones rigurosas con una o más de tales secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento, secuencias de polinucleótidos complementarias a cualquiera de tales secuencias de polinucleótidos y variantes, análogos y derivados de homólogos de todos los anteriores. Una secuencia codificante se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido particular o un dominio, subsecuencia, región o fragmento de dicho polipéptido. Una secuencia codificante puede codificar un polipéptido CTLA-4 mutante o fragmento del mismo que tiene una propiedad funcional, tal como la capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 y/o inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria. Un ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia codificante respectiva de un polipéptido CTLA-4 mutante de la invención y variantes, análogos y derivados de homólogos del mismo.

Los ácidos nucleicos de la invención también pueden encontrarse en combinación con formulaciones de composición típica de ácidos nucleicos que incluyen la presencia de vehículos, tampones, adyuvantes, excipientes, diluyentes y similares, que son conocidos para aquellos expertos en la materia.

5 A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular descrita en el presente documento también engloba implícitamente variantes conservativamente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias y además la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en los que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixtos y/o desoxiinosina (Batzner y col. (1991) Nucl. Acid Res. 19:5081; Ohtsuka y col. (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Cassol y col. (1992); Rossolini y col. (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98).

Preparación y modificación de ácidos nucleicos

15 Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse y/o generarse por aplicación de cualquier técnica de síntesis, manipulación y/o aislamiento adecuada, o combinaciones de las mismas. Procedimientos a modo de ejemplo se describen más adelante. Por ejemplo, los polinucleótidos de la invención se producen normalmente mediante técnicas de síntesis de ácidos nucleicos convencionales tales como técnicas de síntesis en fase sólida conocidas en la técnica. En tales técnicas, fragmentos de hasta aproximadamente 100 bases normalmente se sintetizan individualmente, luego se unen (por ejemplo, por procedimientos de ligación enzimática o química, o procedimientos de recombinación mediada por polimerasa) para formar esencialmente cualquier secuencia de ácidos nucleicos continua deseada. La síntesis de los ácidos nucleicos de la invención también puede facilitarse (o realizarse alternativamente) por síntesis química usando, por ejemplo, el procedimiento de fosforamidito clásico que se describe en, por ejemplo, Beaucage y col. (1981) Tetrahedron Letters 22:1859-69, o el procedimiento descrito por Matthes y col. (1984) EMBO J. 3:801-05, por ejemplo, como se pone normalmente en práctica en procedimientos sintéticos automatizados. El ácido nucleico de la invención también puede producirse usando un sintetizador de ADN automático. Otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados se describen en, por ejemplo, Itakura y col., Annu. Rev. Biochem. 53:323 (1984), Itakura y col., Science 198:1056 (1984), e Ike y col., Nucl. Acid Res. 11:477 (1983).

30 Convenientemente, los ácidos nucleicos preparados a medida pueden encargarse de una variedad de fuentes comerciales tales como The Midland Certified Reagent Company (mcr@oligos.com), the Great American Gene Company (dirección del sitio de la web universal genco.com), ExpressGen Inc. (dirección del sitio de la web universal expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA). Similarmente, péptidos y anticuerpos a medida pueden encargarse a medida de cualquiera de una variedad de fuentes, por ejemplo, PeptidoGenic (pkim@ccnet.com), HTI Bio-products, Inc. (dirección del sitio de la web universal htibio.com) y BMA Biomedicals Ltd. (RU), Bio.Synthesis, Inc.

35 Ciertos nucleótidos de la invención también pueden obtenerse cribando bibliotecas de ADNc usando sondas de oligonucleótidos que pueden hibridarse con o amplificar por PCR polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención. Procedimientos para cribar y aislar clones de ADNc y procedimientos de amplificación por PCR son muy conocidos para aquellos expertos en la materia; procedimientos a modo de ejemplo se describen más adelante (véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en los ejemplos más adelante). Tales técnicas se describen en, por ejemplo, Berger y Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques", en Methods in Enzymol. vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, CA ("Berger"); Sambrook, arriba; y Ausubel, arriba. Algunos ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse alterando un esqueleto que se produce naturalmente, por ejemplo, por mutagénesis, recombinación *in vitro* (por ejemplo, barajado) o recombinación de oligonucleótidos. En otros casos, tales polinucleótidos pueden prepararse por ordenador o mediante procedimientos de recombinación de oligonucleótidos como se describen en las referencias citadas en el presente documento.

45 Las técnicas de ADN recombinante útiles en la modificación de ácidos nucleicos son muy conocidas en la técnica (por ejemplo, digestión con endonucleasa de restricción, ligación, transcripción inversa y producción de ADNc, y PCR). Técnicas de tecnología de ADN recombinante útiles y principios relacionados con las mismas se proporcionan en, por ejemplo, Mulligan (1993) Science 260:926-932, Friedman (1991) THERAPY FOR GENETIC DISEASES, Oxford University Press, Ibanez y col. (1991) EMBO J. 10:2105-10, Ibanez y col. (1992) Cell 69:329-41 (1992), y las patentes de EE.UU. n° 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648, y se describen más particularmente en Sambrook y col. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, y la tercera edición del mismo (2001), Ausubel y col. (1994-1999), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (con Greene Publishing Associates para algunas ediciones), Berger, arriba, y Watson, arriba.

Secuencias codificantes modificadas

55 Cuando corresponda, los ácidos nucleicos de la invención pueden modificarse para aumentar o potenciar la expresión en un huésped particular por modificación de la secuencia con respecto al uso de codones y/o contexto de codones, dado(s) el huésped (huéspedes) particular(es) en el (los) que se desea la expresión del ácido nucleico. Codones que se utilizan casi siempre en un huésped particular se llaman codones óptimos, y aquellos no utilizados

muy frecuentemente se clasifican como codones raros o de bajo uso (véase, por ejemplo, Zhang, S. P. y col. (1991) Gene 105:61-72). Los codones pueden estar sustituidos para reflejar el uso de codones preferido del huésped, un procedimiento llamado "optimización de codones" o "control del sesgo de codones por especie".

5 La secuencia codificante optimizada que comprende codones preferidos por un huésped procarionta o eucariota particular puede usarse para aumentar la velocidad de traducción o para producir transcritos de ARN recombinantes que tienen propiedades deseables tales como una semivida más larga, en comparación con transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada. Se conocen técnicas para producir secuencias optimizadas por codones (véase, por ejemplo, Murray, E. y col. (1989) Nucl. Acids Res. 17:477-508). Los codones de terminación de la traducción también pueden modificarse para reflejar la preferencia de huésped. Por ejemplo, codones de terminación preferidos para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA, respectivamente. El codón de terminación preferido para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que insectos y *E. coli* prefieren usar UAA como codón de terminación (véase, por ejemplo, Dalphin, M.E. y col. (1996) Nucl. Acids Res. 24:216-218, para discusión). La disposición de codones en contexto con otros codones también puede influir en las propiedades biológicas de una secuencia de ácidos nucleicos, y los inventores también contemplan modificaciones de ácidos nucleicos para proporcionar una disposición en el contexto de codones común para un huésped particular. Por tanto, una secuencia de ácidos nucleicos de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos optimizada por codones, es decir, optimizada por frecuencia de codones y/u optimizada por emparejamiento de codones (es decir, contexto de codones) para una especie particular (por ejemplo, el polipéptido puede expresarse de una secuencia de polinucleótidos optimizada para la expresión en seres humanos por sustitución de codones humanos "raros" basándose en la frecuencia de codones, o contexto de codones, tal como usando técnicas tales como aquellas descritas en Buckingham y col. (1994) Biochimie 76(5):351-54 y las patentes de EE.UU. nº 5.082.767, 5.786.464 y 6.114.148). Por ejemplo, en el presente documento se desvela ácido nucleico que comprende una variante de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 80, en el que la variante de la secuencia de nucleótidos se diferencia de la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 80 por la sustitución de codones "raros" para un huésped particular con codones comúnmente expresados en el huésped, codones que codifican el mismo residuo de aminoácido que los codones "raros" sustituidos en SEC ID N°: 80.

Vectores, componentes de vector y sistemas de expresión

30 La presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden uno o más de los ácidos nucleicos de la invención como se ha descrito ampliamente anteriormente. Tales construcciones pueden comprender un vector tal como un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, una partícula vírica, una partícula similar a virus, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC) o similares, o un vector no replicante tal como un liposoma, ADN desnudo o conjugado, micropartícula de ADN, en el que al menos una secuencia de ácidos nucleicos de la invención ha sido insertada, en una orientación directa o inversa. En un aspecto particular de esta realización, la construcción comprende además una o más secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor operativamente ligado a una secuencia de ácidos nucleicos de la invención (por ejemplo, ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado o recombinante del ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica). Grandes números de vectores y promotores adecuados son conocidos para aquellos expertos en la materia y están comercialmente disponibles. En algunos casos, un vector, tal como, por ejemplo, un virus o partícula similar a virus, también puede incluir o alternativamente puede incluir uno o más polipéptidos de la invención tal como, por ejemplo, incorporados en la envuelta del virus o partícula similar a virus. Los vectores pueden ser útiles como agentes de liberación para la liberación o administración a un sujeto de genes exógenos o proteínas. Los vectores de la presente invención, que incluyen aquellos descritos en el presente documento, son útiles como agentes de liberación para la liberación o administración de ácidos nucleicos y/o polipéptidos de la invención.

45 Textos generales que describen técnicas biológicas moleculares útiles en el presente documento, que incluyen el uso de vectores, promotores y muchos otros tópicos relevantes, incluyen Berger, arriba, Sambrook (1989), arriba, y Ausubel, arriba. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a expertos mediante los procedimientos de amplificación *in vitro*, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de Q3-replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), por ejemplo, para la producción de los ácidos nucleicos homólogos de la invención, se encuentran en Berger, Sambrook, y Ausubel, todos arriba, además de Mullis y col. (1987), patente de EE.UU. nº 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis"); Arnheim & Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal of NIH Research (1991) 3:81-94; (Kwoh y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177; Guatelli y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878; Lomeli y col. (1989) J. Clin. Chem. 35:1826-1831; Landegren y col. (1988) Science 241:1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4:560-569; Barringer y col. (1990) Gene 89:117-122, y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13:563-564.

60 PCR se refiere generalmente a un procedimiento en el que cantidades pequeñas de un trozo específico de ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN) se amplifican mediante procedimientos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.683.195 y las otras referencias citadas anteriormente). Generalmente, la información de secuencias de los extremos de la región de interés o más allá se usa para diseñar cebadores de oligonucleótidos. Tales cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas del molde a

amplificar. Los nucleótidos del extremo 5' de las cadenas opuestas pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede usarse para amplificar ARN específico o secuencias de ADN específicas, secuencias de ADN o ARN recombinante, secuencias de ADN y ARN de ADN genómico total y ADNc transcrito de secuencias de ARN celular total, bacteriófago o plásmido, etc. La PCR es un ejemplo, pero no el único ejemplo, de un procedimiento de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico que comprende el uso de otro ácido nucleico (por ejemplo, conocido) como cebador. Procedimientos mejorados de clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados se describen en Wallace y col., patente de EE.UU. n° 5.426.039. Procedimientos mejorados de amplificación de ácidos nucleicos grandes por PCR se resumen en Cheng y col. (1994) *Nature* 369:684 685 y las referencias citadas en su interior, en los que se generan amplicones de PCR de hasta 40 kilobases (kb). Un experto apreciará que esencialmente cualquier ARN puede convertirse en un ADN bicatenario adecuado para la digestión por restricción, expansión por PCR y secuenciación usando transcriptasa inversa y una polimerasa. Véase Ausubel, Sambrook, y Berger, todos arriba.

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden incorporarse en una cualquiera de una variedad de vectores, por ejemplo, vectores de expresión, para expresar un polipéptido que incluye, por ejemplo, un polipéptido de la invención. Pueden usarse vectores de expresión compatibles con células huésped procariontas; tales vectores de expresión procariontas se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, vector BLUESCRIPT (Stratagene), vector de expresión T7 (Invitrogen), vector pET (Novagen) y vectores procariontas similares.

Alternativamente pueden usarse vectores de expresión compatibles con células huésped eucariotas; tales vectores de expresión eucariotas se conocen en la técnica y están comercialmente disponibles. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, vectores pCMV (por ejemplo, Invitrogen), vector pIRES (Clontech), vector pSG5 (Stratagene), pcDNA3.1 (Invitrogen Life Technologies), pcDNA3 (Invitrogen Life Technologies), vector de expresión Ubiquitous Chromatin Opening Element (UCOE™) (Millipore) y vectores de expresión eucariotas similares. El vector UCOE™ se usa normalmente para la producción de proteínas en células de mamífero (por ejemplo, células CHO). Según Millipore, la tecnología de expresión UCOE™ frustra el silenciamiento de transgenes y proporciona expresión génica de alto nivel estable sin respeto por el sitio de integración cromosómica. Véase la página web de Millipore en la dirección de la web universal millipore.com. Un vector de expresión UCOE a modo de ejemplo en el que, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención puede incorporarse es el vector de expresión UCOE llamado CET1019AS-puro-Scel, que está disponible para licencia de Millipore. Información sobre el vector de expresión UCOE CET1019AS-puro-Scel puede encontrarse en, por ejemplo, John Wynne, "UCOE™ Technology Maximizes Protein Expression", *BioProcess International* 4(7):104-105 (julio/agosto de 2006) (RP1725EN00) (disponible en la dirección de la web universal millipore.com/bibliography/tech/rp1725en00); información adicional sobre este vector y la licencia de este vector de Millipore puede encontrarse en la página web de Millipore que se incluye en, por ejemplo, la dirección de la web universal millipore.com/company/cp3/ucoe_licensing y millipore.com/techpublications/tech1/ps1013en00. Por tanto, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, SEC ID N°: 36 o SEC ID N°: 50) fusionado con una secuencia de ADN que codifica un polipéptido del Fc de IgG2 (por ejemplo, SEC ID N°: 184), produciendo la secuencia de ADN de SEC ID N°: 201, se inserta en un vector UCOE CET1019AS (Millipore) y el plásmido de ADN resultante puede usarse para transfecciones de células huésped.

Vectores de expresión incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por ejemplo, derivados de SV40, vectores bacterianos (por ejemplo, *S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *B. anthracis*); plásmidos; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago; vectores de ADN o ARN vírico que incluyen, por ejemplo, virus de la variolovacuna, virus adenoasociados (AAV), adenovirus, virus del bosque de Semliki (por ejemplo, Notka y col., *Biol. Chem.* 380:341-52 (1999), poxvirus (por ejemplo, MVA), alfavirus (por ejemplo, virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de la encefalitis equina occidental (WEE), virus de la encefalitis equina oriental (EEE)), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la viruela aviar, pseudorrabia, virus del herpes simple, retrovirus y muchos otros. Puede usarse cualquier vector que transduzca material genético en una célula y, si se desea replicación, que sea replicable y viable en el huésped relevante. Los vectores víricos y bacterianos que sirven de vehículos de administración pueden atenuarse; la atenuación debe ser suficiente para reducir, si no eliminar, la inducción de síntomas de enfermedad no deseables. La Figura 1 es un diagrama esquemático de un vector de expresión de plásmidos a modo de ejemplo CTLA-4-Ig mutante de pcDNA que codifica una CTLA-4-Ig mutante de la invención. Detalles adicionales referentes a vectores de expresión adecuados se proporcionan más adelante, que incluyen los ejemplos.

Un vector de la invención que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención como se describe en el presente documento, además de una secuencia promotora o de control apropiada, puede emplearse para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese la proteína. Ejemplos de huéspedes de expresión apropiados incluyen: células bacterianas tales como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Neurospora crassa*; células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, CHO-K1), COS (por ejemplo, COS-1, COS-7), de riñón de hámster bebé (BHK) y de riñón embrionario humano (HEK) (por ejemplo, HEK 293), de melanoma de Bowes, y células vegetales. Se entiende que no todas las células o líneas celulares necesitan poder producir polipéptidos completamente funcionales de la

invención o fragmentos de los mismos. La invención no está limitada por las células huésped empleadas. Detalles adicionales referentes a células huésped adecuadas se proporcionan más adelante.

En sistemas bacterianos, varios vectores de expresión pueden seleccionarse dependiendo del uso previsto para el polipéptido deseado o fragmento del mismo. Por ejemplo, si se necesitan grandes cantidades de un polipéptido particular o fragmentos del mismo para la inducción de anticuerpos, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas de fusión que son fácilmente purificadas. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, clonación en *E. coli* multifuncional y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia codificante de nucleótidos de interés (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que codifica una CTLA-4-Ig mutante recombinante) puede ligarse en el vector en marco con secuencias para la Met del extremo amino y los 7 residuos posteriores de beta-galactosidasa de manera que se produzca una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke & Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509); vectores pET (Novagen, Madison WI); y similares.

Similarmente, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, varios vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH pueden usarse para la producción de los polipéptidos de la invención. Para revisiones véase Ausubel, arriba, Berger, arriba, y Grant y col. (1987) Meth. Enzymol. 153:516-544.

En células huésped de mamífero pueden utilizarse varios sistemas de expresión tales como sistemas basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, una secuencia codificante está opcionalmente ligada en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial en el genoma vírico produce un virus viable que puede expresar un polipéptido de interés en células huésped infectadas (Logan y Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). Además, los potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), se usan para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

Un vector, por ejemplo, vector de expresión, o polinucleótido de la invención puede comprender una o más secuencias de control de la expresión. Una secuencia de control de la expresión está normalmente asociada a y/u operativamente ligada a una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante recombinante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante recombinante. Una secuencia de control de la expresión es normalmente una secuencia de nucleótidos que promueve, potencia o controla la expresión (normalmente la transcripción) de otra secuencia de nucleótidos. Secuencias de control de la expresión adecuadas que pueden emplearse incluyen un promotor, que incluye un promotor constitutivo, promotor inducible y/o promotor represible, un potenciador para amplificar la expresión, una secuencia de iniciación, una secuencia de traducción de la terminación, un secuencia de control del corte y empalme, y similares.

Cuando un ácido nucleico de la invención se incluye en un vector, el ácido nucleico está normalmente operativamente ligado a una secuencia de control de la transcripción apropiada (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores ejercen un impacto particularmente importante sobre el nivel de expresión de polipéptidos recombinantes. Puede utilizarse cualquier promotor adecuado. Ejemplos de promotores adecuados incluyen el promotor del citomegalovirus (CMV) con o sin el primer intrón (intrón A), el promotor de repetición terminal largo del VIH, el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK), promotores del virus del sarcoma de Rous (RSV) tales como promotores de repeticiones terminales largas (LTR) del RSV, promotores del SV40, promotores del virus de tumor de mama de ratón (MMTV), promotores del VHS tales como el promotor Lap2 o el promotor de la timidina cinasa del herpes (como se describe en, por ejemplo, Wagner y col. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78:144-145), promotores derivados de SV40 o virus de Epstein Barr, promotores víricos adenoasociados (AAV) tales como el promotor p5, promotores de metalotioneína (por ejemplo, el promotor de metalotioneína de oveja o el promotor de metalotioneína de ratón (véase, por ejemplo, Palmiter y col. (1983) Science 222:809-814), el promotor de ubiquitina C humana, promotores de *E. coli* tales como los promotores lac y trp, promotor Pl lambda de fago y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariontas o eucariotas (tanto directamente en la célula como en virus que infectan la célula). Pueden emplearse promotores que presentan expresión de la línea base constitutiva fuerte en mamíferos, particularmente seres humanos, tales como promotor del CMV tales como el promotor temprano inmediato del CMV (descrito en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.168.062, 5.385.839, 5.688.688 y 5.658.759), y promotores que tienen identidad sustancial de secuencias con tales promotores del CMV. También pueden usarse promotores recombinantes que tienen propiedades potenciadas tales como en la publicación de patente internacional n° WO 02/00897.

Un promotor que está operativamente ligado a un ácido nucleico de la invención para la expresión del ácido nucleico puede tener cualquier mecanismo de acción adecuado. Por tanto, el promotor puede ser, por ejemplo, un promotor "inducible" (por ejemplo, un promotor de la hormona de crecimiento, promotor de metalotioneína, promotor de la proteína de choque térmico, promotor de E1B, promotor inducido por hipoxia, promotor inducible por radiación o promotor MLP adenovírico y conductor tripartito), un promotor inducible-represible, un promotor relacionado con la etapa de desarrollo (por ejemplo, un promotor del gen globina) o un promotor específico para tejido (por ejemplo, un promotor de α -actina de células de músculo liso, promotor de la cadena ligera 1A de miosina o promotor de cadherina endotelial vascular). Promotores inducibles adecuados incluyen ecdisona y promotores inducibles análogos a ecdisona. Los promotores inducibles análogos a ecdisona están comercialmente disponibles, por ejemplo, mediante Stratagene (La Jolla, CA). Si se desea, un ácido nucleico de la invención puede inducirse usando

un sistema de expresión inducible en y fuera del gel. Ejemplos de tales sistemas de expresión en y fuera del gel incluyen el sistema de expresión de genes Tet-On[™] y el sistema de expresión de genes Tet-Off[™], respectivamente (Clontech, Palo Alto, CA; véase, por ejemplo, catálogo de Clontech de 2000, pág. 110-111 para una descripción detallada de cada uno de tal sistema). El promotor inducible puede ser cualquier promotor que sea regulado por
 5 incremento y/o por disminución en respuesta a una señal apropiada. Promotores inducibles adicionales incluyen promotores inducibles de arabinosa, un promotor inducible de esteroides (por ejemplo, promotores inducibles de glucocorticoides), además de promotores inducibles por pH, estrés y calor.

El promotor puede ser, y frecuentemente es, un promotor nativo para huésped o un promotor derivado de un virus que infecta un huésped particular (por ejemplo, un promotor de beta-actina humana, promotor de EF1 α humana o un
 10 promotor derivado de un AAV humano operativamente ligado al ácido nucleico de interés), particularmente cuando la estricta evitación del silenciamiento de la expresión génica debido a reacciones inmunológicas del huésped para secuencias que no están regularmente presentes en el huésped es de interés. También puede utilizarse un sistema promotor bi-direccional (como se describe en, por ejemplo, el documento U.S. 5.017.478) ligado a múltiples secuencias de nucleótidos de interés.

Otros promotores y principios adecuados relacionados con la selección, uso y constricción de promotores adecuados se proporcionan en, por ejemplo, Werner (1999) *Mamm Genome* 10(2):168-75, Walther y col. (1996) *J. Mol. Med.* 74(7):379-92, Novina (1996) *Trends Genet.* 12(9):351-55, Hart (1996) *Semin. Oncol.* 23(1):154-58, Gralla (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6(5):526-30, Fassler y col. (1996) *Methods Enzymol* 273:3-29, Ayoubi y col. (1996),
 15 10(4) *FASEB J* 10(4):453-60, Goldstein y col. (1995) *Biotechnol. Annu. Rev.* 1:105-28, Azizkhan y col. (1993) *Crit. Rev. Eucariot. Gene Expr.* 3(4):229-54, Dynan (1989) *Cell* 58(1): 1-4, Levine (1989) *Cell* 59(3):405-8, y Berk y col. (1986) *Annu. Rev. Genet.* 20:45-79, además de la patente de EE.UU. n° 6.194.191. Otros promotores adecuados pueden identificarse por el uso de la base de datos de promotores eucariotas (publicación 68) (disponible en la dirección del sitio de la web universal epd.isb-sib.ch/) y otras bases de datos similares tales como la base de datos de regiones reguladoras de la transcripción (TRRD) (versión 4.1) (disponible en la dirección del sitio de la web universal bionet.nsc.ru/trrd/) y la base de datos de factores de transcripción (TRANSFAC) (disponible en la dirección del sitio de la web universal transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html).

Como una alternativa a un promotor, particularmente en vectores y construcciones de ARN, un vector o ácido nucleico de la invención puede comprender uno o más sitios de entrada al ribosoma interno (IRES), secuencias codificantes de IRES o potenciadores de la secuencia de ARN (análogos de la secuencia consenso de Kozak), tal
 30 como la secuencia de sensibilización omega del virus del mosaico del tabaco.

Un vector o polinucleótido de la invención puede incluir una secuencia activadora en la dirección 5' (UAS) tal como una secuencia activadora de Ga14 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.133.028) u otra secuencia reguladora en la dirección 5' adecuada (véase, por ejemplo, el documento U.S. n° 6.204.060).

Un vector o polinucleótido de la invención puede incluir una secuencia consenso de Kozak que es funcional en una célula de mamífero. La secuencia de Kozak puede ser una secuencia que se produce naturalmente o modificada, tal
 35 como las secuencias consenso de Kozak modificadas descritas en la patente de EE.UU. n° 6.107.477.

Señales de iniciación específicas pueden ayudar en la eficiente traducción de una secuencia codificante de la invención, tal como una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante. Tales señales pueden incluirse en un vector de la invención. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que una secuencia codificante, su codón de iniciación y secuencias en la dirección 5' se inserten en un vector de expresión apropiado puede no necesitarse señales de control de la traducción. Sin embargo, en los casos en los que sólo se inserta una secuencia codificante (por ejemplo, una secuencia de proteínas codificante madura), o una parte de la misma, deben proporcionarse señales de control de la transcripción de ácido nucleico exógeno que incluyen el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el correcto marco de lectura para garantizar la transcripción del inserto entero. Los elementos transcripcionales exógenos y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes - tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores apropiados al sistema de células en uso (véase, por ejemplo, Scharf y col., *Results Probl. Cell. Differ.* 20:125-62 (1994); y Bittner y col., *Meth. Enzymol.* 153:516-544 (1987)). Potenciadores adecuados incluyen el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV) y los potenciadores de RTE descritos en la patente de EE.UU. n° 6.225.082.
 40 45 50

El experto reconocerá que la introducción de un codón de iniciación (ATG) en el extremo 5' de una secuencia de nucleótidos particular de interés normalmente produce la adición de una metionina del extremo N a la secuencia de aminoácidos codificada cuando la secuencia se expresa en una célula de mamífero (otras modificaciones pueden producirse en células bacterianas y/u otras eucariotas tales como introducción de un residuo de formil-metionina en un codón de iniciación). Para la expresión de un ácido nucleico de la invención en células eucariotas, un codón de iniciación y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal se incluyen normalmente en el extremo 5' de una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, SEC ID N°: 80), y un codón de terminación está normalmente incluido en el extremo C del ácido nucleico (por ejemplo, SEC ID N°: 80). Una secuencia de péptidos señal a modo de ejemplo es la secuencia de péptidos señal de hCTLA-4 (SEC ID N°: 182); la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido señal del activador tisular del plasminógeno se muestra en SEC ID N°: 181. Otra secuencia de
 55 60

péptidos señal a modo de ejemplo es la secuencia de péptidos señal de hCTLA-4 (SEC ID N°: 216), que está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID N°: 215.

Secuencias de terminación se tratan en detalle más adelante.

5 Tales elementos pueden incluirse en la construcción de vector de elección. Tras la expresión, las variantes de polipéptido codificadas por el ácido nucleico (por ejemplo, SEC ID N°: 80) incluirán inicialmente un residuo de metionina del extremo N y la secuencia de péptidos señal. Sin embargo, la metionina del extremo N y la secuencia de péptidos señal se escindirán tras la secreción, generando así el polipéptido codificado (por ejemplo, SEC ID N°: 1).

10 El nivel de expresión de un ácido nucleico de la invención (o un polipéptido correspondiente de la invención) puede evaluarse por cualquier técnica adecuada. Ejemplos incluyen análisis de transferencia Northern (tratados en, por ejemplo, McMaster y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(11):4835-38 (1977) y Sambrook, más adelante), reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) (como se describe en, por ejemplo, el documento U.S. 5.601.820 y Zaheer y col., Neurochem. Res. 20:1457-63 (1995)) y técnicas de hibridación *in situ* (como se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.750.340 y 5.506.098). La cuantificación de proteínas también puede
15 llevarse a cabo por el ensayo de Lowry y otros ensayos de cuantificación de proteínas (véase, por ejemplo, Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254 (1976); Lowry y col., J. Biol. Chem. 193:265 (1951)). El análisis de transferencia Western de polipéptidos recombinantes de la invención obtenido del lisado de células transfectadas con polinucleótidos que codifican tales polipéptidos recombinantes es otra técnica adecuada para evaluar niveles de expresión de polipéptidos recombinantes.

20 Un vector, por ejemplo, vector de expresión, o polinucleótido de la invención puede comprender un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción y una región de terminación de la transcripción. Una región de terminación de la transcripción adecuada es, por ejemplo, una secuencia de poliadenilación que facilita la escisión y poliadenilación de un transcrito de ARN producido a partir de una secuencia de ADN. Puede usarse cualquier secuencia de poliadenilación adecuada que incluye una secuencia optimizada sintética, además de la secuencia de poliadenilación de BGH (hormona de crecimiento bovina), gen de la hormona de crecimiento humana, virus del polio, TK (timidina cinasa), EBV (virus de Epstein Barr), beta-globina de conejo y los virus del papiloma, que incluyen virus del papiloma humano y BPV (virus del papiloma bovino). Secuencias de poliadenilación (poli A) adecuadas también incluyen la secuencia de poliadenilación de SV40 (virus 40 del sarcoma humano) y la secuencia de poli A de BGH. Tales secuencias de poliA se describen en, por ejemplo, Goodwin y col. (1998) Nucleic Acids Res. 26(12):2891-8, Schek y col. (1992) Mol. Cell. Biol. 12(12):5386-93, y van den Hoff y col. (1993) Nucleic Acids Res. 21(21):4987-8. Principios adicionales relacionados con la selección de secuencias de poliadenilación apropiadas se describen en, por ejemplo, Levitt y col. (1989) Genes Dev. 1989 3(7):1019-1025, Jacob y col. (1990) Crit. Rev. Eucariot. Gene Expr. 1(1):49-59, Chen y col. (1995) Nucleic Acids Res. 23(14):2614-2620, Moreira y col. (1995) EMBO J. 14(15):3809-3819, Carswell y col. (1989) Mol. Cell. Biol. 9(10):4248-4258.

35 Un vector o polinucleótido de la invención puede comprender además sitios de recombinación específicos para sitio que pueden usarse para modular la transcripción de una secuencia de nucleótidos de interés como se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.959.317, 5.801.030 y 6.063.627, solicitud de patente europea n° 0 987 326 y publicación de solicitud de patente internacional n° WO 97/09439.

40 Un vector o polinucleótido de la invención también puede comprender un ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización para elegir como diana la expresión de polipéptidos para un compartimento celular deseado, membrana u orgánulo, o para dirigir la secreción de polipéptidos al espacio periplásmico o en el medio de cultivo celular. Tales secuencias se conocen en la técnica e incluyen péptidos conductores de la secreción o péptidos señal, secuencias que eligen como diana orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención de RE, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito de cloroplastos), secuencias de localización en / anclaje a membrana (por ejemplo, secuencias de transferencia de la detención, secuencias de anclaje GPI), y similares. Los polinucleótidos de la invención pueden fusionarse, por ejemplo, en marco con un ácido nucleico tal que codifica una secuencia de secreción y/o localización. Los polipéptidos expresados por tales polinucleótidos de la invención pueden incluir la secuencia de aminoácidos correspondiente a la(s) secuencia(s) de secreción y/o localización.

50 Además, un vector o polinucleótido de la invención puede comprender una o más secuencias de nucleótidos de marcadores de selección o genes para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tal como resistencia a dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina, resistencia a G418, resistencia a puomicina y/o resistencia a blasticidina para cultivo celular eucariota, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

55 Un vector o polinucleótido de la invención también puede comprender un origen de replicación útil para propagación en un microorganismo. El origen de replicación bacteriano (Ori) utilizado es preferentemente uno que no afecta adversamente la expresión génica en células de mamífero. Ejemplos de secuencias de origen de replicación útiles incluyen el fago de f1 ori, RK2 oriV, pUC ori y pSC101 ori. Secuencias del origen de replicación incluyen Co1E1 ori y p 15 (disponible del plásmido pACYC177, New England Biolab, Inc.), alternativamente otra secuencia de ori de baja

copia (similar a p15) puede ser deseable en algunos contextos. A este respecto, el ácido nucleico actúa deseablemente de vector lanzadera, puede replicarse y/o expresarse en huéspedes tanto eucariotas como procariontas (por ejemplo, un vector que comprende secuencias de un origen de replicación reconocidas en tanto eucariotas como procariontas).

- 5 La invención incluye un vector de ADN o ARN desnudo que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston (1997) *Nat Biotech* 17:355-59), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.077.835 y/o la publicación de patente internacional nº WO 00/70087), un vector de plásmido tal como pcDNA3.1, pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "mosquito" (como se describe en, por ejemplo, Schakowski y col. (2001) *Mol. Ther.* 3:793-800) o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado tal como una construcción precipitada con CaPO₄ (como se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 00/46147, Benvenisty y Reshef (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9551-55, Wigler y col. (1978), *Cell* 14:725, y Coraro y Pearson (1981) *Somatic Cell Genetics* 7:603), que comprende un ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un plásmido de ADN desnudo que comprende SEC ID Nº: 80 operativamente ligada a un promotor del CMV o variante del promotor del CMV y una secuencia de poliadenilación adecuada. Vectores de nucleótidos desnudos y el uso de los mismo se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.589.466 y 5.973.972).

Un vector de la invención normalmente es un vector de expresión que es adecuado para la expresión en un sistema bacteriano, sistema eucariota, sistema de mamífero u otro sistema (a diferencia de un vector diseñado para replicar la secuencia de ácidos nucleicos sin expresión, que puede denominarse un vector de clonación). Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona un vector de expresión bacteriano que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención (por ejemplo, secuencia de ácidos nucleicos que codifica una CTLA-4-Ig mutante recombinante). Vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas de fusión que son fácilmente purificadas (por ejemplo, clonación de *E. coli* multifuncional y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989); vectores pET (Novagen, Madison WI); y similares). Aunque tales vectores de expresión bacterianos pueden ser útiles en expresar polipéptidos particulares de la invención, las glucoproteínas de la invención se expresan preferentemente en células eucariotas y como tal la invención también proporciona vectores de expresión eucariotas.

El vector de expresión puede ser un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico de la invención en una célula de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Vectores adecuados para su uso en, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en Ausubel, arriba, Berger, arriba, y Grant y col., *Meth. Enzymol.* 153:516-544 (1987)). Normalmente, el vector de expresión será un vector adecuado para la expresión de un ácido nucleico de la invención en una célula animal tal como una célula de insecto (por ejemplo, una célula SF-9) o una célula de mamífero (por ejemplo, una célula CHO, célula 293, célula HeLa, célula de fibroblasto humano o célula bien caracterizada similar). Vectores de expresión de mamífero adecuados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kaufman, *Mol. Biotechnol.* 16(2):151-160 (2000), Van Craenenbroeck, *Eur. J. Biochem.* 267(18):5665-5678 (2000), Makrides, *Protein Expr. Purif.* 17(2):183-202 (1999), y Yarranton, *Curr. Opin. Biotechnol.* 3(5):506-511 (1992)). También se conocen vectores de expresión de plásmidos de insecto adecuados (Braun, *Biotechniques* 26(6):1038-1040:1042 (1999)).

Un vector de expresión normalmente puede propagarse en una célula huésped, que puede ser una célula eucariota (tal como una célula de mamífero, célula de levadura o célula de planta) o una célula procarionta, tal como una célula bacteriana. La introducción de un vector de ácido nucleico o vector de expresión en la célula huésped (por ejemplo, transfección) puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, procedimiento de coprecipitación con fosfato de calcio de Graham y col., *Virology* 52:456-457 (1973)), transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación, pistola de genes o de vacunas, inyección, lipofección y biolística u otras técnicas comunes (véase, por ejemplo, Kriegler, *GENE TRANSFER AND EXPRESSION: A LABORATORY MANUAL*, Stockton Press (1990); véase Davis, L., Dibner, M., y Battey, I., *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (1986) para una descripción de procedimientos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*). Células que comprenden estos y otros vectores de la invención forman una parte importante de la invención.

En el presente documento se desvela vector de expresión que comprende: (i) una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un primer polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 1-73, en el que dicho primer polipéptido se une a CD86 humano y/o CD80 humano y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos, y/o suprime una respuesta inmunitaria, y (ii) una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un segundo polipéptido que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 de un polipéptido de inmunoglobulina (Ig). El polipéptido de Ig es opcionalmente un polipéptido del Fc de Ig humana (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG4, etc.) o un polipéptido de Fc de Ig mutante (por ejemplo, un polipéptido del Fc de Ig en el que uno o más residuos de cisteína han sido sustituidos con otro aminoácido (por ejemplo, un residuo de serina), eliminándose así uno o más enlaces disulfuro formados entre dos cadenas de Ig, o en el que uno o más residuos de prolina está sustituido con otro aminoácido (por ejemplo,

prolina) para reducir la función efectora (unión a receptor de Fc reducida). En el presente documento se desvela un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que tiene al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222.

5 Ácidos nucleicos adicionales proporcionados por la invención incluyen cósmidos. Cualquier vector de cósmido adecuado puede usarse para replicar, transferir y expresar la secuencia de ácidos nucleicos de la invención. Normalmente, un cósmido comprende un oriV bacteriano, un marcador de selección antibiótico, un sitio de clonación y uno cualquiera o dos sitios cos derivados del bacteriófago lambda. El cósmido puede ser un cósmido lanzadera o cósmido de mamífero que comprende un oriV de SV40 y, deseablemente, marcador(es) de selección de mamífero
10 adecuado(s). Los vectores de cósmido se describen adicionalmente en, por ejemplo, Hohn y col. (1988) *Biotechnology* 10:113-27.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden incluirse en y/o administrarse a un huésped o célula huésped en forma de un vehículo de administración adecuado (es decir, un vector). El vector puede ser cualquier vector adecuado que incluye vectores de ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos, u otros vectores descritos
15 anteriormente, y puede incluir cualquier combinación de los elementos de expresión anteriormente descritos y/u otros elementos de secuencia que facilitan la transfección y/o promotores de la expresión. Ejemplos de tales vectores incluyen virus, plásmidos bacterianos, fagos, cósmidos, fagémidos, derivados de SV40, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácidos nucleicos víricos (ARN o ADN), polilisina y células bacterianas.

20 La administración de una secuencia de ADN recombinante de la invención puede llevarse a cabo con un plásmido de ADN desnudo o plásmido asociado a uno o más agentes potenciadores de la transfección como se trata adicionalmente en el presente documento. El vector de ADN de plásmido puede tener cualquier combinación adecuada de rasgos. Los vectores de ADN de plásmido pueden comprender una región promotora/potenciadora fuerte (por ejemplo, promotor del CMV humano, RSV, SV40, SL3-3, MMTV o LTR del VIH), una secuencia de
25 terminación de poli(A) eficaz, un origen de replicación para producto de plásmido en *E. coli*, un gen de resistencia a antibiótico como marcador de selección y un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un poliligador). Un vector de plásmido particular para la administración del ácido nucleico de la invención se muestra a este respecto en la Figura 1; la construcción y rasgos de este vector se describen en los ejemplos más adelante.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de no ácido nucleico que comprende al menos un ácido nucleico o polipéptido de la invención. Un vector de no ácido nucleico tal incluye, por ejemplo, pero no se limita a, un virus recombinante, un conjugado de ácido nucleico-proteína vírico (que, con partículas víricas recombinantes, puede algunas veces denominarse un vector vírico) o una célula tal como células bacterianas recombinantes (y normalmente atenuadas) de *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* y de bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG). Por tanto, por
30 ejemplo, la invención proporciona un vector vírico, vector de insecto, vector bacteriano o vector de planta que comprende un ácido nucleico de la secuencia de la invención. Cualquier vector vírico, de insecto, de planta o bacteriano adecuado puede usarse a este respecto y en la técnica se conocen varios. Un vector vírico puede comprender cualquier número de polinucleótidos víricos, solos (un vector de ácido nucleico vírico) o más comúnmente en combinación con una o más (normalmente dos, tres, o más) proteínas víricas que facilitan la administración, replicación y/o expresión del ácido nucleico de la invención en una célula huésped deseada.

40 En un aspecto, bacterias intracelulares (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*) pueden usarse para administrar un ácido nucleico de la invención. Un vector bacteriano a modo de ejemplo para la administración de ADN de plásmido de uno o más ácidos nucleicos de la invención es *Listeria monocytogenes* (Lieberman y col., *Vaccine* 20:2007-2010 (2002)).

La invención incluye vectores víricos recombinantes o aislados que han sido modificados para comprender uno o
45 más ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención. Un vector vírico puede incluir un polinucleótido que comprende todo o parte de un genoma vírico, un conjugado de proteína vírica/ácido nucleico, una partícula similar a virus (VLP), un vector similar a aquellos descritos en la patente de EE.UU. n° 5.849.586 y publicación de solicitud de patente internacional n° WO 97/04748, o una partícula de virus intacto que comprende uno o más ácidos nucleicos víricos, y el vector vírico está normalmente manipulado para incluir al menos un ácido nucleico y/o polipéptido de la invención.
50 Un vector vírico (es decir, un virus recombinante) puede comprender una partícula vírica natural o una partícula vírica modificada, ejemplos particulares de los cuales se tratan más adelante. Normalmente se usan numerosos virus como vectores para la administración de ácidos nucleicos exógenos que incluyen al menos un ácido nucleico de la invención, tal como un ácido nucleico que codifica un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante descrita en el presente documento. Tales vectores incluyen virus de ADN y ARN recombinantemente modificados envueltos o no envueltos, normalmente seleccionados de *baculoviridae*, *parvoviridae*, *picomoviridae*, *herpesviridae*,
55 *poxviridae*, *adenoviridae* o *picornaviridae*. Los vectores víricos pueden ser naturales o pueden modificarse por técnicas de ácido nucleico recombinante para ser deficientes en la replicación, competentes en la replicación o condicionalmente replicantes.

60 El vector vírico puede ser un vector que requiere la presencia de otro vector o virus natural para la replicación y/o expresión (es decir, un virus dependiente de colaborador) tal como un amplicón de vector adenovírico.

Normalmente, tales vectores víricos comprenden una partícula vírica natural, o una partícula vírica modificada en su contenido de proteína y/o ácido nucleico para aumentar la capacidad del transgén o ayudar en la transfección y/o expresión del ácido nucleico (ejemplos de tales vectores incluyen los amplicones del virus del herpes/AAV). El genoma vírico puede modificarse para incluir promotores inducibles que alcanzan la replicación o expresión sólo bajo ciertas condiciones.

El vector vírico puede derivarse de o comprender un vello que normalmente infecta animales, preferentemente vertebrados, tales como mamíferos, que incluyen, por ejemplo, seres humanos. Partículas de vector vírico adecuadas incluyen a este respecto, por ejemplo, partículas de vector adenovírico (incluyendo cualquier virus de o derivado de un virus de los *adenoviridae*), partículas de vector vírico adenoasociado (partículas de vector de AAV) u otros parvovirus y partículas de vector parvovírico, partículas de vector vírico del papiloma, vector vírico del bosque de Semliki, vectores flavivíricos, vectores picornavíricos, vectores alfavíricos, vectores víricos del herpes, vectores de poxvirus, vectores retrovíricos, que incluyen vectores lentivíricos. Ejemplos de tales virus y vectores víricos se proporcionan en, por ejemplo, Fields Virology, arriba, Fields y col., eds., VIROLOGY, Raven Press, Ltd., Nueva York (3ª ed., 1996 y 4ª ed., 2001), ENCYCLOPEDIA OF VIROLOGY, R.G. Webster y col., eds., Academic Press (2ª ed., 1999), FUNDAMENTAL VIROLOGY, Fields y col., eds., Lippincott-Raven (3ª ed., 1995), Levine, "viruses", Scientific American Library No. 37 (1992), MEDICAL VIROLOGY, D.O. White y col., eds., Academic Press (2ª ed. 1994), e INTRODUCTION TO MODERN VIROLOGY, Dimock, N.J. y col., eds., Blackwell Scientific Publications, Ltd. (1994).

Vectores víricos que pueden emplearse con ácidos nucleicos de la invención y los procedimientos descritos en el presente documento incluyen vectores de virus adenoasociados que son revisados en, por ejemplo, Carter (1992) Curr. Opin. Biotech. 3:533-539 (1992) y Muzyczka (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:97-129 (1992). Tipos y aspectos adicionales de vectores de AAV se describen en, por ejemplo, Buschacher y col., Blood 5(8):2499-504, Carter, Contrib. Microbiol. 4:85-86 (2000), Smith-Arica, Curr. Cardiol. Rep. 3(1):41-49 (2001), Taj, J. Biomed. Sci. 7(4):279-91 (2000), Vigna y col., J. Gene Med. 2(5):308-16 (2000), Klimatcheva y col., Front. Biosci. 4:D481-96 (1999), Lever y col., Biochem. Soc. Trans. 27(6):841-47 (1999), Snyder, J. Gene Med. 1(3):166-75 (1999), Gerich y col., Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 5(2):118-23 (1998), y During, Adv. Drug Deliv. Review 27(1):83-94 (1997), y las patentes de EE.UU. nº 4.797.368, 5.139.941, 5.173.414, 5.614.404, 5.658.785, 5.858.775 y 5.994.136, además de otras referencias tratadas en otra parte en el presente documento). Vectores víricos adenoasociados pueden construirse y/o purificarse usando los procedimientos expuestos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 4.797.368 y Laughlin y col., Gene 23:65-73 (1983).

Los vectores de alfavirus pueden ser vectores de administración de genes en otros contextos. Los vectores de alfavirus se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Carter (1992) Curr Opin Biotech 3:533-539, Schlesinger Expert Opin. Biol. Ther. (2001) 1(2):177-91, Polo y col., Dev. Biol. (Basel). 2000; 104:181-5, Wahlfors y col., Gene Ther. (2000) 7(6):472-80, publicaciones de solicitud de patente internacional nº WO 01/81609, WO 00/39318, WO 01/81553, WO 95/07994, WO 92/10578.

Otro grupo ventajoso de vectores víricos son los vectores víricos del herpes. Ejemplos se describen en, por ejemplo, Lachmann y col., Curr. Opin. Mol. Ther. (1999) 1(5):622-32, Fraefel y col., Adv. Virus Res. (2000) 55:425-51, Huard y col., Neuromuscul. Disord. (1997) 7(5):299-313, Frenkel y col., Gene Ther. (1994) Suppl 1:S40-6, patentes de EE.UU. nº 6.261.552 y 5.599.691.

Vectores retrovíricos, que incluyen vectores lentivíricos, también pueden ser vehículos de administración de genes ventajosos en contextos particulares. Hay numerosos vectores retrovíricos conocidos en la técnica. Ejemplos de vectores retrovíricos se describen en, por ejemplo, Miller, Curr Top Microbiol. Immunol. (1992) 158:1-24, Weber y col., Curr. Opin. Mol. Ther. (2001) 3(5):439-53, Hu y col., Pharmacol. Rev. (2000) 52(4):493-511, Kim y col., Adv. Virus Res. (2000) 55:545-63, Palu y col., Rev. Med. Virol. (2000) 10(3):185-202, Takeuchi y col., Adv. Exp. Med. Biol. (2000) 465:23-35, patentes de EE.UU. nº 6.326.195, 5.888.502, 5.580.766 y 5.672.510.

Los vectores de baculovirus son otro grupo ventajoso de vectores víricos, particularmente para la producción de polipéptidos de la invención. La producción y uso de vectores de baculovirus es conocida (véase, por ejemplo, Kost, Curr. Opin. Biotechnol. 10(5):428-433 (1999); Jones, Curr. Opin. Biotechnol. 7(5):512-516 (1996)). Si el vector se usa para usos terapéuticos, el vector se seleccionará de forma que pueda infectar adecuadamente (o en el caso de vectores de ácidos nucleicos, transfectar o transformar) células diana en las que se desea el efecto terapéutico deseado.

Los vectores adenovíricos también pueden ser vectores víricos adecuados para la transferencia de genes. Los vectores adenovíricos son muy conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Graham y col. (1995) Mol. Biotechnol. 33(3):207-220, Stephenson (1998) Clin. Diagn. Virol. 10(2-3):187-94, Jacobs (1993) Clin Sci (Lond). 85(2):117-22, patentes de EE.UU. nº 5.922.576, 5.965.358 y 6.168.941 y solicitudes de patente internacional WO 98/22588, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441 y WO 00/32754. Vectores adenovíricos, vectores víricos del herpes y vectores víricos de Sindbis, útiles en la práctica de la invención y adecuados para la transducción y expresión *in vivo* de organismos de ácidos nucleicos de la invención, se describen generalmente en, por ejemplo, Jolly (1994) Cancer Gene Therapy 1:51-64, Latchman (1994) Molec. Biotechnol. 2:179-195, y Johanning y col. (1995) Nucl. Acids Res. 23:1495-1501.

El vector de virus puede ser deficiente en la replicación en una célula huésped. Están incluidos vectores de virus adenoasociados (AAV), que son naturalmente deficientes en la replicación en ausencia de adenovirus complementarios o al menos productos génicos de adenovirus (proporcionados por, por ejemplo, un virus colaborador, plásmido o célula de complementación). Por "deficiente en la replicación" se indica que el vector vírico comprende un genoma que carece de al menos una función génica esencial para la replicación. Una deficiencia en un gen, función génica o región de gen o genómica, como se usa en el presente documento, se define como una delección de material genético suficiente del genoma vírico para alterar o destruir la función del gen cuya secuencia de ácidos nucleicos se delecionó por completo o en parte. Las funciones del gen esenciales para la replicación son aquellas funciones del gen que se requieren para replicación (es decir, propagación) de un vector vírico deficiente en la replicación. Las funciones del gen esenciales de la partícula de vector vírico varían con el tipo de partícula de vector vírico en cuestión. Ejemplos de partículas de vector vírico deficientes en la replicación se describen en, por ejemplo, Marconi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(21):11319-20 (1996), Johnson y Friedmann, Methods Cell Biol. 43 (pt. A):211-30 (1994), Timiryasova y col., J. Gene Med. 3(5):468-77 (2001), Burton y col., Stem Cells 19(5):358-77 (2001), Kim y col., Virology 282(1):154-67 (2001), Jones y col., Virology 278(1): 137-50 (2000), Gill y col., J. Med. Virol. 62(2): 127-39 (2000). Otros vectores deficientes en la replicación se basan en vectores de MLV simples (Miller y col. (1990) Mol. Cell Biol. 10:4239; Kolberg (1992) J. NIH Res. 4:43, y Cometta y col. (1991) Hum. Gene. Ther. 2:215). Los vectores de la viruela del canario son ventajosos en la infección de células humanas, pero no pueden replicarse naturalmente en su interior (es decir, sin modificación genética).

La construcción básica de vectores víricos recombinantes es muy entendida en la materia e implica usar técnicas de biología molecular convencionales tales como aquellas descritas en, por ejemplo, Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press 1989) y la tercera edición del mismo (2001), Ausubel y col., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Wiley Interscience Publishers 1995), y Watson, arriba, y varias de las otras referencias mencionadas en el presente documento. Por ejemplo, pueden construirse y/o purificarse vectores adenovíricos usando los procedimientos expuestos, por ejemplo, en Graham y col., Mol. Biotechnol. 33(3):207-220 (1995), patente de EE.UU. n° 5.965.358, Donthine y col., Gene Ther. 7(20):1707-14 (2000), y otras referencias descritas en el presente documento. Los vectores víricos adenoasociados pueden construirse y/o purificarse usando los procedimientos expuestos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.797.368 y Laughlin y col., Gene 23:65-73 (1983). Técnicas similares se conocen en la técnica con respecto a otros vectores víricos, particularmente con respecto a vectores víricos del herpes (véase por ejemplo, Lachman y col., Curr. Opin. Mol. Ther. 1(5):622-32 (1999)), vectores lentivíricos y otros vectores retrovíricos. En general, el vector vírico comprende una inserción del ácido nucleico (por ejemplo, un vector adenovírico natural puede comprender una inserción de hasta 3 KB sin delección) o, más normalmente, comprende una o más delecciones del genoma del virus para acomodar la inserción del ácido nucleico y ácidos nucleicos adicionales, según se desee, y para evitar la replicación en células huésped.

Vectores no víricos tales como, por ejemplo, plásmidos de ADN, ácidos nucleicos desnudos y ácido nucleico complejado con un vehículo de administración tal como un liposoma también pueden asociarse a moléculas que eligen como diana el vector para una región particular en el huésped (por ejemplo, un órgano particular, tejido y/o tipo de célula). Por ejemplo, un nucleótido puede conjugarse con una proteína que elige diana tal como una proteína vírica que se une a receptor o una proteína que se une a receptor de una diana particular (por ejemplo, por modificación de las técnicas en Wu y col., J. Biol. Chem. 263(29):14621-24 (1988)). Se conocen composiciones catiónicas que eligen diana (véase, por ejemplo, el documento U.S. 6.120.799). Otras técnicas para construcciones genéticas que eligen diana se proporcionan en la publicación de solicitud de patente internacional WO 99/41402.

Huéspedes de expresión

La presente invención también proporciona células huésped manipuladas transducidas, transfectadas o transformadas con un vector de la invención (por ejemplo, un vector de clonación o vector de expresión) o un ácido nucleico de la invención. Las células huésped manipuladas pueden cultivarse en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar el ácido nucleico de interés. Las condiciones de cultivo, tal como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para aquellos expertos en la materia y en las referencias citadas en el presente documento que incluyen, por ejemplo, Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3ª ed., Wiley - Liss, Nueva York, y las referencias citadas en su interior. Los polipéptidos de la invención codificados por tales vectores o ácidos nucleicos de la invención se expresan en tales células huésped y pueden aislarse por técnicas convencionales. Por ejemplo, los polipéptidos liberados en el cultivo celular pueden aislarse del cultivo por ultracentrifugación o técnicas similares.

Los polipéptidos de la invención pueden producirse en una variedad de huéspedes de expresión que incluyen, pero no se limitan a, células animales tales como células de mamífero (por ejemplo, células CHO), que incluyen células de primate humano y no humano, y en células no animales tales como plantas, levadura, hongos, bacterias y similares. Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados incluyen células bacterianas tales como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Neurospora crassa*; células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero tales como células CHO (por ejemplo, CHO-K1), COS (por ejemplo, COS-1, COS-7), BHK y HEK (por ejemplo, HEK 293), células de melanoma de Bowes y células vegetales. Como se observa anteriormente, la invención no está limitada

por las células huésped empleadas. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, todos arriba, detalles referentes al cultivo celular se encuentran en, por ejemplo, Payne y col. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamburg y Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual*, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg NY); Atlas & Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL. Tales células huésped pueden adaptarse para el crecimiento en medio sin proteínas sin suero, medio sin componente animal tal como, por ejemplo, un medio químicamente definido (CD) (tal como, por ejemplo, CD OptiCHO™ (Invitrogen, nº 12681) usando procedimientos conocidos en la técnica.

La invención proporciona una(s) célula(s) que comprende(n) uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos, vectores u otras construcciones de la invención (por ejemplo, una construcción que expresa un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante) descritas en el presente documento o cualquier combinación de las mismas. También se incluye una célula que comprende uno o más de cualquiera de los polipéptidos, anticuerpos o proteínas de fusión, u otras construcciones de la invención descritas en el presente documento, o cualquier combinación de uno o más de estos. Una célula de la invención es normalmente una célula aislada o recombinante y puede comprender una célula huésped. Una célula tal, por ejemplo, célula recombinante, puede modificarse por transformación, transfección y/o infección con al menos un ácido nucleico, vector u otra construcción de la invención. Una célula tal puede ser una célula eucariota (por ejemplo, célula de mamífero, levadura o de planta) o una célula procariota (por ejemplo, célula bacteriana) y puede transformarse con cualquier construcción tal de la invención usando una variedad de procedimientos conocidos que incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, procedimiento de co-precipitación con fosfato de calcio), transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación (Irving y col., *Cell* 64:891-901 (1991)), pistola de genes o de vacunas, lipofección y biolística u otras técnicas comunes como se observa anteriormente. Véanse también los procedimientos y tecnología de electroporación de Inovio Biomedical Corp. en la dirección del sitio de la web universal inovio.com.

Una cepa de células huésped se elige opcionalmente para su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en el modo deseado. Tales modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Diferentes células huésped tales como células de *E. coli*, *Bacillus sp.*, levadura o de mamífero, tal como CHO, HeLa, BHK, MDCK, HEK 293, WI38, etc., tienen mecanismo celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traduccionales y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña introducida.

Un ácido nucleico de la invención puede insertarse en una célula huésped apropiada (en cultivo o en un organismo huésped) para permitir que el huésped exprese una proteína de interés (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante). Cualquier célula huésped adecuada puede ser transformada/transducida por los ácidos nucleicos de la invención. Ejemplos de huéspedes de expresión apropiados incluyen: células bacterianas tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus sp.* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Neurospora crassa*; células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero tales como células Vero, células HeLa, células CHO (por ejemplo, CHO-K1), células COS, células WI38, células NIH-3T3 (y otras células de fibroblastos tales como células MRC-5), células MDCK, células KB, células SW-13, células MCF7, células BHK, células HEK-293, células de melanoma de Bowes y células vegetales, etc.

La presente invención también proporciona células huésped que se transducen, transforman o transfectan con al menos un ácido nucleico o vector de la invención. Como se ha tratado anteriormente, un vector de la invención normalmente comprende un ácido nucleico de la invención. Las células huésped son genéticamente manipuladas (por ejemplo, transducidas, transformadas, infectadas o transfectadas) con los vectores de la invención, que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula vírica, un fago, bacterias atenuadas o cualquier otro tipo de vector adecuado. Células huésped adecuadas para la transducción y/o infección con vectores víricos de la invención para la producción de los polipéptidos recombinantes de la invención y/o para la replicación del vector vírico de la invención incluyen las células anteriormente descritas. Ejemplos de células que se ha demostrado que son adecuadas para la encapsidación de partículas de vector vírico se describen en, por ejemplo, Polo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(8):4598-603 (1999), Farson y col., *J. Gene Med.* 1(3):195-209 (1999), Sheridan y col., *Mol. Ther.* 2(3):262-75 (2000), Chen y col., *Gene Ther.* 8(9):697-703 (2001), y Pizzaro y col., *Gene Ther.* 8(10):737-745 (2001). Para vectores víricos deficientes en la replicación tales como vectores de AAV se necesitan líneas celulares complementantes, líneas celulares transformadas con virus colaboradores o líneas celulares transformadas con plásmidos que codifican genes esenciales para la replicación del vector vírico.

Las células huésped manipuladas pueden cultivarse en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar el gen de interés. Las células huésped pueden cultivarse en medio que contiene suero o medio sin suero. Las células huésped pueden cultivarse en un medio sin suero, sin proteína, sin componente animal que incluye, por ejemplo, un medio químicamente definido (por ejemplo, CD OptiCHO™ (Invitrogen, nº 12681)). El medio de cultivo celular puede complementarse, si se desea, con complementos conocidos para aquellos expertos tales como, por ejemplo, uno o más aminoácidos tales L-glutamina (por ejemplo, 2% v/v de L-glutamina 200 mM (Invitrogen, nº 25031)). Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para la

expresión, y serán evidentes para aquellos expertos en la materia y en las referencias citadas en el presente documento que incluyen, por ejemplo, ANIMAL CELL TECHNOLOGY, Rhiel y col., eds., (Kluwer Academic Publishers 1999), Chaubard y col., Genetic Eng. News 20(18) (2000), Hu y col., ASM News 59:65-68 (1993), Hu y col., Biotechnol. Prog. 1:209-215 (1985), Martin y col., Biotechnol. (1987), Freshney, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE, 4ª ed., (Wiley, 2000), Mather, INTRODUCTION TO CELL AND TISSUE CULTURE: THEORY AND TECHNIQUE (Plenum Press, 1998), Freshney, CULTURE OF IMMORTALIZED CELLS, 3ª ed., (John Wiley & Sons, 1996), CELL CULTURE: ESSENTIAL TECHNIQUE, Doyle y col., eds. (John Wiley & Sons 1998), y GENERAL TECHNIQUES OF CELL CULTURE, Harrison y col., eds., (Cambridge Univ. Press 1997).

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes pueden usarse sistemas de expresión estables. Por ejemplo, líneas celulares que expresan establemente un polipéptido de la invención pueden transducirse con vectores de expresión que comprenden orígenes de replicación víricos y/o elementos de expresión endógenos y un gen del marcador de selección. Tras la introducción del vector puede permitirse que las células en la línea celular se cultiven durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a medios selectivos. El fin del marcador de selección es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Por ejemplo, grupos resistentes de células establemente transformadas pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula. Los medios sin suero están fácilmente disponibles (por ejemplo, JRH Biosciences, SAFC Biosciences, Sigma-Aldrich Corporation, web universal en sigmaaldrich.com). Pueden preferirse medios sin suero o medio acondicionado (por ejemplo, medio de crecimiento previamente recogido de cultivos celulares sin transfectar o sin tratamiento previo) para la producción de proteínas o bancos de células en algunos casos.

La invención incluye células inmortalizadas o líneas celulares que comprenden uno o más polipéptidos (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión diméricas o monoméricas y polipéptidos multiméricos), conjugados, ácidos nucleicos o vectores de la invención.

Células huésped transformadas con un vector de expresión y/o polinucleótido se cultivan opcionalmente en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada de cultivo celular. El polipéptido o fragmento del mismo producido por una célula recombinante tal puede secretarse, unirse a membrana o estar contenido intracelularmente, dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Vectores de expresión que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos maduros de la invención pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de los polipéptidos maduros mediante una membrana celular procariota o eucariota. Tales secuencias señal se incorporan normalmente en el vector de forma que la secuencia señal se expresa en el extremo N del polipéptido de la invención. Los principios relacionados con tales secuencias señal se tratan en otra parte en el presente documento.

Producción y recuperación de polipéptidos

Tras la transducción de una cepa huésped adecuada y crecimiento de la cepa huésped a una densidad de células apropiada, el promotor seleccionado se induce por medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de la temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Las células se recogen normalmente por centrifugación, se rompen por medio físico o químico y el extracto bruto resultante se retiene para la posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier procedimiento conveniente, que incluye ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisado de células, u otros procedimientos que son bien conocidos para aquellos expertos en la materia.

Como se observa, muchas referencias están disponibles para el cultivo y la producción de muchas células, que incluyen células de origen bacteriano, de planta, animal (especialmente de mamífero) y arqueobacteriano. Véanse por ejemplo, Sambrook, Ausubel y Berger (todos arriba), además de Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York, y las referencias citadas en su interior; Doyle y Griffiths (1997) Mammalian Cell Culture: Essential Techniques, John Wiley and Sons, NY; Humason (1979) Animal Tissue Techniques, cuarta edición W.H. Freeman y Company; y Ricciardelli, y col., (1989) In vitro Cell Dev. Biol. 25:1016-1024. Para cultivo y regeneración de células de planta, Payne y col. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Plant Molecular Biology (1993) R. R. D. Croy, Ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6. Medios de cultivo celular en general se exponen en Atlas y Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla. Información adicional para el cultivo celular se encuentra en bibliografía comercial disponible tal como the Life Science Research Cell Culture Catalogue (1998) de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo.) ("Sigma-LSRCCC") y, por ejemplo, the Plant Culture Catalogue y suplemento (1997), también de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo.) ("Sigma-PCCS").

Los polipéptidos de la invención pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes por distintos procedimientos muy conocidos en la técnica que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando cualquiera de los sistemas

de marcado anotados en el presente documento), cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. Las etapas de replegamiento de proteínas pueden usarse, según se desea, en completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse en las etapas de purificación finales. Además de las referencias observadas arriba, una variedad de procedimientos de purificación son muy conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, aquellos expuestos en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; y Bollag y col. (1996) *Protein Methods*, 2ª edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Handbook* Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris and Angal *Protein Purification Principles: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Approach (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ.

Un experto entendería que las proteínas de fusión de la invención (por ejemplo, proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante) puede prepararse mediante una variedad de procedimientos descritos en el presente documento que incluyen, por ejemplo, aquellos expuestos en el Ejemplo 1 para preparar LEA29Y-Ig. Por ejemplo, en lugar del ácido nucleico que codifica LEA29Y, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, polipéptido D3-54) puede clonarse en el vector de fusión de Fc de IgG2 para producir un vector que codifica la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, D3-54-IgG2), células CHO-K1 estables que expresan tal proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante pueden prepararse transfectando tales células con el vector que codifica la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante y la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante resultante (por ejemplo, D3-54-IgG2) puede expresarse (normalmente en forma dimérica) y purificarse como se describe en el Ejemplo 1.

Sistemas de expresión *in vitro*

También pueden emplearse sistemas de transcripción/traducción sin células para producir polipéptidos recombinantes de la invención o fragmentos de los mismos usando ADN y/o ARN de la presente invención o fragmentos de los mismos. Varios sistemas tales están comercialmente disponibles. Una guía general para los protocolos de transcripción y traducción *in vitro* se encuentra en Tymms (1995) *IN VITRO TRANSCRIPTION AND TRANSLATION PROTOCOLS: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, volumen 37, Garland Publishing, Nueva York.

Procedimientos

Los polipéptidos (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión diméricas y monoméricas y polipéptidos multiméricos), conjugados, composiciones, ácidos nucleicos, vectores y células de la invención presentan una variedad de propiedades y características y se cree que son útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, en procedimientos profilácticos o terapéuticos para tratar una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones del sistema inmunitario en los que la modulación o regulación del sistema inmunitario y respuestas del sistema inmunitario pueden ser de beneficio. Por ejemplo, polipéptidos, conjugados, composiciones, ácidos nucleicos, vectores y células de la invención que tienen una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 o un ECD de cualquiera de ellos o ambos y/o una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria se cree que son útiles en procedimientos profilácticos y/o terapéuticos para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto, procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula u órgano de un donante por un receptor y otros procedimientos descritos en otra parte en el presente documento. Se espera que algunos de tales polipéptidos, conjugados, composiciones, ácidos nucleicos, vectores y células de la invención sean útiles en procedimientos para el procedimiento de modular o inhibir la interacción de linfocitos T que expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7.

En un aspecto, los procedimientos terapéuticos o profilácticos desvelados en el presente documento implican administrar a un sujeto una cantidad eficaz de al menos un polipéptido tal (incluyendo, por ejemplo, proteína de fusión, multímero, etc.), conjugado, composición, ácido nucleico, vector y/o célula para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria. En un contexto terapéutico, el sujeto es normalmente uno aquejado de una enfermedad, trastorno o afección del sistema inmunitario, y la administración se realiza para prevenir la posterior progresión de la enfermedad, trastorno o afección. Por ejemplo, la administración de una molécula de la invención a un sujeto que padece una enfermedad del sistema inmunitario (por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria) puede producir supresión o inhibición de tal ataque del sistema inmunitario o respuestas biológicas asociadas al mismo. Suprimiendo este ataque del sistema inmunitario sobre tejidos del cuerpo sano, los síntomas físicos resultantes (por ejemplo, dolor, inflamación de articulaciones, hinchazón de articulaciones o dolor con la palpación) resultantes de o asociados a tal ataque sobre tejidos sanos pueden disminuirse o aliviarse, y la lesión biológica y física resultante de o asociada al ataque del sistema inmunitario puede disminuirse, retardarse o detenerse.

En un contexto profiláctico, el sujeto puede ser uno aquejado de, susceptible a o que se cree que presenta una enfermedad, trastorno o afección del sistema inmunitario, y la administración se realiza normalmente para prevenir la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, inhibir o aliviar síntomas, signos o respuestas biológicas asociadas al mismo, prevenir la lesión corporal potencialmente resultante del mismo, y/o mantener o mejorar el funcionamiento físico del sujeto.

En el presente documento se desvela un procedimiento de modulación de la interacción de linfocitos T que expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7, procedimiento que comprende poner en contacto células positivas para B7 con al menos uno de los siguientes en una cantidad eficaz para modular la interacción de células positivas para B7 con linfocitos T positivos para CD28 y/o linfocitos T positivos para CTLA-4: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende dos cualesquiera de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cuatro cualesquiera de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado y/o vector de la invención; y/o (7) composición de la invención, en el que la interacción de células positivas para B7 con linfocitos T positivos para CD28 y/o linfocitos T positivos para CTLA-4 se modula. Normalmente, el efecto modulador es un efecto inhibidor de forma que se inhibe la interacción de células positivas para B7 con linfocitos T positivos para CD28 y/o linfocitos T positivos para CTLA-4. En algunos casos, las células positivas para B7 son células presentadoras de antígeno (APC). En algunos de tales procedimientos se inhibe la interacción de células positivas para B7-2 (por ejemplo, APC que expresan B7-2 (CD86)) con linfocitos T positivos para CD28. En algunos de tales procedimientos se inhibe la interacción de células positivas para B7-1 (por ejemplo, APC que expresan B7-1 (CD80)) con linfocitos T positivos para CD28.

En el presente documento se desvela un procedimiento para inhibir la interacción de linfocitos T positivos para CD28 y/o linfocitos T positivos para CTLA-4 con células positivas para B7, procedimiento que comprende poner en contacto células positivas para B7 (por ejemplo, células positivas para B7-1 y/o células positivas para B7-2) con al menos una de las siguientes moléculas o componentes de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la interacción de linfocitos T positivos para CD28 y/o linfocitos T positivos para CTLA-4 con células positivas para B7: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende dos cualesquiera de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cuatro cualesquiera de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado y/o vector de la invención; y/o (7) composición de la invención, en el que se inhibe la interacción de linfocitos T positivos para CD28 y/o linfocitos T positivos para CTLA-4 con células positivas para B7. En algunos casos, las células positivas para B7 son APC. En algunos casos se inhibe la interacción de linfocitos T positivos para CD28 con células positivas para hB7-1 y/o células positivas para hB7-2. En algunos de tales procedimientos, la inhibición de la interacción de linfocitos T positivos para CD28 con células positivas para hB7-1 y/o células positivas para hB7-2 produce la supresión o inhibición de uno o más de los siguientes: activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de diversos marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, hinchazón de articulaciones o dolor con la palpación, nivel en suero de proteína reactiva C, producción de anticuerpos anti-colágeno y/o respuesta(s) de anticuerpos dependiente(s) de linfocitos T.

En algunos de tales procedimientos, al menos una de tal molécula o componente de la invención se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la interacción de linfocitos T positivos para CD28 endógeno con células positivas para B7-1 endógeno y/o células positivas para B7-2 en el sujeto. En algunos de tales procedimientos se inhibe la interacción de linfocitos T positivos para CD28 endógeno con células positivas para B7 endógeno que expresan B7-2 (CD86) o B7-1 (CD80). En algunos casos, las células positivas para B7 son APC que expresan B7-2 o B7-1, y se inhibe la interacción de B7-2 o B7-1 con linfocitos T positivos para CD28. En algunos casos se inhibe la interacción de tanto B7-2 como B7-1 expresados sobre APC con linfocitos T positivos para CD28.

En el presente documento se desvela un procedimiento de supresión de una respuesta inmunitaria *in vitro* o *in vivo*. El procedimiento comprende poner en contacto células positivas para B7 con al menos una de las siguientes moléculas o componentes de la invención en cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunitaria: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende dos cualesquiera de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cuatro cualesquiera de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado y/o vector de la invención; y/o (7) composición de la invención, suprimiéndose así una respuesta inmunitaria. Una o más respuestas inmunitarias pueden suprimirse, que incluyen, por ejemplo, respuesta de linfocitos T, proliferación o activación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas, inflamación, hinchazón de articulaciones o dolor con la palpación, nivel en suero de proteína reactiva C, producción de anticuerpos anti-colágeno y/o respuesta(s) de anticuerpos dependiente(s) de linfocitos T. En tales procedimientos que comprenden poner en contacto una célula positiva para B7 con un polipéptido de la invención, el polipéptido se une a B7-1 (por ejemplo, B7-1 humano) expresado sobre células

positivas para B7, y/o se une a B7-2 (por ejemplo, B7-2 humano) expresado sobre células positivas para B7. En algunos casos, las células positivas para B7 son APC. En algunos casos, una respuesta inmunitaria es suprimida *in vitro*, tal como en, por ejemplo, un ensayo *in vitro* que incluye aquellos descritos en detalle en otra parte en el presente documento (véanse, por ejemplo, los ejemplos más adelante). En algunos casos, una respuesta inmunitaria es suprimida *in vivo* en un sujeto al que se administra una cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunitaria tal como, por ejemplo, en los procedimientos de tratamiento terapéutico o profiláctico (por ejemplo, procedimiento para tratar enfermedad reumática tal como artritis reumatoide, u otra enfermedad autoinmunitaria) tratados en detalle en otra parte en el presente documento.

En el presente documento se desvela un procedimiento de supresión de una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, mamífero, tal como un ser humano). El procedimiento comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo al menos una de las siguientes moléculas o componentes de la invención en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz (por ejemplo, dosis terapéutica o profilácticamente eficaz) que suprime una respuesta inmunitaria en el sujeto: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende dos cualesquiera de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cuatro cualesquiera de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado y/o vector de la invención; y/o (7) composición de la invención, suprimiéndose así una respuesta inmunitaria en el sujeto.

En el presente documento se desvela un procedimiento para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario modulado por la interacción de linfocitos T endógenos con células endógenas que expresan CD80 y/o CD86. El procedimiento comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende dos cualesquiera de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cuatro cualesquiera de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado y/o vector de la invención; y/o (7) composición de la invención, tratándose así la enfermedad o trastorno del sistema inmunitario en el sujeto. Si el sujeto es un ser humano, CD80 es CD80 humano, CD86 es CD86 humano y CD28 es CD28 humano. En algunos de tales procedimientos se inhibe la interacción entre linfocitos T endógenos que expresan CD28 y células endógenas que expresan CD86 y/o células endógenas que expresan CD80.

Se cree que una variedad de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario, que incluyen enfermedad o trastorno reumático o del sistema autoinmunitario, pueden ser eficazmente tratadas usando una o más de las moléculas desveladas en el presente documento tal como, por ejemplo, un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de SEC ID N°: 1-73 tal como, por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante de D3-54 (SEC ID N°: 36), D3-69 (SEC ID N°: 50) o D3-27 (SEC ID N°: 24)), o una proteína de fusión del mismo (por ejemplo, D3-54-IgG2 (SEC ID N°: 197 ó 211), D3-69-IgG2 (SEC ID N°: 199 ó 213), D3-29-IgG2 (SEC ID N°: 79 ó 210)). La enfermedad o trastorno del sistema inmunitario puede ser o implicar, por ejemplo, pero no se limita a, enfermedad de Addison, alergia, alopecia areata, Alzheimer, vasculitis asociada a anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA), espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido (síndrome de Hughes), artritis, asma, aterosclerosis, placa aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, lupus, AR, EM, enfermedad de Graves, etc.), anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, miocarditis autoinmune, ooforitis autoinmune, orquitis autoinmune, azoospermia, enfermedad de Behcet, enfermedad de Berger, penfigoide ampuloso, cardiomiopatía, enfermedad cardiovascular, celiaquía/enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune (SFCDI), polineuritis idiopática crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), polineuropatía recurrente crónica (síndrome de Guillain-Barré), síndrome de Churg-Strauss (SCS), penfigoide cicatricial, enfermedad por aglutininas frías (EAF), EPOC, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, dermatitis, herpetiforme, dermatomiositis, diabetes, lupus discoide, eccema, epidermolísis ampulosa adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evan, exoftalmía, fibromialgia, síndrome de Goodpasture, enfermedad o trastorno relacionado con injerto, enfermedad de Grave, EIFH, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, enfermedad o trastorno inmunoproliferativo (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), enfermedad pulmonar intersticial, diabetes juvenil, artritis juvenil, artritis idiopática juvenil (AIJ), enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, líquen plano, lupus, nefritis por lupus, hipofisitis linfocítica, enfermedad de Ménière, síndrome de Miller Fish/encefalomielloradiculopatía diseminada aguda, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple (EM), reumatismo muscular, encefalomielitis miálgica (ME), miastenia grave, inflamación ocular, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares (síndrome de Whitaker), polimialgia reumática, polimiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria/colangiopatía autoinmune,

psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter/artritis reactiva, reestenosis, fiebre reumática, enfermedad reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, esclerodermia, síndrome de Sjörge, rechazo de trasplante de órgano sólido (riñón, corazón, hígado, pulmón, etc.), síndrome de Stiff-Man, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia sistémica, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, tiroiditis, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo, granulomatosis de Wegener, y prevenir o suprimir una respuesta inmunitaria asociada a rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de donante por un sujeto receptor. Enfermedades o trastornos relacionados con injerto incluyen enfermedad de injerto frente a huésped (EIFH) tal como trasplante asociado a médula ósea, y trastornos inmunitarios resultantes de o asociados a rechazo de trasplante de injerto de órgano, tejido o célula (por ejemplo, aloinjertos o xenoinjertos de tejidos o células) que incluyen, por ejemplo, injertos de piel, músculo, neuronas, islotes, órganos, células parenquimatosas del hígado, etc. Con respecto a un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano sólido de donante en un sujeto receptor, se cree que tales moléculas de la invención desveladas en el presente documento (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante) pueden ser eficaces en prevenir rechazo agudo de tal trasplante en el receptor y/o para terapia de mantenimiento a largo plazo para prevenir rechazo de tal trasplante en el receptor (por ejemplo, inhibir el rechazo de trasplante de células de islote productoras de insulina de un donante en el receptor sujeto que padece diabetes).

La invención incluye cualquier polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante tal de la invención para su uso en suprimir una respuesta inmunitaria asociada a al menos una de las enfermedades o trastornos del sistema inmunitario anteriores. También se proporciona el uso de cualquier polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante tal de la invención en la fabricación de un medicamento para suprimir una respuesta inmunitaria con al menos una de las enfermedades o trastornos del sistema inmunitario anteriores.

Una cantidad eficaz de una molécula de la divulgación tal como, por ejemplo, un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, D3-54, D3-69, D3-29, D3-56, D3-75) o una proteína de fusión de Ig que comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, D3-54-IgG2, D3-69-IgG2, D3-29-IgG2, D3-56-IgG2, D3-75-IgG2, respectivamente) para suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto o tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario modulada por interacción de linfocitos T endógenos con células endógenas que expresan CD80 y/o CD86 en un sujeto en los procedimientos descritos en el presente documento puede comprender de aproximadamente 0,0001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto a aproximadamente 200 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto o, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso del sujeto a al menos aproximadamente 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50 ó 75 mg/kg de peso corporal del sujeto. Una o más respuestas inmunitarias pueden ser suprimidas en el sujeto, que incluye, por ejemplo, respuesta de linfocitos T, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2, etc.), inducción de diversos marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2, etc.), síntesis o producción de moléculas inflamatorias, inflamación, hinchazón de articulaciones, dolor con la palpación de las articulaciones, dolor, rigidez, niveles en suero de proteína reactiva C, producción de anticuerpos anti-colágeno y/o respuesta(s) de anticuerpos dependiente(s) de linfocitos T). Una cantidad eficaz de una molécula o componente de la invención para suprimir una respuesta inmunitaria puede ser una cantidad que suprime una respuesta inmunitaria o un síntoma o signo del mismo por una cantidad detectable o medible. La respuesta inmunitaria puede suprimirse parcialmente o completamente. Una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario puede ser una cantidad que mitiga, reduce o alivia al menos un síntoma o respuesta biológica, o efecto asociado a la enfermedad o trastorno, previene la progresión de la enfermedad o trastorno, o mejora el funcionamiento físico del sujeto.

Una cantidad eficaz de una molécula o componente de la invención para modular o inhibir la interacción de linfocitos T que expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7 puede ser una cantidad que modula o inhibe la unión entre células positivas para B7 y linfocitos T positivos para CD28 y/o positivos para CTLA-4, respectivamente. Tal(es) interacción (interacciones) de unión puede(n) ser parcialmente o completamente moduladas o inhibidas.

En algunos de tales procedimientos, un dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes de la invención se administra al sujeto en una cantidad (o dosis) terapéutica o profilácticamente eficaz suficiente para suprimir una respuesta inmunitaria, tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario modulado por la interacción de linfocitos T con células que expresan B7, o modular o inhibir la interacción de linfocitos T que expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7. El dímero de proteínas de fusión administrado es normalmente un dímero de proteínas de fusión de Ig soluble. En algunos de tales procedimientos, la cantidad o dosis eficaz del dímero de proteínas de fusión de la invención comprende de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto a aproximadamente 200 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto (tal como, por ejemplo, un ser humano) o de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal del sujeto. Por ejemplo, la cantidad o dosis eficaz del dímero de proteínas de fusión puede comprender de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del sujeto a al menos aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 ó 300 mg/kg de peso corporal del sujeto (tal como, por ejemplo, ser humano, que incluye un humano adulto). En

algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es de aproximadamente 0,001 miligramos (mg) a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo (kg) de peso corporal del sujeto que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto (por ejemplo, ser humano), de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del sujeto, o de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso del sujeto; por ejemplo, al sujeto se administran aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg o 100 mg/kg de peso corporal del sujeto (por ejemplo, paciente humano adulto). En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz del dímero de proteínas de fusión es de aproximadamente 2 a 10 mg/kg, aproximadamente 3 a 10 mg/kg, aproximadamente 3 a 5 mg/kg, aproximadamente 5 a 10 mg/kg, 0,1 a 5 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 3 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 2,0 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 2,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 1 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 0,5 mg/kg aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg, aproximadamente 0,3 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 a 0,5 mg/kg de peso de un sujeto. En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es inferior a aproximadamente 500 mg para un sujeto que pesa menos de 60 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 100 mg, 75 mg, 50 mg, 25 mg, 12,5 mg o 10 mg), menos de aproximadamente 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 150 mg, 100 mg, 75 mg, 37,5 mg o 20 mg), o menos de aproximadamente 1000 mg para un sujeto que pesa más de 100 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 500 mg, 100 mg, 50 mg, 25 mg o 10 mg).

En otro aspecto, en algunos de tales procedimientos una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención se administra al sujeto en una cantidad o dosis terapéutica o profilácticamente eficaz que es, por ejemplo, suficiente para suprimir una respuesta inmunitaria, tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario modulado por interacción de linfocitos T con células que expresan B7, o modular o inhibir la interacción de linfocitos T que expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7. La cantidad o dosis eficaz de la proteína de fusión, que es normalmente una proteína de fusión soluble, puede comprender de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal del sujeto (por ejemplo, ser humano). En un aspecto, la cantidad o dosis eficaz de la proteína de fusión comprende de aproximadamente 0,001 mg/kg a al menos aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 ó 300 mg/kg de peso corporal del sujeto. En otro aspecto, la cantidad o dosis eficaz es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso del sujeto. Dosis o cantidades a modo de ejemplo incluyen aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal del sujeto (por ejemplo, ser humano adulto). En otro aspecto, la cantidad o dosis eficaz de la proteína de fusión es de aproximadamente 2 a 10 mg/kg, aproximadamente 3 a 10 mg/kg, aproximadamente 3 a 5 mg/kg, aproximadamente 5 a 10 mg/kg, 0,1 a 5 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 3 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 2,0 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 2,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 1 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 0,5 mg/kg aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg, aproximadamente 0,3 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 a 0,5 mg/kg de peso de un sujeto. En algunos aspectos, la cantidad o dosis eficaz es inferior a aproximadamente 500 mg para un sujeto que pesa menos de 60 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 100 mg, 75 mg, 50 mg, 25 mg, 12,5 mg o 10 mg), menos de aproximadamente 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 150 mg, 100 mg, 75 mg, 37,5 mg o 20 mg), o menos de aproximadamente 1000 mg para un sujeto que pesa más de 100 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 500 mg, 100 mg, 50 mg, 25 mg o 10 mg).

Puede determinarse la cantidad o dosis eficaz de un ácido nucleico, vector, composición y/o célula de la invención suficiente para suprimir similarmente una respuesta inmunitaria o modular, tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario modulado por interacción de linfocitos T con células que expresan B7, o modular o inhibir la interacción de linfocitos T que expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7. Por ejemplo, si un vector que codifica un dímero de proteínas de fusión tal de la invención va a administrarse al sujeto, un experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de vector a administrar de forma que igualmente se produzca una

cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz deseada del dímero de proteínas de fusión en el sujeto.

La divulgación de dímeros de proteínas de fusión a modo de ejemplo en el presente documento incluye cualquiera de aquellos descritos en detalle anteriormente y en el presente documento que incluye, por ejemplo, un dímero de proteínas de fusión que comprende dos monómeros de proteínas de fusión idénticos, en el que cada monómero de proteínas de fusión comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2, IgG1, IgG4 o polipéptido mutante de Fc de Ig que reduce la función efectora). Un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo es uno que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73. Un dímero de proteínas de fusión a modo de ejemplo es uno que comprende dos monómeros de proteínas de fusión, en el que cada monómero de proteína de fusión comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222. Normalmente, las dos proteínas de fusión monoméricas en una proteína de fusión dimérica están ligadas covalentemente juntas mediante al menos un enlace disulfuro formado entre residuo(s) de cisteína presentes en cada monómero.

En cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la molécula o componente de la invención (por ejemplo, polipéptido (incluyendo, por ejemplo, proteína de fusión dimérica o monomérica o múltiplo de polipéptidos), conjugado, ácido nucleico, vector, composición y/o célula de la invención) puede administrarse al sujeto como una composición. La composición normalmente comprende al menos uno de tal molécula o componente y un excipiente, vehículo o diluyente. La composición puede comprender una composición farmacéutica que comprende al menos uno de tal molécula o componente y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS). El pH de las composiciones de la invención normalmente oscila de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 9,0, que incluye, por ejemplo, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, normalmente de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0. En un aspecto, el pH de las composiciones de la invención normalmente oscila de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,7, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 8,7, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 7,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 6,3 a aproximadamente pH 6,8, de aproximadamente pH 6,4 a aproximadamente pH 6,8, y aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,4. En un aspecto, una composición que comprende al menos uno de tal molécula o componente de la invención tal como, por ejemplo, una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, tiene un pH de pH 5,5, pH 6,0, pH 6,1, pH 6,2, pH 6,3, pH 6,4, pH 6,5, pH 6,6, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4, pH 7,5, pH 7,6, pH 7,7, pH 7,8, pH 7,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9, pH 9,0, pH 9,1, pH 9,2, pH 9,3, pH 9,4, pH 9,5, pH 9,6, pH 9,7, pH 9,8, pH 9,9 o pH 10,0. Algunas composiciones de la invención incluyen una o más sales (por ejemplo, cloruro sódico, fosfato de sodio, cloruro de calcio y similares), uno o más tampones (por ejemplo, HEPES, citrato de sodio, fosfato de sodio (por ejemplo, Na₂HPO₄/Na₃PO₄), succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato, tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y similares), uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sacáridos o azúcares (por ejemplo, sacarosa, manosa, maltosa, trehalosa, dextrosa y similares) y/o uno, dos, tres, cuatro o más polialcoholes o alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, sorbitol, glicol, glicerol, arabitol, eritritol, xilitol, ribitol, lactitol y similares). En la composición pueden incluirse uno, dos, tres, cuatro, cinco o más monosacáridos, disacáridos y/o polisacáridos. La composición de la invención puede comprender cualquier concentración de tal molécula o componente eficaz para suprimir una respuesta inmunitaria cuando se administra al sujeto. Por ejemplo, en algunos de tales procedimientos (incluyendo, por ejemplo, procedimientos en los que se desea inmunosupresión tal como, pero no se limita a, por ejemplo, tratamiento de artritis reumatoide o trastornos inmunitarios similares, o para inhibir rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de un donante por un sujeto receptor), una composición farmacéutica que comprende un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable y un dímero de proteínas de fusión de la invención se administra al sujeto (por ejemplo, parentalmente, subcutáneamente, intravenosamente, intramuscularmente, etc.), en el que la composición farmacéutica comprende un dímero de proteínas de fusión de la invención a una concentración de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 60 mg/ml,

aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, o 100 mg/ml. Se contemplan otras concentraciones. En algunos procedimientos descritos en el presente documento, que incluyen algunos procedimientos terapéuticos o profilácticos, un volumen de cualquiera de tal composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende una proteína de fusión de la invención en un intervalo de aproximadamente 0,01 mililitros (ml) a aproximadamente 10 ml, aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 5 ml, aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml, aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 2 ml, aproximadamente 1 ml a aproximadamente 2 ml, que incluye, por ejemplo, un volumen de 0,01 ml, 0,025 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, 1 ml, 2 ml, 3ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml, etc., se administra a un sujeto mediante una única inyección i.v., s.c., i.m. o i.p.. Más detalles de composiciones a modo de ejemplo de la invención se tratan en otra parte en el presente documento.

La cantidad o dosis eficaz de una molécula de la invención que se administra a un sujeto particular puede variarse dependiendo de, por ejemplo, la enfermedad, trastorno o afección que está tratándose, la potencia de la molécula de CTLA-4 mutante particular de la invención (es decir, su eficacia) (por ejemplo, un dímero de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención) a administrar, el modo de administración de la molécula y la capacidad individual del sujeto para tolerar una cantidad específica de la molécula particular. Por ejemplo, en un procedimiento para suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene artritis reumatoide (AR) o un procedimiento para tratar AR, la cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación (por ejemplo, D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, D3-75-IgG2, etc.) a administrar al sujeto puede determinarse basándose en una variedad de factores que incluyen la potencia del dímero de CTLA-4-Ig mutante, el modo de administración del dímero y/o la gravedad de los síntomas o signos de artritis reumatoide del sujeto. En un aspecto, una cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante particular de la invención puede determinarse comparando la potencia de tal dímero de CTLA-4-Ig mutante con la del dímero Orencia®. Dosis del dímero Orencia® eficaces para tratar artritis reumatoide y trastornos relacionados se conocen en la técnica. Por ejemplo, el dímero Orencia® se administra normalmente intravenosamente a un ser humano que padece artritis reumatoide en una dosis de aproximadamente 10 mg de Orencia® por kilogramo (kg) de peso corporal del ser humano. Un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la invención que es aproximadamente "X" veces más potente que Orencia® puede administrarse (por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, o en otro modo descrito en el presente documento) a un ser humano que padece artritis reumatoide en una dosis que es aproximadamente "X" veces inferior a la dosis del dímero Orencia® para lograr un efecto terapéutico (por ejemplo, suprimir una respuesta inmunitaria) que es aproximadamente equivalente a la del dímero Orencia®. Si se desea un mayor efecto terapéutico, una cantidad o dosis proporcionalmente elevada del dímero de CTLA-4-Ig mutante puede determinarse fácilmente y administrarse al ser humano.

En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la molécula o componente de la invención (por ejemplo, un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, proteína de fusión dimerica o monomérica o multímero de polipéptidos), conjugado, ácido nucleico, vector, composición y/o célula de la invención) puede administrarse parentalmente, subcutáneamente o intravenosamente, o como se describe en otra parte en el presente documento. La molécula o componente de la invención puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz una, dos, tres o cuatro veces por mes, dos veces por semana, bisemanalmente (cada dos semanas) o bimensualmente (cada dos meses). La administración puede durar durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 meses o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más años, que incluye durante la vida del sujeto).

Cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento puede comprender además administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente o compuesto terapéutico o inmunosupresor adicional. Por tanto, en el presente documento se desvela un procedimiento de supresión de una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo (1) una cantidad eficaz de al menos un primer agente inmunosupresor, en el que cada uno de tal primer agente inmunosupresor es un polipéptido, ácido nucleico, vector, composición y/o célula de la invención, y (2) una cantidad eficaz de al menos un segundo agente inmunosupresor, suprimiéndose una respuesta inmunitaria en el sujeto.

Una variedad de agentes terapéuticos o inmunosupresores adicionales (que no son moléculas de la invención) puede usarse o administrarse conjuntamente con una molécula de la invención (por ejemplo, polipéptido, ácido nucleico, vector, composición y/o célula de la invención). Tales agentes incluyen, por ejemplo, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FAME) (tal como, por ejemplo, metotrexato (MTX), antagonista de citocinas (por ejemplo, antagonista de IL-2 o IL-6), compuesto esteroideo (por ejemplo, corticosteroide, glucocosteroide, por ejemplo, prednisona o metilprednisona), compuesto no esteroideo, salicilato de sodio o magnesio, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, acetaminofeno, anticuerpo, agente biológico que bloquea la síntesis de una producción de citocina antiinflamatoria, Raptiva® efalizumab, agente o compuesto antiinflamatorio, y fármaco

antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Tal agente terapéutico o inmunosupresor adicional puede administrarse al sujeto en una composición farmacéutica que comprende el agente adicional y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad o dosis eficaz del agente a administrar dependerá del agente específico. Algunos de tales agentes se usan actualmente en terapias inmunosupresoras y dosificaciones apropiadas pueden determinarse basándose en la enfermedad, trastorno o afección que está tratándose y la capacidad del sujeto para tolerar cantidades o dosis específicas, y la eficacia inmunosupresora del agente. Se conocen dosis a modo de ejemplo para agentes inmunosupresores descritos anteriormente que no son moléculas de la invención. El agente inmunosupresor adicional que no es una molécula de la invención puede administrarse simultáneamente con o antes o después de la administración de la molécula de la invención (por ejemplo, proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante).

Una pauta de tratamiento que incluye, por ejemplo, dosis, programa de administración, procedimiento de administración (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección subcutánea, etc.) y composición farmacéutica que comprende al menos uno de tal molécula o componente de la invención puede variar dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección que va a tratarse. Uno o más de tales moléculas o componentes de la invención puede administrarse a un sujeto; cada uno de tal molécula o componente no necesita administrarse en la misma formulación farmacéutica, por los mismos procedimientos de administración, en la misma cantidad o por el mismo programa de frecuencia de dosificación.

En algunos de tales procedimientos, por ejemplo, aproximadamente 1 ml de una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y una concentración de un dímero de proteínas de fusión de la invención de aproximadamente 50 mg/ml se administra subcutáneamente a un sujeto (por ejemplo, ser humano adulto) en necesidad de inmunosupresión (por ejemplo, un sujeto que padece artritis reumatoide). Tal dosis inicial es 50 mg de dímero de proteínas de fusión. Para un sujeto que tiene un peso corporal de 100 kg, esta dosis inicial se corresponde con 0,5 mg de dímero de proteínas de fusión por kg de peso corporal del sujeto. Una segunda de la misma cantidad se administra subcutáneamente una o dos semanas después de la primera dosis. Se administran más dosis subcutáneamente cada semana, bisemanalmente, o una vez por mes, o más o menos frecuentemente según sea necesario. Se cree que tales composiciones y formatos de administración son útiles, por ejemplo, para tratar un ser humano que padece artritis reumatoide u otro trastorno inmunitario en el que se desea inmunosupresión o para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de un donante humano por un receptor humano.

Procedimientos para tratar artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una de las enfermedades autoinmunitarias inflamatorias sistémicas más comunes y se estima que afecta al 1-2% de la población adulta. Véase, por ejemplo, Dipiro, J.T., Rheumatoid arthritis, en PHARMACOTHERAPY: A PATHOPHYSIOLOGIC APPROACH, 1671-1682 (Talbert, R.T. y col. eds., McGraw-Hill, Nueva York, 6ª ed. 2005). La enfermedad se caracteriza por hiperplasia de la membrana sinovial e infiltración de células inflamatorias, que incluyen linfocitos T activados. Los linfocitos T activados desempeñan una función crucial en la progresión de artritis reumatoide estimulando una variedad de tipos de células para producir citocinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6 y TNF-alfa, autoanticuerpos y metaloproteinasas de matriz (Hoffman, R.W., Front. Biosci. 6:1369-1378 (2001); Choy, E.K. y col., N. Engl. J. Med 344:907-916 (2001)). La fuerte contribución de los linfocitos T a la progresión de la artritis reumatoide hace que la activación de linfocitos T sea una diana lógica para intervención terapéutica. Se cree que tales moléculas inflamatorias producen la respuesta inflamatoria, lesión de tejido (por ejemplo, lesión articular) y dolor asociados a artritis reumatoide.

La co-estimulación de linfocitos T mediada por interacciones entre el receptor CD28 y el (los) ligando(s) CD80 y/o CD86 es esencial para la activación de la mayoría de los linfocitos T (Riley, J.L. y col., Blood 105:13-21 (2005)). Se ha mostrado que los agentes terapéuticos o profilácticos que antagonizan la ruta de co-estimulación de CD80/CD86 - CD28, tal como la proteína de fusión Orencia® (abatacept), que es una proteína de fusión hCTLA-4-Ig dimérica soluble, son clínicamente eficaces en el tratamiento de artritis reumatoide (Kremer, J.M. y col., Ann. Intern. Med. 144:865-876 (2006); Genovese, M.C. y col., N. Engl. J. Med. 353:1114-1123 (2005)). Se cree que abatacept ejerce una función inmunosupresora uniéndose a ligandos CD80 y/o CD86 sobre células presentadoras de antígeno cuando se administra a un sujeto (por ejemplo, ser humano adulto) *in vivo* en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz, previniéndose así la interacción de cualquiera de ellos o ambos de estos ligandos con el receptor CD28 sobre los linfocitos T.

Abatacept ha sido actualmente autorizado para tratar pacientes humanos adultos con AR de moderada a gravemente activa que habían tenido una respuesta inadecuada a uno o más FAME, tales como metotrexato o antagonistas de TNF. Abatacept se administra a un paciente adulto con AR a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal del sujeto por infusión intravenosa. Tras la primera dosis, la segunda y tercera dosis de 10 mg/kg de la proteína de fusión se administran al sujeto a las dos y cuatro semanas, respectivamente, después de la primera dosis. Las dosis posteriores se administran cada cuatro semanas (es decir, una vez por mes). La infusión intravenosa de abatacept se cree necesaria para administrar el alto nivel de dosis requerido para obtener eficacia deseable en terapia de artritis reumatoide.

Otras terapias actuales para artritis reumatoide incluyen la administración de agentes inmunosupresores no específicos tales como metotrexato y fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. Adicionalmente,

están autorizados agentes biológicos que eligen como diana citocinas pro-inflamatorias específicas tales como TNF- α (por ejemplo, Remicade® infliximab, Enbrel® entaercept, Humira® adalimumab) y IL-1 (por ejemplo, Kineret® anakinra). Sin embargo, muchas de estas terapias tienen efectos secundarios significativos – algunos de ellos son tóxicos - particularmente cuando se administran durante un largo periodo de tiempo.

5 A pesar de la disponibilidad de diversas terapias existe una significativa necesidad sin satisfacer para el tratamiento de AR. Por ejemplo, el 60% de los pacientes humanos con AR que han fracasado en el tratamiento con FAME
previo y el 80% de los pacientes humanos con AR que han fracasado en la terapia anti-TNF previa no alcanzaron
10 una puntuación ACR50 después del tratamiento con Orenzia durante 6 meses (Kremer J.M. y col., Ann. Intern. Med.
144:865-876 (2006); Genovese, M.C. y col., N. Engl. J. Med. 353:1114-11 (2005)). Los estudios de respuesta a dosis
usando la proteína de fusión abatacept y belatacept (LEA29Y-Ig) en el tratamiento de AR en adultos indicaron que la
eficacia era dependiente de la dosis y no se saturó a los mayores niveles de dosis probados (Kremer, J.M. y col., N.
Engl. J. Med. 349:1907-1915(2003); Moreland, L.W. y col., Arthrit. Rheum. 46:1470-1479 (2002)).

Se espera que una CTLA-4-Ig mutante dimérica soluble de la invención que tiene una mayor avidéz de unión por
15 hCD80 y/o hCD86 que abatacept pueda ejercer efectos inmunosupresores más potentes que abatacept cuando se
administra a un sujeto con AR. Una CTLA-4-Ig mutante tal se une a un número similar de ligandos CD80 y/o CD86 a
una menor concentración que abatacept.

Una CTLA-4-Ig mutante con una mayor avidéz de unión por CD80 o CD86 y constante de disociación más lenta de
CD80 o CD86, respectivamente, tiene un mayor tiempo de residencia sobre tal ligando. Se espera que este mayor
20 tiempo de residencia se asocie a mayor eficacia *in vivo*. Se cree que una CTLA-4-Ig mutante tal puede ser eficaz en
tratar terapéutica o profilácticamente un sujeto con AR a una dosis que es menor que la de abatacept. Es decir, se
cree que una CTLA-4-Ig mutante tal puede alcanzar un grado de eficacia equivalente al de abatacept cuando se
administra al sujeto con AR a una dosis que es inferior a las dosis de abatacept de 10 mg/kg de peso corporal del
sujeto. La invención proporciona proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes diméricas solubles de avidéces de unión
25 variadas por hCD80 y/o hCD86. Las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes diméricas solubles que tienen avidéces
de unión sustancialmente mayores por hCD86 que abatacept pueden un grado de eficacia equivalente al de
abatacept cuando se administran al sujeto con AR a una dosis que es sustancialmente inferior a la de abatacept. La
administración de una menor dosis de una CTLA-4-Ig mutante puede permitir usar un procedimiento de
administración más conveniente (por ejemplo, inyección subcutánea) que el que actualmente se usa para la
administración de abatacept (inyección intravenosa).

30 También se cree que una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble de la invención con una mayor potencia
inmunosupresora que la proteína de fusión abatacept o belatacept permitiría que se obtuviera un mayor nivel de
eficacia en el tratamiento de pacientes con AR. Se espera que una CTLA-4-Ig mutante más inmunosupresora pueda
aliviar síntomas asociados a AR e inhibir progresivamente los efectos físicos perjudiciales de AR más eficazmente
que abatacept. Una CTLA-4-Ig mutante tal puede formularse en un diluyente, excipiente o vehículo
35 farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS) a una concentración que oscila de 0,1 - 200 mg/ml. El tratamiento
de un sujeto con AR puede llevarse a cabo administrando al sujeto una cantidad (dosis) terapéutica o
profilácticamente eficaz de la CTLA-4-Ig mutante por inyección subcutánea o infusión intravenosa a una frecuencia
de dosificación apropiadamente determinada (por ejemplo, dosis inicial seguida de una dosis 2 a 4 veces por mes,
una dosis por mes o una dosis cada dos meses). La dosis dependería de la gravedad de la enfermedad del sujeto o
40 síntomas. Por ejemplo, puede administrarse una cantidad o dosis de una CTLA-4-Ig mutante de no más de
aproximadamente 10 mg/kg (incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,25 mg/kg, 1 mg/kg, 2
mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg o 9 mg/kg) de peso corporal del sujeto. Una CTLA-4-
Ig mutante más inmunosupresora puede permitir un programa de dosificación menos frecuente (por ejemplo, una
vez cada dos meses) que el programa de dosificación normalmente usado con abatacept. Alternativamente, una
45 cantidad o dosis de una CTLA-4-Ig mutante superior a aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto (por ejemplo,
de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente
25 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a
aproximadamente 75 mg/kg, etc., que incluye, por ejemplo, aproximadamente 15 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40
mg/kg, 50 mg/kg, 60 g/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg) puede administrarse a un sujeto con
50 AR si la condición de la enfermedad del sujeto y/o síntomas garantiza tal cantidad o dosis.

La cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la invención para tratar AR en un ser humano que
padece la misma puede determinarse basándose en diversos factores tales como la potencia del dímero de CTLA-4-
Ig mutante, el modo de administración del dímero y/o la gravedad de los síntomas del sujeto o signos de artritis
reumatoide. Por ejemplo, puede determinarse una cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la
55 invención comparando la potencia del dímero tal con la del dímero Orenzia® y determinando la cantidad o dosis del
dímero de CTLA-4-Ig mutante que daría el efecto inmunosupresor deseado en comparación con Orenzia® (por
ejemplo, un efecto mejorado o aproximadamente equivalente) basándose en la cantidad o dosis de Orenzia® que
normalmente se administraría a un sujeto humano que presenta síntomas o signos similares de AR.

En el presente documento se desvela un procedimiento para tratar artritis reumatoide en un sujeto en necesidad de
60 tal tratamiento, procedimiento que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión
CTLA-4-Ig mutante dimérica soluble de la invención por, por ejemplo, inyección intravenosa o subcutánea. La

cantidad o dosis eficaz puede comprender de aproximadamente 0,001 miligramos (mg) a aproximadamente 10 miligramos por kilogramo (kg) de peso corporal del sujeto que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg de peso corporal del paciente humano adulto se administra al sujeto. En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es de aproximadamente 2 a 10 mg/kg, aproximadamente 3 a 10 mg/kg, aproximadamente 3 a 5 mg/kg, aproximadamente 5 a 10 mg/kg, 0,1 a 5 mg/kg peso, aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 3 mg/kg peso, aproximadamente 0,05 a 2,0 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, aproximadamente 0,05 a 2,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 2,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,1 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 1 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,2 a 0,5 mg/kg aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg, aproximadamente 0,3 a 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,3 a 0,5 mg/kg de peso de un sujeto. En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es inferior a aproximadamente 500 mg para un sujeto que pesa menos de 60 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 100 mg, 75 mg, 50 mg, 25 mg o 12,5 mg), menos de aproximadamente 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 150 mg, 100 mg, 75 mg, 37,5 mg o 20 mg) o menos de a aproximadamente 1000 mg para un sujeto que pesa más de 100 kg (por ejemplo, menos de aproximadamente 500 mg, 100 mg, 50 mg, 25 mg o 10 mg). Tras la primera dosis, dosis equivalentes posteriores se administran a intervalos de 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14 ó 16 semanas. La posterior frecuencia de dosificación puede determinarse según se necesite.

Una fusión de CTLA-4-Ig mutante tal puede formularse con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica adecuada para administración a un sujeto (por ejemplo, mamífero, que incluye un ser humano). La concentración de la proteína de fusión en la composición puede oscilar de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml o de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 25 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, o aproximadamente 50 mg/ml. También se contemplan otras composiciones, que incluyen aquellas tratadas anteriormente y más adelante.

Se espera que tal tratamiento reduzca uno o más signos y/o síntomas asociados a artritis reumatoide tales como, por ejemplo, inflamación, dolor con la palpación de las articulaciones, hinchazón de articulaciones, dolor y rigidez, en el sujeto. Tal tratamiento puede reducir la progresión adicional de la enfermedad en el paciente. Por ejemplo, tal tratamiento puede reducir la progresión de lesión estructural en el paciente. Tal tratamiento puede mejorar el funcionamiento físico del sujeto.

Procedimientos para inhibir el rechazo de trasplante de tejido, célula, injerto u órgano

En el presente documento se desvela un procedimiento para inhibir el rechazo de, o suprimir una respuesta inmunitaria asociada a, un trasplante de tejido, célula, injerto de piel u órgano de un donante por un sujeto receptor, procedimiento que comprende administrar al sujeto receptor una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los siguientes: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende dos cualesquiera de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cuatro cualesquiera de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado y/o vector de la invención; y/o (7) una composición de la invención, inhibiéndose así el rechazo del trasplante de tejido, célula, injerto de piel u órgano por el sujeto receptor. El donante y receptor pueden ser la misma especie o especie diferente. El donante o receptor pueden ser un mamífero, tal como un ser humano, primate no humano (por ejemplo, mono, gorila), oveja, gato, perro, cerdo, vaca, caballo, etc. En algunos de tales procedimientos, el polipéptido, conjugado, vector y/o célula de la invención se administra al sujeto receptor antes de, simultáneamente con o después del trasplante de tejido, célula, injerto de piel u órgano. La cantidad eficaz normalmente comprende de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso del sujeto a aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunos de tales procedimientos, por ejemplo, la cantidad eficaz comprende de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto a al menos aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 ó 300 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto. En algunos de tales procedimientos, la cantidad eficaz comprende de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto a al menos aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 50 ó 75 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto. El polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector y/o célula de la invención puede administrarse al sujeto receptor

durante, antes de o inmediatamente después del trasplante. Alternativamente o adicionalmente, tal molécula de la invención puede administrarse una o más horas después del trasplante, al día siguiente del trasplante y/o diariamente después, o al menos una vez por semana, al menos una vez cada dos semanas o al menos una por mes después del trasplante, según sea necesario, durante hasta 12, 24 ó 36 o más meses, o más según se necesite. El trasplante de órgano puede implicar cualquier órgano tal como, por ejemplo, un riñón, hígado, corazón o pulmón.

La cantidad o dosis eficaz de una molécula de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes) que va a administrarse a un sujeto receptor del trasplante de órgano, tejido o célula de forma que se inhiba el rechazo de trasplante (o suprima una respuesta inmunitaria asociada a tal trasplante) se determina normalmente basándose en la potencia de tal molécula, modo de administración, el tipo de trasplante (por ejemplo, célula, tejido, órgano), la historia del sujeto y/o la gravedad de los síntomas del sujeto receptor del trasplante o signos de una respuesta(s) inmunitaria(s) sugerente(s) de rechazo de trasplante. Por ejemplo, una cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación (por ejemplo, dímero D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, D3-75-IgG2, etc.) puede determinarse comparando la potencia de tal dímero con la del dímero belatacept. Se conocen dosis eficaces de belatacept útiles para prevenir o suprimir una respuesta inmunitaria asociada a trasplante de riñón/renal. Por ejemplo, belatacept se administra por infusión intravenosa a un ser humano tras un trasplante de riñón en el ser humano de un donante de riñón en una cantidad o dosis de aproximadamente 5 mg o 10 mg por kilogramo peso corporal del ser humano por mes. Un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la invención que es aproximadamente "X" veces más potente que belatacept puede administrarse (por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, o en otro modo descrito en el presente documento) a un ser humano que ha tenido un trasplante de riñón en una cantidad o dosis que es aproximadamente "X" veces inferior a la dosis de belatacept para lograr un efecto terapéutico (por ejemplo, suprimir una respuesta inmunitaria) aproximadamente equivalente a la de belatacept. Si se desea un mayor efecto terapéutico puede determinarse y administrarse una cantidad proporcionalmente elevada o dosis del dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig de la invención.

En el presente documento se desvela un procedimiento para tratar rechazo de trasplante de tejido, célula u órgano (por ejemplo, rechazo de trasplante de órgano sólido (por ejemplo, riñón, hígado, pulmón, corazón, etc.)) en un sujeto que recibe tal tejido, célula u órgano de un donante, procedimiento que comprende administrar al receptor una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector y/o célula de la invención, inhibiéndose así el rechazo del trasplante de tejido, célula u órgano del donante por el sujeto receptor. El polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector y/o célula de la invención puede administrarse al sujeto antes de, simultáneamente con o después del trasplante de célula, tejido u órgano.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inhibir el rechazo de trasplante de células de islote de un donante en un sujeto receptor en necesidad del mismo, procedimiento que comprende administrar al sujeto una cantidad o dosis eficaz de una molécula de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante) antes de, simultáneamente con o después del trasplante de célula(s) de islote del páncreas de un donante en el sujeto. El sujeto (por ejemplo, ser humano) normalmente padece diabetes (por ejemplo, DMDI) y tal procedimiento es útil en el tratamiento de un sujeto diagnosticado con o que padece diabetes. Los procedimientos de trasplante de islotes se conocen en la técnica. Normalmente, los islotes se extirpan del páncreas de un donante de órganos muerto, se purifican y se procesan, y se implantan en un sujeto receptor que padece diabetes. Después del trasplante, las células beta en los islotes empiezan a producir y liberar insulina, reduciéndose así la necesidad de insulina del receptor.

En tales procedimientos de inhibición del rechazo de trasplante, la molécula de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante) puede formularse con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica adecuada para administración a un sujeto (por ejemplo, mamífero, que incluye un ser humano). Algunos de tales procedimientos comprenden administración de una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la invención que tiene una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml o aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 1 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 25 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, o aproximadamente 50 mg/ml. También se contemplan otras composiciones, que incluyen aquellas tratadas anteriormente y más adelante.

Procedimientos para inhibir una respuesta inmunitaria

En otro aspecto, la invención incluye el uso de un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, una proteína de fusión dimérica o monomérica o polipéptido multimérico), conjugado, ácido nucleico, vector o célula de la invención para la fabricación de un medicamento para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero (por ejemplo, ser

humano o primate no humano). Respuestas inmunitarias que pueden ser suprimidas incluyen, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citocinas, inducción de marcadores de activación, síntesis o producción de moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno, respuesta de Ab dependiente de linfocitos T.

- 5 La invención también incluye el uso de un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, una proteína de fusión dimérica o monomérica o polipéptido multimérico), conjugado, ácido nucleico, vector o célula de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario. La enfermedad o trastorno del sistema inmunitario puede ser uno que está mediado por interacción de linfocitos T con células positivas para CD80 y/o células positivas para CD86 en un mamífero. La enfermedad o trastorno del sistema inmunitario puede ser una enfermedad del sistema inmunitario o enfermedad tal como una enfermedad o trastorno reumático o una enfermedad autoinmunitaria o trastorno autoinmunitario. Tal enfermedad o trastorno del sistema inmunitario puede ser o implicar, por ejemplo, pero no se limita a, enfermedad de Addison, alergia, alopecia areata, Alzheimer, vasculitis asociada a anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA), espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido (síndrome de Hughes), artritis, asma, aterosclerosis, placa aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, lupus, AR, EM, enfermedad de Graves, etc.), anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, miocarditis autoinmune, ooforitis autoinmune, orquitis autoinmune, azoospermia, enfermedad de Behcet, síndrome de Behcet, enfermedad de Berger, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, enfermedad cardiovascular, celiacía/enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune (SFCDI), polineuritis idiopática crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), polineuropatía recurrente crónica (síndrome de Guillain-Barré), síndrome de Churg-Strauss (SCS), penfigoide cicatricial, enfermedad por aglutininas frías (EAF), EPOC, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, dermatitis, herpetiforme, dermatomiositis, diabetes, lupus discoide, eccema, epidermólisis ampollosa adquirida, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evan, exoftalmía, fibromialgia, síndrome de Goodpasture, enfermedad o trastorno relacionado con injerto, enfermedad de Grave, EIFH, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, enfermedad o trastorno inmunoproliferativo (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), enfermedad pulmonar intersticial, diabetes juvenil, artritis juvenil, artritis idiopática juvenil (AIJ), enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, líquen plano, lupus, nefritis por lupus, hipofisitis linfocítica, enfermedad de Ménière, síndrome de Miller Fish/encefalomielleradiculopatía diseminada aguda, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple (EM), reumatismo muscular, encefalomielitis miálgica (ME), miastenia grave, inflamación ocular, pénfigo foliáceo, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares (síndrome de Whitaker), polimialgia reumática, polimiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria/colangiopatía autoinmune, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter/artritis reactiva, reestenosis, fiebre reumática, enfermedad reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, esclerodermia, síndrome de Sjörgen, rechazo de trasplante de órgano sólido (riñón, corazón, hígado, pulmón, etc.), síndrome de Stiff-Man, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia sistémica, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, tiroiditis, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener, y prevenir o suprimir una respuesta inmunitaria asociada a rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de donante por un sujeto receptor.

También se desvela el uso de un polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector o célula de la invención para la fabricación de un medicamento para inhibir la interacción de células positivas para CD80 y/o células positivas para CD86 con linfocitos T positivos para CD28 y/o positivos para CTLA-4. En otro aspecto, la invención incluye el uso de un polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector o célula de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un rechazo de trasplante de tejido u órgano (por ejemplo, rechazo de trasplante de órgano sólido (por ejemplo, riñón, pulmón, hígado, corazón, etc.)) en un mamífero.

Evaluación de respuestas inmunitarias

Las respuestas inmunitarias suprimidas por un polipéptido, ácido nucleico, vector, virus, pseudovirus, VLP o composición de la invención pueden medirse por cualquier técnica adecuada. Ejemplos de técnicas útiles en la evaluación de respuestas inmunitarias humorales incluyen citometría de flujo, ensayos de inmunotransferencia, ensayos de inmunohistoquímica, ensayos de inmunoprecipitación, radioinmunoensayos (RIA) e inmunoensayos con enzimas. Los inmunoensayos con enzimas incluyen ensayos de inmunoflujo ligado a enzima (ELIFA) y enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), que incluye ensayos de ELISA de sándwich y ELISA competitivos. También puede utilizarse HPLC y electroforesis capilar (EC) en inmunoensayos para detectar complejos de anticuerpos y sustancias diana. Orientación general que realiza tales técnicas y principios relacionados se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, Hampton R y col. (1990) SEROLOGICAL METHODS A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul Minn., Stevens (1995) CLINICAL IMMUNOLOGY AND SEROLOGY: A LABORATORY PERSPECTIVE, CRC press, Bjerrum (1988) HANDBOOK OF IMMUNOBLOTTING OF PROTEINS, vol. 2, Zoa (1995) DIAGNOSTIC IMMUNOPATHOLOGY: LABORATORY PRACTICE AND CLINICAL APPLICATION, Cambridge University Press, Folds (1998) CLINICAL DIAGNOSTIC IMMUNOLOGY: PROTOCOLS IN QUALITY ASSURANCE AND STANDARDIZATION, Blackwell Science Inc., Bryant (1992) LABORATORY IMMUNOLOGY & SEROLOGY 3ª edición, W B Saunders Co. y Maddox D E y col. (1983) J. Exp. Med. 158:1211. Orientación con respecto a técnicas

de ELISA y principios relacionados se describen en, por ejemplo, Reen (1994) *Methods Mol. Biol.* 32:461-6, Goldberg y col. (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5(2):278-81, Voller y col. (1982) *Lab. Res. Methods Biol. Med.* 5:59-81, Yolken y col. (1983) *Ann. NY Acad. Sci.* 420:381-90, Vaughn y col. (1999) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(4):693-8, y Kuno y col. (1991) *J. Virol. Methods* 33(1-2):101-13. Orientación con respecto a técnicas de citometría de flujo se proporciona en, por ejemplo, Diamond (2000) *IN LIVING COLOR: PROTOCOLS IN FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING*, Springer Verlag, Jaroszki (1998) *FLOW CYTOMETRY PROTOCOLS*, 1ª ed., Shapiro (1995) *PRACTICAL FLOW CYTOMETRY*, 3ª edición, Rieseberg y col. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(3-4):350-60, Scheffold y Kern (2000) *J. Clin. Immunol.* 20(6):400-7, y McSharry (1994) *Clin. Microbiol. Rev.* (4):576-604.

Respuestas citotóxicas y otras respuestas inmunitarias de linfocitos T también pueden medirse por cualquier técnica adecuada. Ejemplos de tales técnicas incluyen ensayo ELISpot (particularmente, IFN- γ ELISpot), tinción de citocinas intracelulares (ICC) (particularmente en combinación con análisis FACS), tinción de tetrámeros de linfocitos T CD8+/FACS, ensayos de proliferación de linfocitos T convencionales y modificados, ensayo de CTL de liberación de cromo, análisis de dilución limitante (LDA) y ensayos de destrucción de CTL. Orientación y principios relacionados con ensayos de proliferación de linfocitos T se describen en, por ejemplo, Plebanski y Burtles (1994) *J. Immunol. Meth.* 170:15, Sprent y col. (2000) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355(1395):317-22 y Messele y col. (2000) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7(4):687-92. LDA se describe en, por ejemplo, Sharrock y col. (1990) *Immunol. Today* 11:281-286. Ensayos de ELISpot y principios relacionados se describen en, por ejemplo, Czerinsky y col. (1988) *J. Immunol. Meth.* 110:29-36, Olsson y col. (1990) *J. Clin. Invest.* 86:981-985, Schmittel y col. (2001) *J. Immunol. Meth.* 247(1-2):17-24, Ogg y McMichael (1999) *Immunol. Lett.* 66(1-3):77-80, Schmittel y col. (2001) *J. Immunol. Meth.* 247(1-2):17-24, Kurane y col. (1989) *J. Exp. Med.* 170(3):763-75, Chain y col. (1987) *J. Immunol. Meth.* 99(2):221-8, Czerinsky y col. (1988) *J. Immunol. Meth.* 110:29-36, y las patentes de EE.UU. n° 5.750.356 y 6.218.132. Ensayos de tetrámeros se tratan en, por ejemplo, Pielner y col. (2000) *J. Immunol.* 165(2):613-7. Otras técnicas analíticas de linfocitos T se describen en Hartel y col. (1999) *Scand. J. Immunol.* 49(6):649-54 y Parish y col. (1983) *J. Immunol. Meth.* 58(1-2):225-37.

La activación de linfocitos T también puede analizarse midiendo la actividad de CTL o expresión de antígenos de activación tales como receptor de IL-2, CD69 o moléculas de HLA-DR. La proliferación de linfocitos T purificados puede medirse en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR); tales ensayos son muy conocidos en la técnica.

Los ensayos de ELISpot miden el número de linfocitos T que secretan una citocina específica tal como IFN- γ o TNF- α , que sirve de marcador de efectores de linfocitos T. Los kits de ELISA específicos para citocinas están comercialmente disponibles (por ejemplo, está disponible un ELISpot específico para IFN- γ de R&D Systems, Mineápolis, MN).

Procedimientos adicionales para evaluar y medir la capacidad de moléculas de la invención (por ejemplo, polipéptidos de la invención, que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes solubles de la invención) para suprimir o inhibir la activación de linfocitos T y/o proliferación de linfocitos T se describen en los Ejemplos 5-8 en la sección de ejemplos más adelante.

Procedimientos de administración

En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, una composición farmacéutica inyectable que comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado (por ejemplo, PBS) y una cantidad eficaz de una molécula de la invención, tal como un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante monomérica, dimérica o multimérica) o conjugado de la invención, puede administrarse parenteralmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intravenosamente, subdérmicamente, transdérmicamente, subcutáneamente o intradérmicamente a un huésped. Alternativamente pueden usarse técnicas de administración biolística de proteínas (administración con pistola de vacunas) (cuyos ejemplos se tratan en otra parte en el presente documento). También puede usarse cualquier otra técnica adecuada. La administración de polipéptidos puede facilitarse mediante liposomas. Cualquier técnica de administración tal puede usarse para administrar un polipéptido o conjugado de la invención conjuntamente con cualquier procedimiento terapéutico o profiláctico descrito en el presente documento.

Mientras que la siguiente discusión se refiere principalmente a ácidos nucleicos, se entenderá que se aplica igualmente a vectores de ácidos nucleicos de la invención. Un ácido nucleico de la invención o composición del mismo puede administrarse a un huésped por cualquier vía de administración adecuada. En algunos aspectos desvelados en el presente documento, la administración del ácido nucleico es parenteral (por ejemplo, subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.) o intradérmica (i.d.)), tópica o transdérmica. El ácido nucleico puede introducirse directamente en un tejido, tal como músculo, mediante inyección usando una aguja u otro dispositivo similar. Véanse, por ejemplo, Nabel y col. (1990), arriba; Wolff y col. (1990) *Science* 247:1465-1468, Robbins (1996) *Gene Therapy Protocols*, Humana Press, NJ, y Joyner (1993) *Gene Targeting: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, England, y las patentes de EE.UU. n° 5.580.859 y 5.589.466. Otros procedimientos tales como "biolística" o transformación mediada por partículas (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.945.050 y 5.036.006, Sanford y col., *J. Particulate Sci. Tech.* 5:27-37 (1987), Yang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9568-72 (1990), y Williams y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-30 (1991)). Estos procedimientos son útiles no sólo para la introducción *in vivo* de ADN en un sujeto, tal como un mamífero, sino también para la modificación *ex vivo* de células

para la reintroducción en un mamífero (que se trata adicionalmente en otra parte en el presente documento).

Para la administración con pistola de genes convencional, el vector o ácido nucleico de interés se precipita sobre la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles son acelerados con una onda de choque o expandiendo gas helio, y penetran en tejidos a una profundidad de varias capas de células. Por ejemplo, el dispositivo de administración de genes Accel[™] fabricado por Agacetus, Inc. Middleton WI es adecuado para su uso en esta realización. El ácido nucleico o vector puede administrarse por tales técnicas, por ejemplo, intramuscularmente, intradérmicamente, subdérmicamente, subcutáneamente y/o intraperitonealmente. Dispositivos y técnicas adicionales relacionados con la administración biolística son las publicaciones de solicitud de patente internacional n° WO 99/2796, WO 99/08689, WO 99/04009 y WO 98/10750, y las patentes de EE.UU. n° 5.525.510, 5.630.796, 5.865.796 y 6.010.478.

El ácido nucleico puede administrarse en asociación con un agente que facilita la transfección, cuyos ejemplos se trataron anteriormente. El ácido nucleico puede administrarse tópicamente y/o por administración de partículas líquidas (a diferencia de la administración biolística de partículas sólidas). Ejemplos de tales técnicas de administración de ácidos nucleicos, composiciones y construcciones adicionales que pueden ser adecuadas como vehículos de administración para los ácidos nucleicos de la invención se proporcionan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.591.601, 5.593.972, 5.679.647, 5.697.901, 5.698.436, 5.739.118, 5.770.580, 5.792.751, 5.804.566, 5.811.406, 5.817.637, 5.830.876, 5.830.877, 5.846.949, 5.849.719, 5.880.103, 5.922.687, 5.981.505, 6.087.341, 6.107.095, 6.110.898, y publicaciones de solicitud de patente internacional n° WO 98/06863, WO 98/55495 y WO 99/57275.

Alternativamente, el ácido nucleico puede administrarse al huésped a modo de administración de genes basada en liposomas. Técnicas a modo de ejemplo y principios relacionados con la administración de genes basada en liposomas se proporcionan en, por ejemplo, Debs y Zhu (1993) documento WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6(7):682-691; Rose, patente de EE.UU. n° 5.279.833; Brigham (1991) documento WO 91/06309; Brigham y col. (1989) *Am. J. Med. Sci.* 298:278-281; Nabel y col. (1990) *Science* 249:1285-1288; Hazinski y col. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.* 4:206-209; y Wang y Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855) y Felgner y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7414). Composiciones farmacéuticamente aceptables de liposomas adecuadas que pueden usarse para administrar el ácido nucleico se describen adicionalmente en otra parte en el presente documento.

Cualquier cantidad de ácido nucleico de la invención puede usarse en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, suficiente ácido nucleico puede formularse en un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable y administrarse a un sujeto de forma que el polipéptido codificado o conjugado se produzca en el sujeto en una cantidad que se cree que es eficaz para, por ejemplo, suprimir la respuesta inmunitaria en el sujeto, inhibir la interacción entre células positivas para B7 endógenas y células positivas para CD28 en el sujeto, o inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula, órgano o injerto. En un formato, en el que el ácido nucleico se administra mediante inyección, se administran aproximadamente 50 microgramos (μg) a 100 mg de ácido nucleico. En una aplicación a modo de ejemplo, para suprimir una respuesta inmunitaria, una composición farmacéutica que comprende PBS y una cantidad de un vector de ADN que codifica una cantidad eficaz de un polipéptido CTLA-4 mutante se administra mediante inyección o electroporación u otro procedimiento de administración adecuado (por ejemplo, pistola de genes, impresión mediante la piel y lipofección) a un sujeto en necesidad de tratamiento (por ejemplo, un sujeto que padece una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario en el que se desea tratamiento inmunosupresor). Un vector a modo de ejemplo se muestra en la Figura 1.

La cantidad de ADN plásmido para su uso en los procedimientos de la divulgación en los que la administración es mediante una pistola de genes, por ejemplo, es frecuentemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 veces inferior a la cantidad usada para dirigir la inyección (por ejemplo, mediante inyección con aguja convencional). A pesar de tal sensibilidad, al menos aproximadamente 1 μg del ácido nucleico puede usarse en tales técnicas de administración biolística.

Los sistemas de vector vírico de ARN o ADN pueden ser útiles para la administración de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención. Los vectores víricos pueden administrarse directamente a un sujeto *in vivo* o pueden usarse para tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran al sujeto en un formato *ex vivo*. Vectores víricos útiles incluyen aquellos tratados anteriormente, tal como vectores adenoasociados, adenovíricos, retrovíricos, lentivíricos y del virus del herpes simple. Con tales vectores víricos, un ácido nucleico de la invención puede transferirse fácilmente en células y tejidos diana del sujeto. Adicionalmente, con los procedimientos de transferencia de genes de retrovirus, lentivirus y virus adenoasociados puede ser posible integrar un ácido nucleico de la invención en el genoma del huésped, produciéndose así la expresión continua del ácido nucleico insertado.

Se cree que la administración de un vector vírico de la invención que comprende al menos un ácido nucleico de la invención a un sujeto puede suprimir una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra el vector. Opcionalmente, algunos procedimientos profilácticos y/o terapéuticos de la divulgación se ponen en práctica con una dosificación de un vector vírico adecuado suficiente para inhibir una respuesta inmunitaria detectable. Cualquier vector vírico adecuado que comprenda un ácido nucleico de la invención, en cualquier concentración adecuada, puede usarse para suprimir la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, al sujeto huésped puede administrársele una

población de vectores retrovéricos (ejemplos de los cuales se describen en, por ejemplo, Buchscher y col. (1992) *J. Virol.* 66(5) 2731-2739, Johann y col. (1992) *J. Virol.* 66 (5):1635-1640 (1992), Sommerfelt y col., (1990) *Virol.* 176:58-59, Wilson y col. (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378, Miller y col., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991), Wong-Staal y col., PCT/US94/05700, Rosenberg y Fauci (1993) en *FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY*, TERCERA EDICIÓN Paul (ed.) Raven Press, Ltd., Nueva York y las referencias en su interior), un vector de AAV (como se describe en, por ejemplo, West y col. (1987) *Virology* 160:38-47, Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801, Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351, Tratschin y col. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5(11):3251-3260, las patentes de EE.UU. n° 4.797.368 y 5.173.414, y la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 93/24641), o un vector adenovérico (como se describe en, por ejemplo, Berns y col. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772:95-104; Ali y col. (1994) *Gene Ther.* 1:367-384; y Haddada y col. (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 (Pt 3):297-306), de forma que resulten niveles inmunosupresores de la expresión del ácido nucleico incluido en el vector, produciendo así la respuesta inmunosupresora deseada. Otros tipos adecuados de vectores víricos se describen en otra parte en el presente documento (incluyendo ejemplos alternativos de vectores retrovéricos, AAV y adenovéricos adecuados).

Condiciones de infección adecuadas para estos y otro tipos de partículas de vector vírico se describen en, por ejemplo, Bachrach y col., *J. Virol.*, 74(18), 8480-6 (2000), Mackay y col., *J. Virol.*, 19(2), 620-36 (1976), y *FIELDS VIROLOGY*, arriba. Técnicas adicionales útiles en la producción y aplicación de vectores víricos se proporcionan en, por ejemplo, "Practical Molecular Virology: Viral Vectors for Gene Expression" en *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 8, Collins, M. Ed., (Humana Press 1991), *VIRAL VECTORS: BASIC SCIENCE AND GENE THERAPY*, 1ª ed. (Cid-Arregui y col., Eds.) (Eaton Publishing 2000), "Viral Expression Vectors" en *CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY*, Oldstone y col., Eds. (Springer-Verlag, NY, 1992), y "Viral Vectors" en *CURRENT COMMUNICATIONS IN BIOTECHNOLOGY*, Gluzman and Hughes, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

La toxicidad y eficacia terapéutica de vectores o virus que incluyen una o más moléculas de la invención se determinan usando procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. Puede determinarse la DML₅₀ (la dosis mínima letal para el 50% de la población) y/o la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) usando procedimientos presentados en el presente documento y aquellos conocidos de otro modo en la técnica. Véase también S. Plotkin y W. Orenstein, *VACCINES* (W. B. Saunders Co. 1999 3d ed.) para dosis sugeridas para vacunas víricas conocidas. Ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, células transducidas y otras formulaciones de la presente invención pueden administrarse en una cantidad determinada, por ejemplo, por la DML₅₀ de la formulación, y los efectos secundarios de la misma a diversas concentraciones, como se aplica a la masa y la salud general del paciente. Por tanto, en el presente documento se desvela un procedimiento de inducir una respuesta inmunitaria administrando una dosis igual o superior a la DE₅₀ de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una población de partículas similares a virus o virus (por ejemplo, virus atenuados o deficientes en la replicación) que comprende un polipéptido o ácido nucleico de la invención. La administración puede llevarse a cabo mediante dosis única o dosis divididas (tanto por co-administración, administración seriada o combinaciones de las mismas). Las técnicas y protocolos de administración se describen en, por ejemplo, Plotkin (*VACCINES*), arriba, y otras referencias citadas en el presente documento. En un sentido relacionado, técnicas para evaluar la dosificación de las composiciones de ácido nucleico, polipéptido, vector y célula eficaces para inducir inmunidad se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente europea n° 1 156 333 y referencias citadas en su interior.

El vector vírico puede elegirse como diana para tejidos, células y/u órganos particulares de un sujeto, por ejemplo, mamífero. Ejemplos de tales vectores se describen anteriormente. Por ejemplo, el vector vírico o vector de ácido nucleico puede usarse para liberar selectivamente la secuencia de ácidos nucleicos de la invención a monocitos, células dendríticas, células asociadas a células dendríticas (por ejemplo, queratinocitos asociados a células de Langerhans), linfocitos T y/o linfocitos B. El vector vírico puede ser un vector vírico deficiente en la replicación. La partícula de vector vírico también puede modificarse para reducir la respuesta inmunitaria del huésped al vector vírico, alcanzándose así expresión génica persistente. Tales vectores "sigilosos" se describen en, por ejemplo, Martin, *Exp. Mol. Pathol.* 66(1):3-7 (1999), Croyle y col., *J. Virol.* 75(10):4792-801 (2001), Rollins y col., *Hum. Gene Ther.* 7(5):619-26 (1996), Ikeda y col., *J. Virol.* 74(10):4765-75 (2000), Halbert y col., *J. Virol.* 74(3):1524-32 (2000) y la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 98/40509. Alternativamente o adicionalmente, las partículas de vector vírico pueden administrarse por una estrategia seleccionada para reducir la respuesta inmunitaria del huésped a las partículas de vector. Estrategias para reducir la respuesta inmunitaria a la partícula de vector vírico tras la administración a un huésped se proporcionan en, por ejemplo, Maione y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(11):5986-91 (2001), Morral y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(22):2816-21 (1999), Pastore y col., *Hum. Gene Ther.* 10(11):1773-81 (1999), Morsy y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(14):7866-71 (1998), Joos y col., *Hum. Gene Ther.* 7(13):1555-66 (1996), Kass-Eisler y col., *Gene Ther.* 3(2):154-62 (1996), las patentes de EE.UU. n° 6.093.699, 6.211.160, 6.225.113, publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2001-0066947A1.

La piel y el músculo son las dianas generalmente preferidas para la administración de los polipéptidos, conjugados, ácidos nucleicos y vectores de la invención, por cualquier técnica adecuada. Por tanto, la administración de un polipéptido, conjugado, ácido nucleico o vector de la invención en o a través de la piel de un sujeto (por ejemplo, mamífero) es un rasgo de la invención. Tales moléculas de la invención pueden administrarse en una disolución inyectable farmacéuticamente aceptable en o a través de la piel, por ejemplo, intramuscularmente o intraperitonealmente. La administración también puede llevarse a cabo por dispositivos transdérmicos o, más

normalmente, administración biolística del polipéptido, conjugado, ácido nucleico y/o vector a, en o a través de la piel del sujeto o en músculo expuesto del sujeto. Los dispositivos transdérmicos, por ejemplo, pueden aplicarse a la piel de un huésped durante un periodo adecuado de forma que se produzca suficiente transferencia de un polinucleótido y/o vector al sujeto, suprimiendo así una respuesta inmunitaria en el sujeto o inhibiendo el rechazo de un trasplante de injerto, célula o tejido. La administración muscular se facilita más normalmente mediante inyección de una disolución líquida que comprende un polipéptido, polinucleótido o vector de la invención. Células particulares que pueden elegirse como diana incluyen células dendríticas, otras APC, linfocitos B, monocitos, linfocitos T (incluyendo linfocitos T colaboradores) y células asociadas a tales células del sistema inmune (por ejemplo, queratinocitos u otras células de la piel asociadas a células de Langerhans). La elección como diana de vectores y ácidos nucleicos de la invención se describe en otra parte en el presente documento. Tal administración elegida como diana puede realizarse con ácidos nucleicos o vectores que comprenden ácidos nucleicos operativamente ligados a promotores específicos para célula y/o tejido, ejemplos de los cuales se conocen en la técnica.

El polinucleótido de la invención puede administrarse por cualquier sistema de administración adecuado, de forma que la expresión de un polipéptido recombinante se produce en el huésped produciendo una supresión de una respuesta inmunitaria, inhibición de la interacción entre células positivas para B7 y positivas para CD28, o inhibición del rechazo de trasplante de tejido, célula, órgano o injerto. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una población de células bacterianas que comprenden un ácido nucleico de la invención puede administrarse a un sujeto, produciendo la expresión de un polipéptido CTLA-4 mutante recombinante de la invención, y supresión de una respuesta inmunitaria en el sujeto. En la técnica se conocen células bacterianas desarrolladas para la administración de genes de mamífero.

La administración de un polinucleótido o vector de la invención a un sujeto se facilita por la aplicación de electroporación a un número eficaz de células o una diana de tejido eficaz, de forma que el ácido nucleico y/o vector es recogido por las células, y se expresa en su interior, produciendo la producción de un polipéptido recombinante de la invención en su interior y la posterior supresión de una respuesta inmunitaria en el sujeto.

Producción y procedimientos de purificación

La invención proporciona además procedimientos de preparación y purificación de polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores y células de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de preparar un polipéptido recombinante de la invención introduciendo un ácido nucleico de la invención en una población de células en un medio de cultivo, cultivar las células en el medio (durante un tiempo y en condiciones adecuadas para el nivel deseado de expresión génica) para producir el polipéptido y aislar el polipéptido de las células, medio de cultivo o ambos. El ácido nucleico está normalmente operativamente ligado a una secuencia reguladora eficaz para expresar el polipéptido codificado por el ácido nucleico.

El polipéptido puede aislarse de lisados celulares, sobrenadantes de células y/o medio de cultivo celular por una variedad de técnicas adecuadas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, diversa cromatografía de lisados celulares y/o sobrenadantes de células. Por ejemplo, el polipéptido puede aislarse de lisados celulares y/o medio de cultivo celular concentrando primero el medio de cultivo usando filtros de centrifuga (Amicon), alternativamente, precipitando los polipéptidos con sulfato de amonio o polietilenglicol y luego resuspendiendo los polipéptidos en PBS u otros tampones adecuados. El polipéptido puede luego purificarse usando tanto cromatografía de exclusión por tamaño sobre columna Sephacryl S-400 (Amersham Biosciences) como se describe en, por ejemplo, Hjorth, R. y J. Moreno-Lopez, J. Virol. Methods 5:151-158 (1982), como otra cromatografía de afinidad, o por centrifugación mediante gradientes del 20-60% de sacarosa como se describe en, por ejemplo, Konish y col., Virology 188:714-720 (1992). Las fracciones que contienen los polipéptidos deseados pueden identificarse por ELISA o SDS-PAGE seguido de tinción con plata de proteínas e inmunotransferencia. Las fracciones deseadas se reúnen y adicionalmente se concentran. La sacarosa en fracciones de centrifugación en gradiente puede eliminarse usando filtración en gel en columna PD-10 (Amersham Biosciences). Técnicas de purificación adicionales incluyen aquellas descritas en los ejemplos más adelante y cromatografía de interacción hidrófoba (Diogo, M. M. y col., J. Gene Med. 3:577-584 (2001)), y cualquier otra técnica adecuada conocida en la materia.

También puede usarse cualquier técnica de purificación adecuada que se conozca en la técnica. Los procedimientos de purificación de polipéptidos conocidos en la técnica incluyen aquellos expuestos en, por ejemplo, Sandana (1997) BIOSEPARATION OF PROTEINS, Academic Press, Inc., Bollag y col. (1996) PROTEIN METHODS, 2ª edición, Wiley-Liss, NY, Walker (1996) THE PROTEIN PROTOCOLS HANDBOOK Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) PROTEIN PURIFICATION APPLICATIONS: A PRACTICAL APPROACH IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra, Scopes (1993) PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE 3ª edición Springer Verlag, NY, Janson y Ryden (1998) PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES, HIGH RESOLUTION METHODS AND APPLICATIONS, segunda edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) PROTEIN PROTOCOLS ON CD-ROM Humana Press, NJ. Células adecuadas para la producción de polipéptidos se conocen en la técnica y se tratan en otra parte en el presente documento (por ejemplo, pueden ser adecuadas células Vero, células 293, células BHK, CHO (por ejemplo, CHO-K1) y COS). Las células pueden lisarse por cualquier técnica adecuada que incluye, por ejemplo, sonicación, microfluidización, cizallamiento físico, lisis en prensa francesa o lisis basada en detergente.

5 En el presente documento se desvela un procedimiento de purificar un polipéptido de la invención que comprende transformar una célula huésped adecuada con un ácido nucleico de la divulgación (por ejemplo, un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido recombinante que comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 1) en la célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o célula 293), lisar la célula por una técnica de lisis adecuada (por ejemplo, sonicación, lisis con detergente u otra técnica apropiada) y someter el lisado a purificación por afinidad con una columna de cromatografía que comprende una resina que incluye al menos un anticuerpo novedoso de la invención (normalmente un anticuerpo monoclonal de la invención) o fragmento de unión a antígeno del mismo, de forma que el lisado se enriquece en el polipéptido deseado (por ejemplo, un polipéptido que comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 1).

10 En el presente documento se desvela un procedimiento de purificar tales polipéptidos diana, procedimiento que se diferencia del procedimiento anteriormente descrito en que un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la divulgación (por ejemplo, SEC ID N°: 1) y una marca adecuada (por ejemplo, una marca de e-epítotope/his), y purificar el polipéptido por inmutafinidad, cromatografía en columna de afinidad de lenti-lectina, cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), o técnicas de enriquecimiento por cromatografía de afinidad por quelación de metal (MCAC). Procedimientos de purificación adicionales se desvelan en otra parte en el presente documento.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de producir un polipéptido de la invención, procedimiento que comprende introducir en una población de células un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico de la invención, cultivar las células en un medio de cultivo bajo condiciones apropiadamente suficientes para la expresión del ácido nucleico a partir del vector y producción del polipéptido codificado por el ácido nucleico, y aislar el polipéptido de las células, medio de cultivo, o ambos. Las células elegidas se basan en el procesamiento deseado del polipéptido y se basan en el vector apropiado (por ejemplo, se prefieren células de *E. coli* para plásmidos bacterianos, mientras que se prefieren células 293 para plásmidos lanzadera de mamífero y/o adenovirus, particularmente adenovirus deficientes en E1).

25 En otro aspecto más, la divulgación incluye un procedimiento de producir un polipéptido, procedimiento que comprende: (a) introducir en una población de células un vector de expresión recombinante que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido; (b) administrar el vector de expresión en un mamífero; y (c) aislar el polipéptido del mamífero o de un subproducto del mamífero.

30 También puede producirse un polipéptido de la invención cultivando una célula o población de células de la invención (que, por ejemplo, han sido transformadas con un ácido nucleico de la invención que codifica tales polipéptido) en condiciones suficientes para la expresión del polipéptido y recuperar el polipéptido expresado en o por la célula usando técnicas convencionales conocidas en la materia.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de producir un polipéptido de la invención que comprende (a) introducir en una población de células un ácido nucleico de la invención, en el que el ácido nucleico está operativamente ligado a una secuencia reguladora eficaz para producir el polipéptido codificado por el ácido nucleico; (b) cultivar las células en un medio de cultivo para producir el polipéptido; y (c) aislar el polipéptido de las células o medio de cultivo. También se incluye una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de la invención (por ejemplo, un vector de expresión de la invención).

40 También se incluye un procedimiento de producir un polipéptido de la invención que comprende introducir un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido en una población de células en un medio, células que son permisivas para la expresión del ácido nucleico, mantener las células en condiciones en las que el ácido nucleico se expresa y después aislar el polipéptido del medio.

45 En otro aspecto, en el presente documento se desvela un procedimiento de preparación de una proteína de fusión. El procedimiento comprende: (1) cultivar una célula huésped transformada con un ácido nucleico en un medio de cultivo, en el que el ácido nucleico comprende: (i) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos el 95% de identidad con una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, polipéptido que se une a CD86 y/o CD80 y/o un dominio extracelular de tanto CD86 como CD80, y (ii) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del Fc de Ig que comprende una región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, por lo que el ácido nucleico se expresa y se produce una proteína de fusión; y 50 (2) recuperar la proteína de fusión. Cualquier polipéptido del Fc de Ig puede ser cualquier empleado, que incluye, por ejemplo, un Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG4, o polipéptido de Fc de Ig mutante. En algunos de tales procedimientos, el ácido nucleico comprende además una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un péptido secretor o señal operativamente ligada a la proteína de fusión, y la proteína de fusión es secretada de la célula huésped como un dímero de proteínas de fusión unidas por disulfuro que comprende primera y segunda proteínas de fusión idénticas, y el dímero de proteínas de fusión unidas por disulfuro se recupera del medio de cultivo. En algunos de tales procedimientos, el dímero de proteínas de fusión unidas por disulfuro se forma mediante un enlace disulfuro covalente entre un residuo de cisteína de la primera proteína de fusión y un residuo de cisteína de la segunda proteína de fusión. En algunos de tales procedimientos, la proteína de fusión se recupera del medio de cultivo, célula huésped o periplasma de células huésped.

En el presente documento se desvela una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (i) un primer polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1-73, en el que el primer polipéptido se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos, y (ii) un segundo polipéptido que comprende una región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de un polipéptido de IgG. El segundo polipéptido puede comprender cualquier polipéptido de Ig adecuado tratado en otra parte en el presente documento, que incluye, por ejemplo, que comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 184 o SEC ID N°: 218.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de un dímero de proteínas de fusión soluble. El procedimiento comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dímero de proteínas de fusión soluble de la invención. Proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden la secuencia de polipéptidos de cualquiera de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222. El vector incluye una secuencia de nucleótidos que facilita la expresión de la proteína de fusión (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal). La proteína de fusión es secretada de la célula huésped como un dímero de proteínas de fusión unidas por disulfuro que comprende dos proteínas de fusión idénticas, y el dímero de proteínas de fusión unidas por disulfuro se recupera del medio de cultivo. En algunos de tales procedimientos, el dímero de proteínas de fusión unidas por disulfuro se forma mediante un enlace disulfuro covalente entre un residuo de cisteína sobre cada proteína de fusión. El dímero de proteínas de fusión se recupera normalmente del medio de cultivo, célula huésped o periplasma de células huésped. El Ejemplo 12 proporciona un procedimiento a modo de ejemplo para crear una línea celular establemente transfectada que expresa una proteína de fusión CTLA4-Ig mutante de la invención, producir la proteína de fusión CTLA4-Ig mutante y purificar la proteína de fusión mutante a partir del cultivo.

Además de la producción recombinante, los polipéptidos de la invención pueden producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart y col. (1969) SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, W.H. Freeman Co, San Francisco y Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). Las síntesis de péptidos pueden realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Por ejemplo, las subsecuencias pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir un polipéptido de la invención o fragmentos del mismo. Alternativamente, los polipéptidos sintetizados pueden encargarse de cualquier número de compañías que están especializadas en la producción de polipéptidos. Lo más comúnmente, los polipéptidos de la invención se producen expresando ácidos nucleicos codificantes y recuperando polipéptidos, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

La invención incluye un procedimiento de producir un polipéptido de la invención que comprende introducir un ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una combinación de los mismos, en un animal, tal como un mamífero (incluyendo, por ejemplo, rata, primate no humano, murciélago, tití, cerdo o pollo), de forma que un polipéptido de la invención se exprese en el animal, y el polipéptido se aisle del animal o de un subproducto del animal. El aislamiento del polipéptido del animal o subproducto de animal puede ser por cualquier técnica adecuada, dependiendo del animal y estrategia de recuperación deseada. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse de sueros de ratones, monos o cerdos que expresan el polipéptido de la invención. Animales transgénicos (incluyendo los mamíferos anteriormente mencionados) que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención se proporcionan por la invención. El animal transgénico puede tener el ácido nucleico integrado en su genoma huésped (por ejemplo, por un vector de AAV, vector lentivírico, técnicas biolísticas realizadas con secuencias promotoras de la integración, etc.) o puede tener el ácido nucleico en epicromosómicamente mantenidos (por ejemplo, en un vector de plásmido no integrante o por inserción en un vector vírico no integrante). Los vectores epicromosómicos pueden manipularse para expresión génica más transitoria que vectores integrantes. Los vectores basados en ARN ofrecen ventajas particulares a este respecto.

Composiciones

La invención proporciona además composiciones novedosas y útiles que comprenden al menos un componente de la invención tal como, por ejemplo, al menos un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión y polipéptidos multiméricos), conjugado, ácido nucleico, vector, virus, partícula similar a virus (VLP) y/o célula de la invención, o cualquier combinación de los mismos y un vehículo, excipiente o diluyente. El vehículo, excipiente o diluyente puede ser un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una composición tal puede comprender cualquier cantidad adecuada de cualquier número adecuado de polipéptidos, conjugados, ácidos nucleicos, vectores, virus, VLP y/o células de la invención. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP y/o célula, o cualquier combinación de los mismos, y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son útiles en los procedimientos descritos en el presente documento que incluyen, por ejemplo, procedimientos de supresión de respuestas inmunitarias.

Por ejemplo, en el presente documento se desvela una composición que comprende un excipiente, diluyente o vehículo y al menos un polipéptido tal de la divulgación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más polipéptidos),

tal como un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de SEC ID N°: 1-73) o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, cualquiera de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222), en la que el al menos un polipéptido está presente en la composición en una cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunitaria que incluye, por ejemplo, una respuesta(s) inmunitaria(s) implicada(s) en rechazo de trasplante y/o autoinmunidad, inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula u órgano donado o inhibir la interacción de células endógenas positivas para B7 con linfocitos T positivos para CD28 en un sujeto al que se administra la composición.

También se incluye una composición farmacéutica que comprende un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de uno o más de tales componentes de la invención. La cantidad eficaz puede ser una cantidad o dosis terapéutica o profilácticamente eficaz para su uso en un procedimiento terapéutico o profiláctico descrito en otra parte en el presente documento, tal como un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmunitaria o un procedimiento para inhibir rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de un donante por un sujeto receptor.

La composición (o composición farmacéutica) puede ser cualquier composición no tóxica que no interfiera con las propiedades inmunosupresoras del polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP o célula de la invención incluida en su interior. La composición puede comprender uno o más excipientes, diluyentes o vehículos, y la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Una amplia variedad de vehículos, diluyentes y excipientes aceptables se conocen en la técnica y pueden incluirse en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, puede usarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua destilada o purificada, solución salina estéril, solución salina tamponada tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) y similares, son ventajosos en formulaciones inyectables del polipéptido, proteínas de fusión, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP y/o célula de la invención. En la técnica se conocen numerosos excipientes, vehículos y diluyentes adecuados para administración de proteínas terapéuticas. Tales disoluciones son preferentemente estériles y generalmente libres de materia no deseable. Las composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización muy conocidas convencionales. Las composiciones de la invención pueden comprender sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera, para aproximarse a las condiciones fisiológicas. Tales sustancias incluyen, por ejemplo, agentes de ajuste del pH, agentes de tamponamiento y agentes de ajuste de la tonicidad que incluyen, por ejemplo, acetato sódico, ascorbato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. Las composiciones de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas, también pueden incluir uno o más componentes tales como diluyentes, cargas, sales, tampones, tensioactivos, emulsionantes, detergentes (por ejemplo, un detergente o emulsionante no iónico tal como Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80, Pluronic F-68, y similares), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteína), conservantes, fijadores de tejido, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para inclusión en una composición farmacéutica.

Ejemplos de componentes adecuados que pueden usarse en la composición farmacéutica se describen en, por ejemplo, Berge y col., *J. Pharm. Sci.* 66(1):1-19 (1977), Wang y Hanson, *J. Parenteral. Sci. Tech.* 42:S4-S6 (1988), las patentes de EE.UU. n° 6.165.779 y 6.225.289, y en otra parte en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir conservantes (tales como alcohol bencílico, azida de sodio, m-cresol, etc.), antioxidantes, quelantes de metal (tales como metionina, EDTA, etc.) y/u otros aditivos conocidos para aquellos expertos en la materia. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas se describen en, por ejemplo, Urquhart y col., *Lancet* 16:367 (1980), Lieberman y col., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS - DISPERSE SYSTEMS* (2ª ed., vol. 3, 1998), Ansel y col., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS & DRUG DELIVERY SYSTEMS* (7ª ed. 2000), Martindale, *THE EXTRA PHARMACOPEIA* (31ª edición), Remington's *PHARMACEUTICAL SCIENCES* (16ª-20ª ediciones), *THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS*, Goodman y Gilman, Eds. (9ª ed. - 1996), WILSON AND GISVOLDS *TEXTBOOK OF ORGANIC MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY*, Delgado and Remers, Eds. (10ª ed. - 1998), y las patentes de EE.UU. n° 5.708.025 y 5.994.106. Los principios de formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables se describen en, por ejemplo, Platt, *Clin. Lab Med.* 7:289-99 (1987), Aulton, *PHARMACEUTICS: THE SCIENCE OF DOSAGE FORM DESIGN*, Churchill Livingstone (Nueva York) (1988), *EXTEMPORANEOUS ORAL LIQUID DOSAGE PREPARATIONS*, CSHP (1998), y "Drug Dosage", *J. Kans. Med. Soc.* 70(1):30-32 (1969). Vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales particularmente adecuados para la administración de vectores se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 98/32859.

Las composiciones de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas, pueden incluir uno o más vehículos o excipientes acuosos (incluyendo, por ejemplo, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables) y uno o más componentes tales como uno o más tampones, una o más sales, uno o más detergentes o emulsionantes y/o uno o más azúcares. El sistema de tampón es normalmente uno adecuado para mantener el pH de la composición dentro de un intervalo que es propicio para la estabilidad de la molécula de la invención presente en la composición (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante). Tampones a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, tampón ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-aminoetanosulfónico (HEPES), tampón citrato (por ejemplo, mezcla de citrato de disodio-citrato de trisodio, mezcla de citrato de sodio-ácido cítrico, mezcla de ácido cítrico-citrato de trisodio, mezcla de citrato de monosodio-citrato de disodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de monosodio), tampón fosfato de sodio (por ejemplo, mezcla de fosfato de disodio-fosfato de trisodio (Na₂HPO₄/Na₃PO₄), mezcla de fosfato dibásico de sodio-fosfato monobásico de sodio), tampón acetato (por ejemplo,

mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico), tampón histidina, tampón Tris, tampón Tris-maleato, tampón succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato de monosodio, mezcla de ácido succínico-succinato de disodio, mezcla de succinato de monosodio-succinato de disodio), tampón maleato, tampón imidazol, tampón tartrato, tampón fumarato, tampón gluconato, tampón oxalato, tampón lactato, tampón acetato y similares, o una combinación de cualquiera de los mismos (por ejemplo, mezcla de tampones citrato y acetato, etc.). La concentración de tampón en la composición puede ser cualquiera que sea apropiada para la(s) molécula(s) de la invención (por ejemplo, una CTLA-4-Ig mutante) incluida(s) en la disolución de composición tal como, pero no se limitan a, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, que incluyen, por ejemplo, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM (tal como, por ejemplo, tampón HEPES 20 mM, tampón citrato de disodio-citrato de trisodio 20 mM, tampón succinato 20 mM, etc.).

Sales a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, sales solubles en agua que incluyen una sal orgánica o sal inorgánica (por ejemplo, sal inorgánica soluble en agua) tal como cloruro sódico, cloruro de magnesio, bicarbonato sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio y cloruro de amonio, y similares, o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o fisiológicamente compatible. Concentraciones de sal a modo de ejemplo en la disolución de composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 125 mM, o aproximadamente 75 mM a aproximadamente 125 mM, que incluyen, por ejemplo, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM (tal como, por ejemplo, NaCl 100 mM).

Azúcares o hidratos de carbono a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, sacarosa, maltosa, trehalosa, dextrosa, manosa, rafinosa, lactosa, maltodextrina, dextrano, sacarosa, etc., en un intervalo de concentración que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 10% en peso de azúcar, aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% en peso de azúcar, o aproximadamente el 1% a aproximadamente el 3% en peso de azúcar, que incluyen, por ejemplo, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10% en peso de azúcar (por ejemplo, 2% en peso de sacarosa, 2% en peso de trehalosa, o 2% en peso de manosa) basado en la composición. Alcoholes de azúcar a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, manitol, sorbitol, glicol, glicerol, arabitol, eritritol, xilitol, ribitol, lactitol y similares en un intervalo de concentración que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 10% en peso de alcohol de azúcar, aproximadamente 1-5%, aproximadamente 1-3%, que incluye por ejemplo, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o 10% en peso de alcohol de azúcar basado en la composición.

La osmolalidad de las composiciones de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas, es normalmente similar a la osmolalidad en suero de la sangre, que oscila de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 miliosmoles por kilogramo (mOSm/kg) de agua. La concentración de sal en la composición es normalmente inferior a 125 mM. Las concentraciones de sal y azúcar pueden ajustarse o variarse de forma que la osmolalidad de la composición sea de aproximadamente 250-350 mOSm/kg de agua.

Detergentes o emulsionantes a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, polisorbatos tales como Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68 en un intervalo que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,2% en peso de un detergente o emulsionante basado en la composición que incluye, por ejemplo, 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004%, 0,005%, 0,006%, 0,007%, 0,008%, 0,009%, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,075% y 0,1% en peso de detergente o emulsionante (por ejemplo, Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68) basado en la composición.

Las composiciones de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas, pueden comprender un polímero, tal como una molécula de PEG, en una concentración suficiente para reducir o inhibir la asociación no deseada entre dos o más moléculas de la invención tales como, por ejemplo, dos o más dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes de la invención. La composición puede comprender dos o más polímeros diferentes (por ejemplo, PEG). El polímero (por ejemplo, molécula de PEG) tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 8000 Da (por ejemplo, aproximadamente 200, 300, 400, 600, 900, 1000, 1450, 3350, 4500 u 8000 Da, disponible de Dow Chemical). Se cree que la adición de un polímero (por ejemplo, molécula de PEG) a la composición reduce la formación de agregados no deseados, particularmente agregados no deseados de dos o más dímeros de proteínas de fusión de la invención.

Las composiciones de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas, pueden incluir un oligosacárido cíclico tal como una ciclodextrina (por ejemplo, Captisol® (Cydex)). En un aspecto, la composición comprende dos o más oligosacáridos cíclicos diferentes. La adición de oligosacárido(s) cíclico(s) a la composición mejora la solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad y/o dosificación de componente(s) farmacéutico(s) activo(s) (por ejemplo, molécula de CTLA-4 mutante).

El pH de una composición de la invención, que incluye una composición farmacéutica, puede oscilar de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, de

aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,7, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 8,7, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 7,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 6,3 a aproximadamente pH 6,8, de aproximadamente pH 6,4 a aproximadamente pH 6,8, de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0, y aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,4. En un aspecto, las composiciones que comprenden una molécula de la invención, tales como, por ejemplo, una CTLA-4-IgG2 mutante, tienen un pH de pH 5,0, pH 5,1, pH 5,2, pH 5,3, pH 5,4, 5,5, pH 5,6, pH 5,7, pH 5,8, pH 5,9, pH 6,0, pH 6,1, pH 6,2, pH 6,3, pH 6,4, pH 6,5, pH 6,6, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4, pH 7,5, pH 7,6, pH 7,7, pH 7,8, pH 7,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9, pH 9,0, pH 9,1, pH 9,2, pH 9,3, pH 9,4, pH 9,5, pH 9,6, pH 9,7, pH 9,8, pH 9,9 o pH 10,0.

En un aspecto, la invención proporciona una composición de la invención que comprende un excipiente o vehículo (incluyendo, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable) y una cantidad eficaz de cualquier polipéptido CTLA-4, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión de la invención descritos por todas partes y en el presente documento, y que comprende además un tampón que puede mantener el pH de la composición dentro del intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10, agua, opcionalmente un detergente no iónico, opcionalmente una sal y opcionalmente un alcohol de azúcar, monosacárido, disacárido o polisacárido. Algunas de tales composiciones están a un pH fisiológico. Algunas de tales composiciones tienen un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7,5, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5, o de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,6 que incluyen, por ejemplo, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,4 o pH 7,5. Algunas de tales composiciones comprenden un tampón en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, que incluyen, por ejemplo, aproximadamente 20 mM, 25 mM, o 30 mM. Algunas de tales composiciones comprenden un tampón seleccionado del grupo que consiste en un tampón HEPES, tampón citrato, tampón succinato, tampón acetato, tampón citrato, tampón maleato, tampón fosfato y tampón Tris. Algunas de tales composiciones comprenden un tampón que está seleccionado del grupo que consiste en un tampón HEPES, tampón citrato de sodio y tampón succinato de sodio. Para algunas de tales composiciones, el pH es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,7 y el tampón es succinato de sodio o citrato de sodio. Para algunas de tales composiciones, el pH es aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,7 y el tampón es HEPES. Algunas de tales composiciones comprenden además un alcohol de azúcar o sacárido, en el que el sacárido es un monosacárido, disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) o polisacárido. Algunas de tales composiciones comprenden una sal presente en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 20 mM, 25 mM o 30 mM. Algunas de tales composiciones comprenden un detergente no iónico tal como, por ejemplo, un detergente no iónico seleccionado del grupo que consiste en el grupo que consiste en Tween®-80, Tween®-60, Tween®-40, Tween®-20 o Pluronic F-68.

En algunas de tales composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) descritas en el párrafo anterior, el polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión está presente a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml (peso/volumen o p/v) a aproximadamente 200 mg/ml (p/v), aproximadamente 25 mg/ml (p/v) a aproximadamente 100 mg/ml (p/v), aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, opcionalmente aproximadamente en un intervalo de aproximadamente 50 mg/ml (p/v) a aproximadamente 100 mg/ml (p/v). Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, y la composición se administra a un mamífero (por ejemplo, ser humano). Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, y la composición se administra parenteralmente. Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, y opcionalmente aproximadamente 0,5 mg/kg, y la composición se administra subcutáneamente. Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg (opcionalmente aproximadamente 10 mg/kg), y la composición se administra intravenosamente. Para algunas de tales composiciones, el polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 36. Para algunas de tales composiciones, el polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión o dímero de proteínas de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 50. Algunas de tales composiciones son estériles y/o son isotónicas con la sangre. Algunas de tales composiciones son composiciones líquidas. Algunas de tales composiciones están en una forma líquida o secada, en las que la forma secada está seleccionada del grupo que consiste en una forma liofilizada, una forma secada al aire y una forma secada por pulverización.

En un aspecto a modo de ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (i) una proteína de fusión CTLA-4-Ig de la invención que tiene una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml, etc.) (opcionalmente una proteína de fusión dimérica); (ii) un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento de entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 9,0 a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM; (iii) un diluyente farmacéuticamente aceptable para llevar la composición a un volumen designado; (iv) un azúcar a una concentración de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 10% en peso de azúcar basado en la composición; (v) una sal a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM; (vi) opcionalmente un detergente no iónico (por ejemplo, Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68) a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,1 mg/ml; y (vii) opcionalmente un oligosacárido cíclico (por ejemplo, ciclodextrina (Captisol®), en el que el pH de la composición está en un intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 8,0. Proteínas de fusión CTLA-4-Ig a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222 (opcionalmente, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 197, 199, 211 y 213), en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de los mismos y/o suprime una respuesta inmunitaria. Tales proteínas de fusión pueden estar en forma monomérica o dimérica.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (i) un conjugado que comprende una proteína de fusión CTLA-4-Ig de la invención (opcionalmente una proteína de fusión dimérica) y un resto de no polipéptido covalentemente unido a la proteína de fusión, teniendo dicho conjugado una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml, etc.); (ii) un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento de entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 8,0 a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM; (iii) un diluyente farmacéuticamente aceptable para llevar la composición a un volumen designado; (iv) un azúcar a una concentración de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 10% en peso de azúcar basado en la composición; (v) una sal a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM; y (vi) opcionalmente un detergente no iónico (por ejemplo, Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68) a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,1 mg/ml, en el que el pH de la composición está en un intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 8,0. El conjugado puede comprender uno, dos, tres, cuatro o más restos de no polipéptido. Cada resto de no polipéptido puede comprender un polímero (por ejemplo, PEG o PAO) o un resto de azúcar. En algunos casos, el resto de no polipéptido es una molécula de polímero tal como una molécula de PEG. La molécula de polímero puede tener cualquier peso molecular deseado dependiente del efecto funcional deseado (por ejemplo, aumento de semivida, disminución de la asociación entre moléculas de la proteína de fusión, etc.). En algunos casos, por ejemplo, el polímero es un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa (por ejemplo, 1, 2, 2,5, 3, 5, 8, 10, 12, 20, 25, 30, 40, 60 kDa, etc.). El resto de no polipéptido (por ejemplo, resto de azúcar o molécula de polímero) se une covalentemente a un grupo de unión de un residuo de aminoácido de la proteína de fusión usando procedimientos convencionales como se ha descrito anteriormente. Proteínas de fusión CTLA-4-Ig a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222 (opcionalmente, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 197, 199, 211 y 213), en las que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de los mismos y/o suprime una respuesta inmunitaria. Tales proteínas de fusión pueden estar en forma monomérica o dimérica.

En un aspecto a modo de ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml de una proteína de fusión CTLA-4-Ig de la invención (por ejemplo, D3-54-IgG2) (por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 50 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml) que está normalmente expresada como una proteína de fusión dimérica, en tampón HEPES 20 mM en agua, NaCl 100 mM, 2% en peso de sacarosa basado en la composición, pH 7,4, que opcionalmente incluye un detergente no iónico (por ejemplo, Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68) a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,1 mg/ml, y que opcionalmente incluye un polietilenglicol (PEG), tal como una molécula de PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 200 Dalton (Da) a aproximadamente 8000 Da (por ejemplo, aproximadamente 200, 300, 400, 600, 900, 1000, 1450, 3350, 4500 u 8000 Da, disponible de Dow Chemical). En otro aspecto a modo de ejemplo, la divulgación incluye una composición farmacéutica que comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml de una proteína de fusión CTLA-4-Ig (por ejemplo, D3-69-IgG2) que normalmente está expresada como una proteína de fusión dimérica, en tampón citrato de sodio 20 mM en agua, NaCl 100 mM, 2% en peso de sacarosa basado en la composición, pH 6,5, que opcionalmente incluye un detergente no iónico (por ejemplo, Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68) a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente

0,5 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,1 mg/ml, y que opcionalmente incluye una molécula de PEG tal como una molécula de PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 8000 Da (por ejemplo, aproximadamente 200, 300, 400, 600, 900, 1000, 1450, 3350, 4500 u 8000 Da, disponible de Dow Chemical).

5 En el presente documento se desvelan receptáculos para contener una composición de la invención que comprende una molécula de la invención (por ejemplo, molécula de CTLA-4 mutante tal como una CTLA-4-Ig mutante) y un excipiente, diluyente o vehículo. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende una molécula de la invención y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los receptáculos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, viales (por ejemplo, vial de vidrio tal como un vial de vidrio tipo I),
10 autoinyectores, inyectores de pluma (dosis fija o dosis variable) y jeringuillas precargadas, u otros recipientes adecuados. Si se desea, un receptáculo puede contener una o más dosis pre-determinadas de la molécula de la invención eficaces para suprimir una respuesta inmunitaria o tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario como se describe en otra parte en el presente documento. Algunos de tales receptáculos son útiles para administración de la composición contenida en su interior a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno
15 inmunitario (por ejemplo, autoinyectores, inyectores de pluma, jeringuillas precargadas, etc.). Algunos de tales receptáculos permiten la autoadministración de la composición por el sujeto (por ejemplo, inyectores de pluma, autoinyectores, jeringuillas precargadas, etc.).

También se proporcionan composiciones o formulaciones estables de una molécula (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante) de la invención que incluyen composiciones farmacéuticamente aceptables de una
20 molécula de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la invención incluye composiciones o formulaciones secadas por congelación o liofilizadas. El término "secado por congelación" o "liofilizado" generalmente se refiere al estado de una sustancia que ha sido sometida a un procedimiento de secado tal como secado por congelación o liofilización, en el que se ha eliminado al menos el 50% de humedad. Los procedimientos de pre-liofilización y liofilización son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo,
25 LYOPHILIZATION OF BIOPHARMACEUTICALS, vol. 2 de BIOTECHNOLOGY: PHARMACEUTICAL ASPECTS (Henry R. Costantino y col. eds., 2004), documentos U.S. 6.436.897, WO 06/104852), y serían fácilmente entendidos por un experto. Cualquier procedimiento de liofilización adecuado puede emplearse o modificarse según convenga por un experto en la materia en la preparación de la composición liofilizada de la invención. Una composición secada por congelación, secada al aire, secada por pulverización o liofilizada se prepara normalmente a partir de un líquido, tal como una disolución, suspensión, emulsión, etc. El líquido a secar por congelación, secar al aire, secar por
30 pulverización o liofilizar normalmente incluye todos los componentes (excepto el líquido, por ejemplo, agua) que van a estar en la composición líquida reconstituída final. De esta forma, la composición secada por congelación, secada al aire, secada por pulverización o liofilizada tendrá la composición líquida deseada (por ejemplo, composición farmacéutica) cuando se reconstituya. Composiciones a modo de ejemplo de la invención, que incluyen
35 composiciones farmacéuticas, que comprenden una molécula de la invención (por ejemplo, proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención tal como, por ejemplo, SEC ID N°: 197, 199, 211 ó 213), que se describen en toda la presente solicitud, pueden secarse por congelación, secarse al aire, secarse por pulverización o liofilizarse para producir una composición secada por congelación, secada al aire, secada por pulverización o liofilizada estable, respectivamente, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los
40 procedimientos a modo de ejemplo descritos en LYOPHILIZATION OF BIOPHARMACEUTICALS, arriba.

Por ejemplo, un recipiente (por ejemplo, vial, tal como un vial de vidrio) que contiene una molécula de composición líquida de la divulgación (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante, proteína de fusión de la invención tal como, por ejemplo, SEC ID N°: 197, 199, 211 ó 213) a liofilizar puede liofilizarse usando procedimientos convencionales conocidos para
45 aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, LYOPHILIZATION OF BIOPHARMACEUTICALS, arriba. La molécula liofilizada de la invención (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante de la invención) puede reconstituirse posteriormente con un líquido para generar una composición líquida reconstituída. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen normalmente mediante la adición de una disolución acuosa para disolver la formulación liofilizada. Puede usarse cualquier disolución líquida o acuosa adecuada para reconstituir una formulación liofilizada. Una formulación liofilizada se reconstituye frecuentemente usando agua estéril o destilada, pero para la reconstitución
50 pueden usarse disoluciones que comprenden vehículos, excipientes, tampones diluyentes y/u otros componentes, que incluyen aquellos descritos en todo el presente documento.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma liofilizada, en el que la composición comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml de una proteína de fusión CTLA-4-Ig de la invención, que está normalmente expresada como una proteína de fusión dimerica, en tampón apropiado (por
55 ejemplo, HEPES, citrato de disodio-citrato de trisodio, etc.) en agua a una concentración para mantener el pH deseado (por ejemplo, aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 7,5), sal (por ejemplo, NaCl 50 mM), azúcar (por ejemplo, 4-6% en peso de sacarosa basado en la composición), y que opcionalmente incluye un detergente no iónico (Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68) a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/ml a
60 aproximadamente 0,1 mg/ml (por ejemplo, Tween®-20, Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68). Una forma liofilizada de una farmacéutica normalmente incluye una menor concentración de sales y una mayor concentración de azúcar en comparación con una composición líquida no liofilizada.

En un aspecto particular, la invención proporciona una composición liofilizada estable para administración terapéutica tras la reconstitución con agua estéril que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de la invención y opcionalmente uno o más de los siguientes componentes farmacéuticamente aceptables:

5 (a) un azúcar o sacárido tal como una sacarosa, manosa, dextrosa o trehalosa en una cantidad de aproximadamente el 1% en peso a aproximadamente el 10% en peso; (b) un detergente o emulsionante tal como Tween®-20, Tween®-40 Tween®-60, Tween®-80 o Pluronic F-68; (c) un agente isotónico o sal, tal como una sal inorgánica (por ejemplo, cloruro sódico) en una concentración de 0 mM a aproximadamente 50 mM (incluyendo, por ejemplo, las concentraciones expuestas anteriormente; (d) un tampón adecuado para mantener el pH de la composición dentro de un intervalo que es propicio para la estabilidad de la molécula; (e) agente dispersante (por ejemplo, en una cantidad suficiente para la dispersión a largo plazo de la molécula de la invención tal como, por ejemplo, del 0,001% p/v a aproximadamente el 1,0% en p/v) (por ejemplo, polisorbato tal como Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60 o Tween®-80 o Pluronic F-68); y (f) un estabilizador (por ejemplo, sacárido, dextranos, grupo de PEG de bajo peso molecular (MW) tal como PEG que tiene MW de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 8000 Da (por ejemplo, 200, 300, 400, 600, 900, 1000, 1450, 3350, 4500 u 8000 Da) o conservante. En algunas de tales composiciones liofilizadas estables, la molécula es una proteína de fusión recombinante o aislada de la invención, tal como una proteína de fusión que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencias con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222 (opcionalmente, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 197, 199, 211 y 213), en las que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de los mismos y/o suprime una respuesta inmunitaria. Tales proteínas de fusión pueden estar en forma monomérica o dimérica.

Cantidades a modo de ejemplo de cada tal componente en la composición liofilizada incluyen aquellas descritas anteriormente y en el presente documento. En un aspecto, el tampón está seleccionado de forma que mantenga el pH de la composición dentro de un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 7,5. Una composición liofilizada de la invención que comprende una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante recombinante de la invención es normalmente estable a -80° a +40°C y/o sustancialmente mantiene su actividad biológica durante al menos un semana, uno o más meses (por ejemplo, seis meses), un año, dos años, tres años, cuatro años o más cuando se guarda a temperaturas ambiente (por ejemplo, aproximadamente 22°C a aproximadamente 30°C). Tras la reconstitución con un líquido (por ejemplo, agua estéril para inyección (API)), la composición liofilizada es adecuada para administración (por ejemplo, i.v., s.c., parenteral, i.m., i.d., i.p., etc.) a un sujeto (por ejemplo, ser humano).

En el presente documento se desvela un kit que comprende una composición liofilizada o secada por congelación que comprende una molécula liofilizada o secada por congelación de la divulgación (por ejemplo, proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante tal como, por ejemplo, SEC ID N°: 197, 199, 211 ó 213) en un primer recipiente (por ejemplo, vial, tal como un vial de vidrio) e instrucciones para reconstituir la composición secada por congelación o liofilizada usando un líquido (por ejemplo, agua estéril, API o tampón). Opcionalmente, el kit comprende además un segundo recipiente (por ejemplo, vial, tal como un vial de vidrio) que contiene una cantidad suficiente de líquido (por ejemplo, agua estéril, API o tampón) para reconstitución de la composición liofilizada o secada por congelación en una composición líquida. En este caso, la reconstitución se logra usando una jeringuilla para eliminar un volumen deseado de agua del segundo recipiente y para introducir el agua en el primer recipiente. Entonces, el primer recipiente entonces se agita suavemente con balanceo para poner la molécula de la invención (por ejemplo, proteína de fusión) en disolución. El kit puede incluir un dispositivo(s) para reconstituir la composición liofilizada o secada por congelación y/o administrar la composición líquida reconstituida. Dispositivos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una jeringuilla mixta de dos componentes, jeringuilla de doble cámara y autoinyector de doble cámara. Un componente o cámara contiene la composición liofilizada y el segundo componente o cámara contiene el líquido para reconstitución. Con tales dispositivos, la reconstitución se lleva a cabo normalmente justo antes de la administración, y la composición reconstituida se administra normalmente parenteralmente (por ejemplo, inyección s.c., i.v., i.m., i.d.).

La composición o composición farmacéutica de la invención puede comprender o estar en forma de un liposoma. Lípidos adecuados para formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de tales formulaciones liposómicas se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.837.028 y 4.737.323.

La forma de las composiciones o composición farmacéutica puede dictarse, al menos en parte, por la vía de administración del polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP o célula de interés. Debido a que son posibles numerosas vías de administración, la forma de la composición farmacéutica y sus componentes puede variar. Por ejemplo, en administración transmucosa o transdérmica, en la composición pueden incluirse penetrantes apropiados a la barrera que va a permearse. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. A diferencia, la administración transmucosa puede facilitarse mediante el uso de esprays nasales o supositorios.

Una forma de administración común para composiciones de la invención, que incluye composiciones farmacéuticas, es mediante inyección. Las composiciones farmacéuticamente aceptables inyectables normalmente comprenden uno o más vehículos líquidos adecuados tales como agua, petróleo, solución salina fisiológica, agua bacteriostática,

5 Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ), PBS o aceites. Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden incluir adicionalmente solución salina fisiológica, dextrosa (u otra disolución de sacárido), alcoholes (por ejemplo, etanol), polioles (polialcoholes tales como manitol, sorbitol, etc.) o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol, moléculas de PEG, agentes de recubrimiento que promueven la fluidez apropiada tales como lecitina, agentes isotónicos tales como manitol o sorbitol, ésteres orgánicos tales como oleato de etilo y agentes retardantes de la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatinas. La composición inyectable puede estar en forma de una disolución acuosa estable sin pirógenos. Una disolución acuosa inyectable puede comprender un vehículo isotónico tal como cloruro sódico, disolución para inyección de Ringer, dextrosa, disolución para inyección de Ringer con lactato o un vehículo de administración equivalente (por ejemplo, disolución para inyección de cloruro sódico/dextrosa).

10 Formulaciones adecuadas para inyección por vías intraarticular, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subdérmica, intraperitoneal y subcutánea incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden incluir disolventes, co-disolventes, antioxidantes, agentes reductores, agentes quelantes, tampones, bacteriostáticos, conservantes antimicrobianos y vías que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto (por ejemplo, PBS y/o soluciones salinas tales como NaCl 0,1 M), y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

20 La administración de un polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, pseudovirus, VLP o célula de la invención (o una composición que comprende cualquier tal componente) puede facilitarse por un dispositivo de administración formado de cualquier material adecuado. Ejemplos de materiales de matriz adecuados para producir dispositivos de administración no biodegradables incluyen hidroxiapatita, biovidrio, aluminatos u otros cerámicos. En algunas aplicaciones puede usarse un agente secuestrante tal como carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) para unir el componente particular al dispositivo para administración localizada.

25 Un ácido nucleico o vector de la invención puede formularse con uno o más poloxámeros, copolímeros de bloques de polioxietileno/polioxipropileno u otros tensioactivos o sustancias lipófilas similares a jabón para la administración del ácido nucleico o vector a una población de células o tejido o piel de un sujeto. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.149.922, 6.086.899 y 5.990.241.

30 Los ácidos nucleicos y vectores de la invención pueden asociarse a uno o más agentes potenciadores de la transfección. En algunas realizaciones, un ácido nucleico y/o vector de ácidos nucleicos de la invención normalmente están asociados a una o más sales promotoras de la estabilidad, vehículos (por ejemplo, PEG) y/o formulaciones que ayudan en la transfección (por ejemplo, sales de fosfato de sodio, vehículos de dextrano, vehículos de óxido de hierro o vehículos de administración biolística ("pistola de genes") tales como vehículos de perlas o polvo de oro). Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.945.050. Agentes potenciadores de la transfección adicionales incluyen partículas víricas con las que el ácido nucleico o vector de ácidos nucleicos puede conjugarse, un agente precipitante de fosfato de calcio, una proteasa, una lipasa, una disolución de bipivacaína, una saponina, un lípido (por ejemplo, un lípido cargado), un liposoma (por ejemplo, un liposoma catiónico), un péptido que facilita la transfección o complejo de proteína (por ejemplo, una poli(etilenimina), polilisina, o complejo de proteína vírica-ácido nucleico), un virosoma o una célula modificada o estructura similar a célula (por ejemplo, una célula de fusión).

40 Los ácidos nucleicos y vectores de la invención también pueden administrarse por procedimientos de electroporación *in vivo* o *ex vivo* que incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.110.161 y 6.261.281, y Widera y col., J. of Immunol. 164:4635-4640 (2000).

45 La administración transdérmica de un componente de la invención (por ejemplo, polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP y/o célula de la invención) puede facilitarse por un parche transdérmico que comprende tal componente en cualquier composición adecuada en cualquier forma adecuada. Tales dispositivos de parche transdérmico se proporcionan por la invención. Por ejemplo, tal componente puede estar contenido en un depósito de líquido en un dispositivo de parche de depósito de fármaco o, alternativamente, el componente puede dispersarse por todo un material adecuado para la incorporación en un simple dispositivo de parche transdérmico monolítico. Normalmente, el parche comprende una cantidad inmunosupresora de al menos un componente tal - tal como una cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto puesto en contacto con el parche. Ejemplos de tales dispositivos de parche se conocen en la técnica. El dispositivo de parche puede ser tanto un dispositivo pasivo como un dispositivo que puede administrar iontoforéticamente al menos un componente tal a la piel o tejido del sujeto.

55 Una composición, particularmente una composición farmacéutica, puede comprender cualquier dosis adecuada de al menos un componente tal de la invención (por ejemplo, polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP y/o célula) suficiente para lograr la respuesta inmunosupresora deseada en un sujeto tras la administración. La dosificación apropiada puede determinarse por cualquier técnica adecuada y consideraciones para determinar la apropiada se conocen en la técnica. En una simple pauta de prueba de dosificación, dosis bajas de la composición se administran a un sujeto o sistema de prueba (por ejemplo, un modelo animal, sistema sin células o sistema de ensayo de células completas). La dosificación se determina comúnmente por la eficacia del componente particular a administrar, la condición del sujeto, el peso corporal del sujeto y/o área diana del sujeto que va a tratarse. El tamaño de la dosis también se determina por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que

acompañe la administración de cualquier componente particular tal en un sujeto particular. Los principios relacionados con la dosificación de agentes terapéuticos y profilácticos se proporcionan en, por ejemplo, Platt, Clin. Lab Med. 7:289-99 (1987), "Drug Dosage", J. Kans. Med. Soc. 70(1):30-32 (1969), y otras referencias descritas en el presente documento (por ejemplo, Remington's, arriba).

5 A modo de ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención para una dosificación inicial para tratar una enfermedad autoinmunitaria puede comprender de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto o, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso del sujeto a al menos aproximadamente 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 ó 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Tal dosificación puede ser por cualquier protocolo adecuado, por ejemplo, tal como administrada diariamente, semanalmente o bisemanalmente, o cualquier combinación de las mismas (por ejemplo, en aproximadamente 0, 1, 2, 4, 5, 6 y 7 días, semanalmente después, o en aproximadamente 0, 1, 2, 4 y 6 semanas), seguido de intervalos de 1, 2, 3 meses y por cualquier procedimiento de administración adecuado tal como, por ejemplo, por electroporación o una inyección subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.), subdérmica, transdérmica, parenteral, o intradérmica (i.d.). En algunos casos, un polipéptido de la invención se administra normalmente como un polipéptido soluble tal como, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la invención ligado covalentemente a un polipéptido del Fc de Ig. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable puede administrarse por cualquier vía apropiada (por ejemplo, intradérmicamente, intravenosamente o subcutáneamente) en una cantidad eficaz que depende de la enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide) o afección que va a tratarse (por ejemplo, para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano sólido de un donante por el sujeto receptor).

25 En el presente documento se desvela un procedimiento de supresión de una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, que incluye de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml (por ejemplo, 50 ó 100 mg/ml) de proteína de fusión D3-54-IgG2 en tampón HEPES 20 mM en agua, NaCl 100 mM, 2% en peso de sacarosa, pH 7,4, en el que el sujeto padece un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide). En el presente documento se desvela un procedimiento para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano sólido de un donante en un sujeto receptor que comprende administrar al sujeto receptor una composición farmacéutica que comprende de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml (por ejemplo, 50 ó 100 mg/ml) de proteína de fusión D3-69-IgG2 en tampón citrato de sodio 20 mM en agua, NaCl 100 mM, 2% en peso de sacarosa, pH 6,5.

35 También se proporciona una composición de vector vírico que comprende un vehículo o excipiente y un vector vírico de la invención. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y un vector vírico. La cantidad o dosificación de partículas de vector vírico o ácido nucleico que codifica partículas de vector vírico depende de: (1) el tipo de partícula de vector vírico con respecto al origen de vector que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, si el vector es un vector alfavírico, vector vírico del bosque de Semliki, vector adenovírico, vector vírico adenoasociado (AAV), vector flavivírico, vector vírico del papiloma y/o vector vírico del herpes simple (VHS), (2) si el vector es un vector que expresa transgén o que expresa péptido recombinante, (3) el huésped, y (4) otras consideraciones tratadas anteriormente. Generalmente, con respecto a vectores de transferencia de genes, la composición farmacéuticamente aceptable comprende al menos aproximadamente 1×10^2 partículas de vector vírico en un volumen de aproximadamente 1 ml (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^2 a 1×10^8 partículas en aproximadamente 1 ml). También pueden ser adecuadas mayores dosificaciones (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} partículas/ml).

La invención también proporciona una composición (incluyendo una composición farmacéutica) que comprende un agregado de dos o más polipéptidos o conjugados de la invención. Además, la invención proporciona una composición (incluyendo una composición farmacéutica) que comprende una población de uno o más polipéptidos multiméricos o conjugados multiméricos de la invención. Como se observa anteriormente, las composiciones farmacéuticas incluyen un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no deben interpretarse como limitantes de su ámbito de ningún modo.

Ejemplo 1

Este ejemplo proporciona una descripción de los procedimientos para crear una proteína de fusión LEA29Y-Ig, que se usó como control y para fines comparativos en la unión a Biacore™ y ensayos de actividad basados en células.

Creación de vector de plásmido de ADN que codifica la proteína de fusión LEA29Y-Ig.

Este ejemplo describe la preparación de un vector de plásmido de ADN que codifica la proteína de fusión LEA29Y-Ig. LEA29Y-Ig comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante conocido específico llamado "LEA29Y" (o "LEA" o "L104EA29Y" o "A29YL104E") que está covalentemente ligado en su extremo C al extremo N de un polipéptido del Fc de IgG1 humana mutante específico. El polipéptido LEA29Y es un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos del dominio extracelular de CTLA-4 humano por dos mutaciones - una sustitución A29Y y una sustitución L104E - en la que las posiciones 29 y 104 están numeradas por referencia a la secuencia de polipéptidos del polipéptido del ECD de CTLA-4 humano, designándose el primer residuo de aminoácido de CTLA-4 humano el residuo de la posición de aminoácido 1. Véase el documento U.S. 7.094.874. El vector de plásmido pcDNA3.1-LEA, que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica LEA29Y-Ig, se creó para producir esta proteína de fusión.

El ADN que codifica LEA29Y-Ig es creado por ensamblaje de PCR usando oligonucleótidos de solapamiento designados basándose en la homología de secuencias con la secuencia de nucleótidos que codifica LEA29Y-Ig mostrada en SEC ID N°: 167. Los oligonucleótidos se diseñan, preparan y ensamblan usando procedimientos convencionales muy conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden incluir codones de terminación e iniciación y sitios de restricción según sea necesario. Los procedimientos de amplificación por PCR empleados también son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Berger, Ausubel y Sambrook, todos arriba.

Los oligonucleótidos se ensamblan en una reacción de PCR de 100 µl con oligonucleótidos 1 µM, 1x tampón Taq (Qiagen; n° 201225) y dNTP 200 µM durante 30 ciclos de amplificación (94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 60 s). El ADN amplificado se purifica por columnas de centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen, n° de cat. 28104) y se digiere con enzimas de restricción *NheI* y *SacII*. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, n° 28704) según recomendación del fabricante y se ligaron en plásmido similarmente digerido pcDNA 3.1(+) (Invitrogen, n° de cat. V790-20). Las ligaciones se transforman en células de *E. coli* TOP10 (Qiagen, n° de cat. C4040-10) según recomendaciones del fabricante. Las células resultantes se incuban durante la noche a 37°C en medio LB que contiene 50 µg/ml de carbenicilina con agitación a 250 rpm y luego se usan para preparar un caldo de maxiprep (Qiagen; n° 12362) de ADN de plásmido (denominado en lo sucesivo vector de plásmido pcDNA3.1-LEA).

El vector de plásmido pcDNA3.1-LEA es idéntico al vector de plásmido vector de CTLA-4-IgG2 mutante de pcDNA mostrado en la Figura 1, excepto que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido CTLA-4-IgG2 mutante ha sido sustituida por una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión LEA29Y-Ig. Un ácido nucleico que codifica el péptido señal de CTLA-4 humano se incluyó como la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal.

Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión LEA29Y-Ig predicha se muestra en SEC ID N°: 167. SEC ID N°: 167 incluye la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (por ejemplo, residuos de aminoácidos 1-37 de SEC ID N°: 165). Las secuencias de polipéptidos de la proteína de fusión LEA29Y-Ig predicha y LEA29Y-Ig madura (sin el péptido señal) se muestran en SEC ID N°: 165 y 166, respectivamente. Como se indica en la Figura 2C, la secuencia de aminoácidos de LEA29Y-Ig predicha incluye los siguientes segmentos: el péptido señal previsto (residuos de aminoácidos 1-37), el ECD del polipéptido LEA29Y (residuos de aminoácidos 38-161), ligador (residuo de aminoácido 162) y un dominio Fc mutante (modificado) de un polipéptido de IgG1 humana (residuos de aminoácidos 163-394). Los residuos de aminoácidos en las uniones entre estos diversos segmentos también se muestran en la Figura 2C. Específicamente se muestran los cuatro últimos residuos de aminoácidos del péptido señal, los cinco primeros y los cinco últimos residuos de aminoácidos del ECD de LEA29Y, el único residuo de aminoácido del ligador (Q) y los cinco primeros y los cinco últimos residuos de aminoácidos del polipéptido del Fc de IgG1 mutante.

El péptido señal se escinde normalmente durante el procesamiento y, por tanto, la proteína de fusión secretada (es decir, la proteína de fusión madura) de LEA29Y-Ig no contiene normalmente la secuencia de péptidos señal. La forma madura/secretada de LEA29Y-Ig, que tiene un total de 357 aminoácidos, comprende los residuos de aminoácidos 38-394 (la secuencia de longitud completa sin el péptido señal) de la secuencia predicha mostrada en SEC ID N°: 165, y empieza con la secuencia de aminoácidos: metionina-histidina-valina-alanina. SEC ID N°: 165 incluye el péptido señal (por ejemplo, residuos 1-37) en su extremo N; el péptido señal se escinde normalmente para formar la proteína madura mostrada en SEC ID N°: 166. Si se desea, los aminoácidos de la forma madura pueden enumerarse empezando con la Met de la secuencia de Met-His-Val-Ala, que designa Met como el primer residuo (por ejemplo, el ECD comprende los residuos de aminoácidos numerados 1-124), como en la proteína de fusión madura LEA29Y-Ig que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 166. En un aspecto, la secuencia de SEC ID N°: 165 ó 166 no incluye el residuo de lisina del extremo C; este residuo puede escindirse durante el procesamiento o antes de la secreción.

La secuencia de proteínas de la proteína de fusión LEA29Y-Ig se describe en el documento U.S. 7.094.874. Específicamente, SEC ID N°: 4 del documento U.S. 7.094.874 muestra una secuencia de proteínas que codifica la forma no madura de LEA29Y-Ig monomérica. En el documento U.S. 7.094.874, la proteína de fusión LEA29Y-Ig se llama "L104EA29YIg". La proteína de fusión madura LEA29Y-Ig que comprende la secuencia mostrada en SEC ID

Nº: 166 expuesta en el presente documento se diferencia de la secuencia de proteína de fusión mostrada en SEC ID Nº: 4 en el documento U.S. 7.094.874 debido a que la SEC ID Nº: 4 del documento U.S. 7.094.874 incluye un péptido señal (es decir, residuos 1-26 de SEC ID Nº: 4). Este péptido señal se escinde normalmente durante el procesamiento y, por tanto, la forma madura (secretada) de la proteína de fusión LEA29Y-Ig no incluye normalmente la secuencia de péptidos señal. SEC ID Nº: 3 del documento U.S. 7.094.874 presenta una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión LEA29Y-Ig (es decir, LEA29Y-Ig).

LEA29Y-Ig normalmente existe en disolución como una proteína de fusión dimerica que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión LEA29Y-Ig madura monomérica comprende un polipéptido del ECD de LEA29Y (SEC ID Nº: 168) fusionado en su extremo C con el extremo N de un Fc de IgG1 mutante (SEC ID Nº: 186). Los dos monómeros de LEA29Y-Ig están ligados covalentemente juntos por enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en cada monómero, formándose así el dímero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig. El dímero LEA29Y-Ig es la forma de la molécula de la proteína de fusión usada en los ensayos descritos en estos ejemplos, a menos que se establezca explícitamente de otro modo.

Creación de la línea celular CHO-K1 estable que expresa la proteína de fusión LEA29Y-Ig.

Se creó una línea celular estable para generar cantidades de múltiples miligramos de la proteína de fusión LEA29Y-Ig tratada anteriormente.

Transfección de células CHO-K1.

Se sembraron células CHO-K1 a una densidad de 1×10^6 en matraces T-175 (BD Falcon, nº 353112) que contenían 40 ml de medio de crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, nº 10565-018) complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Hyclone, nº SV30014.03) y 1x PS (penicilina + estreptomycin) (Invitrogen, nº 15140-122)). Las células se incubaron durante 24 horas (h) a 37°C y luego se transfectaron con 10 µg de ADN de plásmido Maxiprep (por ejemplo, vector de plásmido que codifica LEA29Y-Ig como se ha descrito anteriormente) mezclado con 60 µl de Fugene 6 (Roche, nº 11814443001) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células se incubaron durante 2 días (d) a 37°C en medio de crecimiento y luego durante 10 d en medio de selección (medio de crecimiento que contiene 300 µg/ml de geneticina (Invitrogen, nº 10131-027), cambiando los medios cada 2 d. El medio se eliminó y las células se dispersaron mediante adición de 3 ml de tripsina al 0,05% (Invitrogen, nº de cat. 25300-054) e incubación a 37°C durante 3 min. Las células dispersadas se diluyeron en 10 ml de medio de crecimiento y se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (TA) en un rotor GH-3.8 (Beckman Coulter, nº 360581). Después de desechar el sobrenadante, las células se suspendieron en 1 ml de medio de crecimiento, se filtraron a través de membranas de 40 µm (BD Falcon, nº 352340) y se ajustaron a una densidad de 1×10^6 células/ml.

Separación de clones únicos.

Usando un clasificador de células (Dako, MoFlo), células vivas se dispersaron individualmente en placas de cultivo de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, nº CLS-3596) que contenían 200 µl/pocillo de medio de crecimiento que contenía 25% de medio acondicionado (medio de crecimiento previamente recogido de cultivos celulares sin transfectar (o sin tratamiento previo)). Después de la incubación a 37°C durante 10-14 d, las células se dispersaron por hidrólisis con tripsina y se transfirieron a nuevas placas de cultivo que contenían 200 µl/pocillo de medio de crecimiento. Las células se cultivaron a 37°C en medio de crecimiento hasta que la densidad de células alcanzó el 70% de confluencia (aproximadamente 14 d, con medio cambiado cada 7 d).

Identificación de clones deseados.

Los clones que expresan altos niveles de proteína de fusión LEA29Y-Ig recombinante se identificaron por transferencia puntual y análisis Western. Para análisis de transferencia puntual, 100 µl de medio se recogieron de cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman, nº 10439388) según las recomendaciones del fabricante. Las membranas se lavaron dos veces con 200 ml de PBST (PBST es solución salina tamponada con fosfato (PBS) + 0,05% de Tween®-20) durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y luego se incubaron con PBST que contenía 5% de leche desnatada en polvo (EMD, nº 1.15363.0500) durante 1 hora (h) a TA. Las membranas se lavaron como se ha descrito anteriormente y se incubaron durante 1 h a TA en 20 ml de PBST que contenía anticuerpo de cabra dirigido contra Ig humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Vector Labs, nº BA-3000) diluido a 1:4000. Las membranas se lavaron como se ha descrito anteriormente y se incubaron durante 1 h a TA con PBST que contenía reactivo de estreptavidina-HRP (BD Biosciences, nº 554066) diluido 1:2000. Las membranas se lavaron como se ha descrito anteriormente y se detectaron señales usando reactivo de detección de transferencia Western ECL (Amersham, nº de cat. RPN2132) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Los clones positivos identificados por alta intensidad de señal (es decir, que expresan altos niveles de proteína de fusión) se dispersaron por hidrólisis con tripsina y se transfirieron a placas de cultivo de 6 pocillos (BD Falcon, nº de cat. 353046) que contenían 2 ml/pocillo de medio de crecimiento. Después de la incubación a 37°C durante 3-4 d, las células se dispersaron por hidrólisis con tripsina y se transfirieron a matraces T-75 (BD Falcon, nº de cat. 353136) que contenían 20 ml de medio de crecimiento. Después de la incubación a 37°C durante 2 d, 100 µl de medio se recogieron y se analizaron para

niveles de expresión de proteínas por análisis Western. Para análisis Western, cantidades iguales (15 µl) de medio de cada cultivo celular se ejecutaron mediante 4-12% de geles bis-Tris NuPAGE (Invitrogen, nº NP0322BOX) en tampón de electroforesis MES (MES es ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, pH 7,3) (Invitrogen, nº NP0002) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las proteínas se transfirieron de geles a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, nº de cat. LC2001) por electrotransferencia según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las membranas se procesaron como se ha descrito anteriormente para transferencia puntual y los clones positivos (que expresan la proteína de fusión de interés) se identificaron por intensidad de señal y peso molecular aparente. Los clones positivos se dispersaron por hidrólisis con tripsina como se ha descrito anteriormente y se propagaron en matraces T-175 que contenían 40 ml de medio de crecimiento.

10 Producción y purificación de la proteína de fusión LEA29Y-Ig.

Propagación de cultivos en botella rotatoria.

Una línea celular CHO-K1 estable que había sido transfectada como se ha descrito anteriormente con ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de interés se cultivó a confluencia en matraces T-175 que contenían 40 ml de medio de crecimiento (medio DMEM/F-12 (Invitrogen, nº 10565-018) complementado con 10% de SBF (Hyclone nº SV30014.03) y 1x PS (Invitrogen, nº 15140-122)). Las células se recogieron por incubación en 3 ml de tripsina al 0,05% (Invitrogen, nº de cat. 25300-054) durante 3 min a 37°C, se diluyeron en 12 ml de medio de crecimiento y luego se transfirieron a botellas rotatorias (Corning, nº de cat. 431191) que contenían 250 ml de medio de crecimiento. Después de la incubación de cultivos en botella rotatoria a 37°C en una estufa de incubación rotatoria humidificada durante 2 d, el medio se eliminó y se sustituyó con 250 ml de medio de crecimiento fresco. Los cultivos se incubaron durante 2 d a 37°C y el medio se sustituyó con 250 ml de medio UltraCHO (medio UltraCHO (BioWhittaker, nº de cat. 12-724) complementado con 1/1000 de EX-CYTE (Serologicals Proteins, nº de cat. 81129N) y 1x PS). Después de la incubación durante 2 d a 37°C, el medio se sustituyó con 250 ml de medio UltraCHO fresco. Los cultivos se incubaron durante 2 d a 37°C y el medio se sustituyó con 250 ml de medio de producción (medio DMEM/F-12 complementado con 1/100x ITSA (Life Technologies nº 51300-044), 1/1000x EX-CYTE y 1x PS). Durante la producción, el medio se recogió y se sustituyó con medio de producción fresco cada dos días.

Purificación de proteínas.

El medio de producción de cultivos en botella rotatoria se clarificó por centrifugación a 2500 x g durante 30 min a TA seguido de filtración a través de membranas de 0,2 µm (VWR, nº de cat. 73520-986). Los medios se concentraron 10 veces por filtración de flujo tangencial usando membranas MWCO de 10 kDa (Millipore, nº de cat. P3C010C00) y luego se usaron para cromatografía de afinidad con proteína A usando un sistema de HPLC BioCad vision. La proteína de fusión de Ig se unió a la resina de proteína A Poros 20 (Applied Biosystems, nº de cat. 1-5029-01) en tampón PBS, se lavó con el mismo tampón, se eluyó con tampón ácido cítrico 80 mM (pH 4,0) que contenía cloruro sódico 160 mM y luego se neutralizó mediante la adición de base Tris 2 M. La disolución de proteína se dializó finalmente contra 6 litros (l) de PBS usando membranas MWCO de 10 kDa (Pierce, nº de cat. PI66810).

Ejemplo 2

Este ejemplo describe procedimientos a modo de ejemplo usados para crear y cribar bibliotecas de mutantes de CTLA-4 para actividades de unión de CD80 humano y/o CD86 humano alteradas por expresión en fago.

Proteína de fusión de CD80 humano-Ig.

40 Las proteínas de fusión CD80 humano-Ig ("hCD80-Ig") y CD86 humano-Ig ("hCD86-Ig") se usaron como ligandos en experimentos de inmunopurificación en fago y de ELISA en fago para identificar moléculas de CTLA-4 mutantes que se unen a CD80 humano ("hCD80") y/o CD86 humano ("hCD86") y/o un dominio extracelular de cualquiera de ellos o ambos. Las proteínas de fusión CD80 humano-Ig (también llamadas "hB7.1-Ig" o "hB7-1-Ig") y CD86 humano-Ig (también llamadas "hB2.1-Ig" o "hB2-1-Ig") están disponibles de R&D Systems (Minneapolis, MN).

45 Una secuencia de ácidos nucleicos representativa que codifica la proteína de fusión CD80 humano-IgG1 WT predicha, que comprende el péptido señal de CD80 humano, ECD de CD80 humano y Fc de IgG1 humana, se muestra en SEC ID N°: 172. Las secuencias de polipéptidos predichas y maduras de la proteína de fusión hCD80-IgG1 se muestran en SEC ID N°: 170 y SEC ID N°: 171, respectivamente. La proteína de fusión predicha mostrada en SEC ID N°: 170 comprende ECD de CD80 humano WT covalentemente fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG1 humana e incluye un péptido señal en su extremo N. El péptido señal se escinde normalmente para formar la proteína de fusión CD80-Ig madura mostrada en SEC ID N°: 171.

55 CD80 humano-IgG1 se abrevia normalmente en el presente documento hCD80-Ig. Como se muestra en la Figura 2A, la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión hCD80-Ig (también designada "CD80-IgG1") incluye los siguientes segmentos: el péptido señal previsto (residuos de aminoácidos 1-34), ECD de CD80 humano (residuos de aminoácidos 35-242), ligador (residuos de aminoácidos 243-245) y polipéptido del Fc de IgG1 humana (residuos de aminoácidos 246-476). Los residuos de aminoácidos en las uniones entre estos diversos segmentos se muestran en la Figura 2A. Específicamente se muestran los cuatro últimos residuos de aminoácidos del péptido

señal, los cinco primeros y los cinco últimos residuos de aminoácidos del ECD de CD80 humano, los residuos de aminoácidos del ligador (GVT) y los cinco primeros y los cinco últimos residuos de aminoácidos del polipéptido del Fc de IgG1 humana. En la proteína de fusión CD80-Ig, tres residuos GVT están presentes como un artefacto de clonación (o ligador) entre el extremo C de ECD de CD80 (que termina con los residuos de aminoácidos FPDN) y el extremo N del polipéptido del Fc de IgG1 (que empieza con los residuos de aminoácidos PKSC). Este artefacto de clonación GVT o ligador se muestra en las secuencias de polipéptidos de CD80-Ig predichas y maduras mostradas en SEC ID N°: 170 y 171, respectivamente.

El péptido señal se escinde normalmente durante el procesamiento y, por tanto, la proteína de fusión secretada (es decir, la proteína de fusión madura) de hCD80-Ig no contiene normalmente el péptido señal. La forma madura/secretada de hCD80-Ig, que tiene una total de 442 aminoácidos, comprende los residuos de aminoácidos 35-476 (la secuencia de longitud completa sin el péptido señal) de SEC ID N°: 170 y empieza con la secuencia de residuos de aminoácido: valina-isoleucina-histidina-valina. Si se desea, los aminoácidos de la forma madura pueden enumerarse empezando con la valina (Val) de la secuencia de Val-Ile-His-Val, que designa Val como el primer residuo (por ejemplo, el ECD comprende los residuos de aminoácidos numerados 1-208), como en la forma madura de hCD80-Ig que comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 171.

La proteína de fusión hCD80-Ig normalmente existe en disolución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión hCD80-Ig maduras monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión hCD80-Ig madura monomérica (SEC ID N°: 171) comprende un ECD de CD80 humano (SEC ID N°: 174) fusionado en su extremo C con el extremo N de un Fc de IgG1 humana (SEC ID N°: 185). Los dos monómeros de hCD80-Ig están ligados covalentemente juntos por enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en cada monómero, formándose así el dímero de proteínas de fusión hCD80-Ig. El dímero de proteínas de fusión hCD80-Ig es la forma de la molécula de proteína de fusión usada en los ensayos descritos en estos ejemplos, a menos que se establezca explícitamente de otro modo.

Un ácido nucleico representativo que codifica el polipéptido de CD80 humano de longitud completa previsto se muestra en SEC ID N°: 196. La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID N°: 196 codifica el péptido señal de CD80 humano, ECD, dominio transmembrana y dominio citoplásmico, e incluye el codón de terminación TAA en el extremo C.

Proteína de fusión de CD86 humano-Ig.

Una secuencia de ácidos nucleicos representativa que codifica la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión CD86 humano-IgG1 humana (normalmente abreviada en el presente documento "hCD86-Ig") se muestra en SEC ID N°: 179. Esta secuencia de ácidos nucleicos incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de la proteína de fusión CD86 humano-IgG1 humana madura. La secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión hCD86-Ig se muestra en SEC ID N°: 177, y un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica la proteína de fusión hCD86-Ig predicha se muestra en SEC ID N°: 179.

Como se muestra en la Figura 2B, la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión hCD86-Ig incluye los siguientes segmentos: el péptido señal previsto (residuos de aminoácidos 1-23), dominio extracelular de CD86 humano (residuos de aminoácidos 24-243), secuencia de ligador (residuos de aminoácidos 244-246) y polipéptido del Fc de IgG1 humana (residuos de aminoácidos 247-477). Los residuos de aminoácidos en las uniones entre estos diversos segmentos también se muestran en la Figura 2B. Específicamente se muestran los cuatro últimos residuos de aminoácidos del péptido señal, los cinco primeros y los siete últimos residuos de aminoácidos del ECD de CD86 humano, los residuos de aminoácidos del ligador (GVT) y los cinco primeros y los cinco últimos residuos de aminoácidos del polipéptido del Fc de IgG1 humana.

El péptido señal de CD86 se escinde normalmente del polipéptido de hCD86-Ig previsto durante el procesamiento y, por tanto, la proteína de fusión CD86 humano-Ig secretada (es decir, proteína de fusión madura) no incluye normalmente el péptido señal. La forma madura/secretada de hCD86-Ig, que tiene un total de 454 aminoácidos, comprende los residuos de aminoácidos 24-477 (la secuencia de longitud completa sin el péptido señal) de SEC ID N°: 177 y empieza con la siguiente secuencia de residuos de aminoácidos: alanina-prolina-leucina. Si se desea, los aminoácidos de la proteína de fusión madura pueden enumerarse empezando con el residuo de alanina (Ala) de la secuencia de Ala-Pro-Leu, que designa Ala como el primer residuo (por ejemplo, el ECD comprende los residuos de aminoácidos numerados 1-218), como en la forma madura de hCD86-Ig que comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 178. La proteína de fusión madura (SEC ID N°: 178) comprende una proteína del ECD de hCD86 WT covalentemente fusionada en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de hIgG1.

La proteína de fusión hCD86-Ig normalmente existe en disolución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión hCD86-Ig maduras monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión CD86-Ig madura monomérica (SEC ID N°: 178) comprende un ECD de CD86 humano (SEC ID N°: 180) fusionado en su extremo C con el extremo N de un Fc de IgG1 humana (SEC ID N°: 185). Los dos monómeros de hCD86-Ig están ligados covalentemente juntos por enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en cada monómero, formándose así el dímero de proteínas de fusión hCD86-Ig. El dímero de proteínas de fusión hCD86-Ig

es la forma de la molécula de proteína de fusión usada en los ensayos descritos en estos ejemplos, a menos que se establezca explícitamente de otro modo.

En la proteína de fusión CD86-Ig (por ejemplo, formas predicha y madura), tres residuos GVT están presentes como artefacto de clonación (o ligador) entre el extremo C del ECD de CD86 y el extremo N del polipéptido del Fc de IgG1.

- 5 En otro aspecto, la proteína de ECD de CD86 humano WT comprende una secuencia de polipéptidos que comprende los residuos de aminoácidos 1-218 de SEC ID N°: 180 (es decir, excluyendo los dos últimos residuos de aminoácidos del extremo C en (PP)).

Proteína de fusión Orencia®.

- 10 Como control adicional y para fines comparativos se compró una proteína de fusión comercialmente disponible conocida como la proteína de fusión Orencia® (Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ). La proteína de fusión Orencia® está compuesta por el dominio extracelular de CTLA-4 humana WT covalentemente fusionado en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG1 mutante específico. La proteína Orencia® es una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas ligadas covalentemente juntas por enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína presentes en cada proteína de fusión monomérica.
- 15 La secuencia de polipéptidos de cada monómero de proteína de fusión madura Orencia® se muestra en SEC ID N°: 164 y está compuesta por los siguientes segmentos: un dominio extracelular de CTLA-4 humano WT (residuos de aminoácidos 1-124), secuencia de ligador (residuo de aminoácido 125) y un polipéptido del Fc de IgG1 mutante (residuos de aminoácidos 126-357). Cada monómero de proteínas de fusión Orencia® tiene una estructura similar a la del monómero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig mostrado esquemáticamente en la Figura 2C, excepto que el ECD de LEA29Y está reemplazado por ECD de CTLA-4 humano WT, y no está presente péptido señal en ningún monómero de proteínas de fusión Orencia®, debido a que cada monómero es una proteína de fusión secretada o madura. La secuencia de polipéptidos de la forma no madura de un monómero de Orencia® (que incluye un péptido señal) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la forma no madura de un monómero de proteínas de fusión Orencia® se muestran en SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 7, respectivamente, del documento U.S. 7.094.874. Los procedimientos de preparación y uso de la proteína de fusión Orencia® también se desvelan en el documento U.S. 7.094.874.
- 20
- 25

Creación de secuencias de ADN que codifican polipéptidos CTLA-4 mutantes.

- Se usaron procedimientos de evolución dirigida para generar bibliotecas de polinucleótidos que no se produce naturalmente recombinantes que codifican polipéptidos del dominio extracelular de CTLA-4 mutante recombinante.
- 30 Se conocen secuencias de proteínas y de nucleótidos de varios homólogos de CTLA-4 de mamífero que se producen naturalmente. Véase, por ejemplo, Centro nacional para información biotecnológica (NCBI). La diversidad de secuencias identificadas en una variedad de homólogos del dominio extracelular de CTLA-4 de mamífero que se producen naturalmente se usó en procedimientos de evolución dirigida para generar bibliotecas de polinucleótidos recombinantes que codifican polipéptidos del dominio ECD de CTLA-4 mutante. Los procedimientos de evolución dirigida incluyen, por ejemplo, procedimientos de recombinación y mutagénesis *in vitro* como se describen sustancialmente en Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 (1994); Chang y col., Nature Biotech 17:793-797 (1999); publicación de solicitud de patente internacional n° WO 98/27230; y las patentes de EE.UU. n° 6.117.679 y 6.537.776.
- 35

Creación de bibliotecas de secuencias de ADN que codifican polipéptidos CTLA-4 mutantes.

- 40 Las secuencias de ADN mutante que codifican polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante recombinante se amplificaron a partir de reacciones de ensamblaje por PCR usando cebadores directos e inversos diseñados basándose en homología de secuencias. Los cebadores se diseñaron, hicieron y ensamblaron usando procedimientos convencionales muy conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyeron codones de terminación y de iniciación y sitios de restricción según fuera necesario. Los procedimientos de amplificación por PCR empleados también son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Berger, Ausubel y Sambrook, todos arriba. Cebadores directos e inversos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: cebador directo (5'-CTATTGCTACGGCCGCTATGGCCMTKCACGTCGCTCAACCAGCCGTCGTACTION GCGTCC-3') (SEC ID N°: 191) y cebador inverso (5'-GTGATGGTGTGGTGTGCGGCCGCATCAGA-3') (SEC ID N°: 192). Se usaron 5 µl de reacción de ensamblaje como molde en 100 µl de reacción de PCR con cebadores directo e inverso 1 µM, tampón Taq (Qiagen; n° 201225) y dNTP 200 µM durante 15 ciclos de amplificación (94°C 30 s; 50°C 30 s; 72°C 40 s). El ADN amplificado que codifica los polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante se digirió con enzimas de restricción (*SfiI* y *NotI*) y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, n° 28704) según recomendación del fabricante y se ligaron en el vector de expresión en fago similarmente digerido pSB0124 (procedimiento similar al descrito en Chang y col., Nature Biotech 17:793-797 (1999)). La ligación de bibliotecas resultante se transformó por electroporación en células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Inc; n° C4040-50) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células transformadas se incubaron en LB (medio de caldo Luria) que contenía 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante la noche a 37°C y luego se usaron para preparar un caldo de maxiprep (Qiagen; n° 12362) de ADN de biblioteca según las condiciones recomendadas por el fabricante.
- 45
- 50
- 55

Cribado de bibliotecas de fagos que expresan polipéptidos CTLA-4 mutantes que tienen avideces de unión mejoradas por CD80 humano y/o CD86 humano*Generación de bibliotecas de expresión en fago de polipéptidos CTLA-4 mutantes.*

ADN de biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de secuencias de ADN que codifica mutantes del ECD de CTLA-4) se transformó por electroporación en células de *E. coli* TG-1 (Stratagene; nº 200123) según las condiciones recomendadas por el fabricante. El cultivo se cultivó bajo condiciones de selección de fagémidos (medio LB que contenía carbenicilina a 50 µg/ml) durante 1-2 generaciones, se infectó con fago M13K07 colaborador (a una multiplicidad de nivel de infección de 5-10) y se incubó con agitación a 250 rpm durante la noche a 37°C bajo selección dual para fagémido (carbenicilina a 50 µg/ml) y fago colaborador (kanamicina a 70 µg/ml). Los cultivos se clarificaron por centrifugación (6000 rpm, 15 min, 4°C en un rotor Sorvall 600TC) y las partículas de fago se precipitaron incubando 32 ml de sobrenadante de cultivo con 8 ml de disolución de PEG/NaCl (20% de PEG-8000; NaCl 2,5 M) sobre hielo durante 30 min seguido de centrifugación (9500 rpm, 40 min, 4°C en un rotor Sorvall 600TC). El sedimento de fagos se suspendió en 1 ml de PBS que contenían 1% de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma; nº A7906), se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se clarificó por centrifugación (velocidad máx, 5 min, TA en una centrífuga de mesa Eppendorf).

Inmunopurificación de bibliotecas de fagos mutantes de CTLA-4.

Se inmunopurificaron bibliotecas de fagos en hasta cinco rondas contra proteínas de fusión hCD80-Ig o hCD86-Ig usando condiciones convencionales. Véanse, por ejemplo, Lowman, y col., *Biochemistry* 12;30(45):10832-10838 (1991); Smith, G.P. y col., *Chem. Rev.* 97:391-410 (1997). Cada ronda de inmunopurificación incluyó: (a) unión de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de expresión en fago a ligandos hCD80-Ig o hCD86-Ig; (b) eliminación de fago sin unir; (c) elución de fago unido; y (d) amplificación de fago eluido para la siguiente ronda de inmunopurificación. Una alícuota de fago de cada ronda se transdujo en células de *E. coli* para obtener colonias transductantes individuales.

Identificación de mutantes de CTLA-4 que tienen avideces de unión mejoradas por CD80 humano y/o CD86 humano por ELISA de fagos.

Colonias individuales obtenidas de cada ronda de inmunopurificación se inocularon en placas de cultivo de 96 pocillos (NUNC; nº 243656) que contenían 150 µl/pocillo de 2 x medio YT (levadura-triptona) que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y se incubaron a 250 rpm durante la noche a 37°C. Los cultivos durante la noche se usaron para inocular bloques de pocillos profundos (Scienceware; nº 378600001) que contenían 600 µl/pocillo del mismo medio. Los cultivos se incubaron a 250 rpm durante 2 h a 37°C, se infectaron con fago colaborador M13K07 (multiplicidad de infección (moi) 5-10) y luego se incubaron a 250 rpm durante la noche a 37°C bajo selección dual para marcadores de fagémido y de fago colaborador (carbenicilina a 50 µg/ml y kanamicina a 70 µg/ml, respectivamente). Los cultivos se clarificaron por centrifugación a 4000 rpm durante 20 min a 4°C en un rotor Beckman GH 3.8. Las placas de ELISA (NUNC; nº 449824) se recubrieron mediante adición de 50 µl/pocillo de PBS que contenía 10 µg/ml de hCD80-Ig o hCD86-Ig y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y se bloquearon mediante la adición de 200 µl/pocillo de PBS que contenía 3% de leche en polvo desnatada e incubación a TA durante 1 hora (h). 25 µl/pocillo de sobrenadantes de fagos del bloque de pocillos profundos se transfirieron a placas de ELISA que contenían 25 µl/pocillo de 6% de leche en polvo desnatada y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y se incubaron con 50 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con HRP (GE Healthcare, nº 27-9421-01) diluido a 1:5000 en PBST que contenía 3% de leche en polvo desnatada durante 1 h a TA. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y la señal se detectó usando un kit de sustrato TMB (Pierce; nº 34021) según condiciones recomendadas por el fabricante. Los polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante que presentaron aumento de la avidez de unión por CD80 humano y/o CD86 humano (como se mide por un aumento de la avidez por hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), en comparación con la avidez de unión de CTLA-4 humano por CD80 humano y/o CD86 humano (como se mide por la avidez de unión de ECD de CTLA-4 humano por hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), se seleccionaron para posterior análisis.

Ejemplo 3Creación de un vector de proteínas de fusión de Fc de IgG2.

Se creó un vector de expresión de proteínas de fusión IgG2-Fc de plásmido para producir una proteína de fusión que comprendía un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la invención y polipéptido del Fc de IgG2 humana. El ADN que codifica el polipéptido del Fc de IgG2 humana se generó por amplificación por PCR de ADNc de leucocitos humanos (BD Biosciences, nº de cat. HL4050AH) usando cebador directo (5'-AAGCTGTCACCGGTGGATCGATCCCGAACCCCTGCCCTGATTCTGATGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCCACCGT-3') (SEC ID N°: 189) y cebador inverso (5'-CAGAATTCATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTG-3') (SEC ID N°: 190). Los cebadores se diseñaron, prepararon y ensamblaron usando técnicas convencionales muy conocidas para aquellos expertos en la materia e incluyeron codones de terminación y de iniciación y sitios de restricción según fuera necesario. Los procedimientos de amplificación por PCR empleados también son muy

conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Berger, Ausubel y Sambrook, todos arriba. Se usaron 50-100 ng de ADNc como molde en una reacción de PCR de 100 µl con cebadores directo e inverso 1 µM, tampón Taq (Stratagene; nº 200435) y dNTP 200 µM durante 25 ciclos de amplificación (94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 60 s). El producto de PCR se purificó por columnas de centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen nº 28106) según las condiciones recomendadas por el fabricante y se digirieron con enzimas de restricción *AgeI* y *EcoRI*. El fragmento de digestión por PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa y se purificó usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, nº 28704) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Una versión modificada del vector pcDNA3.1-LEA (descrito anteriormente), que contenía un sitio de restricción *AgeI* en la secuencia señal de CTLA-4 (introducida como una mutación silenciosa), puede digerirse con *AgeI* y *EcoRI* y ligarse al fragmento mencionado anteriormente. La ligación se transforma en células de *E. coli* One-Shot TOP10 (Invitrogen Cat. nº C4040-03) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células transformadas se incuban en LB (medio de caldo Luria) que contiene 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante la noche a 37°C y luego se usan para preparar un caldo de maxiprep (Qiagen; nº 12362) de ADN de plásmido según las condiciones recomendadas por el fabricante.

El vector de expresión de plásmido resultante se designa vector de expresión de la proteína de fusión de Fc de IgG2 de pcDNA. Este vector es idéntico al vector de plásmido de CTLA-4-IgG2 mutante de pcDNA mostrado en la Figura 1, excepto que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante se elimina. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido señal en el vector de fusión de Fc de IgG2 de pcDNA (que en la Figura 1 puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal adecuado) es un ácido nucleico que codifica el péptido señal de CTLA-4 humano (SEC ID Nº: 181 o SEC ID Nº: 215). Este vector de fusión de Fc de IgG2 no incluye ningún ácido nucleico que codifica un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de la invención o cualquier otro polipéptido del ECD de CTLA-4.

Clonación de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos CTLA-4 mutantes en el vector de fusión de Fc de IgG2.

Para producir polipéptidos CTLA-4 mutantes como proteínas de fusión de Fc solubles, secuencias de ADN que codifican polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante identificados por tener avideces de unión mejoradas por CD80 humano y/o CD86 humano (con respecto a la avidez de unión de ECD de CTLA-4 humano por CD80 humano y/o CD86 humano) del cribado de la biblioteca de fagos se cribaron cada una en el vector de la proteína de fusión de Fc de IgG2 descrito anteriormente usando, por ejemplo, el siguiente procedimiento.

Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante que presentan mayores avideces de unión por hCD80-Ig y/o hCD86-Ig se recuperaron primero del vector de expresión en fago por amplificación por PCR usando cebadores directo e inverso diseñados basándose en homología de secuencias a varios residuos de nucleótidos (por ejemplo, 30-60 nucleótidos) en los extremos N y C de los polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante y procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en, por ejemplo, Berger, Ausubel y Sambrook, todos arriba. Por ejemplo, en un aspecto a modo de ejemplo, secuencias de ADN que codifican polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante se recuperaron del vector de expresión en fago por amplificación por PCR usando cebador directo (5'-GGAATACCGGTTTTTGTAAAGCCATGCACGTCGCTCAACCAGCCGTCGTAATC-3') (SEC ID Nº: 191) y cebador inverso (5'-GGCACTCAGATCTACGTCATCGATCCCGAA-3') (SEC ID Nº: 192). Se usaron 10 nanogramos (ng) de ADN de plásmido (vector de expresión en fago que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica ECD de CTLA-4 mutante) como molde en una reacción de PCR de 100 µl con cebadores directo e inverso 1 µM descritos anteriormente, tampón Taq (Stratagene; nº 200435) y dNTP 200 µM durante 25 ciclos de amplificación (94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 60 s). El producto de PCR se purificó por columnas de centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen nº 28106) según las condiciones recomendadas por el fabricante y se digirió con enzimas de restricción *AgeI* y *ClaI*. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, nº 28704) según las condiciones recomendadas por el fabricante y se ligaron en vector de fusión de Fc de IgG2 de plásmido similarmente digerido. La ligación se transformó en células de *E. coli* One-shot TOP10 (Invitrogen Cat. nº C4040-03) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células transformadas se incubaron en LB (medio de caldo Luria) que contenía 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante la noche a 37°C y luego se usaron para preparar un caldo de maxiprep (Qiagen; nº 12362) de ADN de plásmido según las condiciones recomendadas por el fabricante.

El vector de expresión de plásmido resultante, que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante, se designa el vector de expresión de plásmido de Fc de IgG2 de ECD de CTLA-4 mutante de pcDNA. Un diagrama esquemático de este vector se muestra en la Figura 1. Este vector incluye un promotor de Bla; gen de resistencia a ampicilina; origen pUC; secuencia señal de la poliadenilación de SV40 (poli A); origen f1; promotor del SV40; gen de resistencia a neomicina; promotor del CMV para facilitar la expresión de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante (que comprende: por ejemplo, péptido señal de CTLA-4 humano, polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante y polipéptido del Fc de IgG2 humana); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal de CTLA-4 humano (SEC ID Nº: 181 o SEC ID Nº: 215); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de SEC ID Nº: 80-152); una secuencia de ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifica un polipéptido del Fc de IgG2 humana se muestra en SEC ID Nº: 183 o SEC ID Nº: 217; y una secuencia

señal de terminación de poli A de la hormona de crecimiento bovina (bGH). La secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 183 codifica el polipéptido del Fc de hIgG2 con el residuo de lisina (K) del extremo C (SEC ID N°: 184); la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 217 codifica el polipéptido del Fc de hIgG2 sin el residuo de lisina del extremo C (SEC ID N°: 218).

5 El vector de la proteína de fusión de Fc de IgG2 de plásmido también puede usarse para producir una proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2 ("hCTLA-4-Ig"). En este caso, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ECD de CTLA-4 humano (por ejemplo, SEC ID N°: 193) se clona en el vector de la proteína de fusión de Fc de IgG2 de plásmido usando procedimientos de clonación convencionales similares a aquellos descritas anteriormente en lugar de la secuencia de nucleótidos que codifica el ECD de CTLA-4 mutante. La proteína de fusión hCTLA-4-Ig normalmente existe en disolución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión hCTLA-4-Ig maduras monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión hCTLA-4-Ig madura monomérica comprende un ECD de CTLA-4 humano (SEC ID N°: 159) fusionado en su extremo C con el extremo N de un Fc de IgG2 humana (SEC ID N°: 218 o SEC ID N°: 184). Los dos monómeros de hCTLA-4-Ig están ligados covalentemente juntos por enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en cada monómero, formándose así el dímero de proteínas de fusión hCTLA-4-Ig. El dímero de proteínas de fusión hCTLA-4-Ig maduras es la forma de la proteína de fusión usada en los ensayos descritos en estos ejemplos, a menos que se establezca explícitamente de otro modo.

Los presentes inventores han encontrado experimentalmente que una proteína de fusión CTLA-4 humano-Ig o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante preparada en células CHO transfecando un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión hCTLA-4-Ig o CTLA-4-Ig mutante y el polipéptido del Fc de hIgG2 mostrada en SEC ID N°: 184 no incluye normalmente el residuo de lisina (K) previsto del extremo C, como se ha determinado por análisis de EM-CL; por tanto, la secuencia de Fc de hIgG2 de polipéptidos de una hCTLA-4-IgG2 o una CTLA-4-IgG2 mutante es la mostrada en SEC ID N°: 218, en la que la secuencia de polipéptidos del Fc de hIgG2 no incluye normalmente el residuo de lisina del extremo C con respecto a la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 184.

Transfección transitoria de células COS.

Se cultivaron células COS-7 al 80-90% de confluencia en matraces T-175 que contenían 40 ml de medio de crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, n° de cat. 10565-018) complementado con 10% de SBF (n° de cat. de Hyclone SV30014.03) y 1x PSG (penicilina, estreptomycin y glutamina) (Invitrogen, n° de cat. 10378-016)). Inmediatamente antes de la transfección de las células con un vector de expresión de plásmido, el medio se eliminó y se sustituyó con 35 ml de medio de expresión (medio OptiMem (Gibco n° 51985) que contenía 1x PSG). Se mezcló ADN de plásmido (10 µg) (por ejemplo, un vector de expresión de Fc de IgG2 del ECD de CTLA-4 mutante de pcDNA que codifica una proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante) con reactivo de transfección FuGENE6 (Roche n° 11 815 075 001) en una relación de volumen 1:3 y se añadió a 1 ml de medio de crecimiento. Esta mezcla se añadió luego lentamente al matraz T-175 y se rotó suavemente para mezclarlo. Después de la incubación a 37°C durante 3 días, el medio se recogió, se añadió medio de expresión fresco y los cultivos se incubaron durante 3 d adicionales.

Puede usarse un procedimiento similar para preparar células COS-7 transfecadas con un vector de plásmido similar que codifica CTLA-4 humano-IgG2 o un vector de plásmido pcDNA3.1-LEA que codifica LEA29Y-Ig.

Purificación de proteínas.

Los sobrenadantes de cultivos de transfección (por ejemplo, que comprenden células transfecadas con un vector de Fc de IgG2 del ECD de CTLA-4 mutante de pcDNA que codifica proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante) se clarificaron por centrifugación a 1000x g durante 10 min a TA y filtración a través de membranas de 0,2 µm (Nalgene, VWR n° 73520-982). Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad por proteína A usando un sistema de HPLC AKTA Explorer (GE Healthcare). Una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante se unió a columnas de proteína A FF Hitrap (GE Healthcare, n° 17-5079-01) en tampón PBS, se lavó con el mismo tampón, se eluyó con tampón ácido cítrico 100 mM (pH 4,0) y luego se neutralizó mediante adición de 1/10 de volumen de base Tris 2 M. El tampón en la disolución de proteína se intercambiò finalmente a PBS por diálisis usando membranas MWCO de 10 kDa (Pierce, n° de cat. PI66810).

Puede usarse un procedimiento similar para purificar proteínas de fusión CTLA-4 humano-IgG2 o LEA29Y-Ig.

Evaluación de la igualdad de proteínas.

Análisis de SDS/PAGE.

El peso molecular aparente (MW) de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante purificada se midió por análisis de SDS/PAGE bajo condiciones no reductoras. Bajo condiciones no reductoras, una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante normalmente existe como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas. En un aspecto, el dímero es un homodímero que comprende dos monómeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes idénticas. En un aspecto, cada monómero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig comprende un ECD de CTLA-4 mutante maduro/secretado fusionado en su extremo C con el extremo N de un

polipéptido del Fc de IgG2 humana. Los dos monómeros de CTLA-4-Ig mutante están ligados covalentemente juntos por enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en cada monómero. El homodímero es la forma de la molécula de proteína de fusión mutante normalmente descrita en estos ejemplos, a menos que se establezca explícitamente de otro modo. Los datos mostrados en estos ejemplos se refieren a homodímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes, a menos que se establezca explícitamente de otro modo.

Los análisis de SDS/PAGE se realizaron del siguiente modo. 2 µg de proteína purificada se añadieron a 20 µl de tampón de muestra LDS (Invitrogen n° NP0007) y se ejecutaron mediante 4-12% de geles Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen n° NP0321BOX) en 1x tampón de electroforesis MES-dodecilsulfato de sodio (SDS) / PAGE (Invitrogen n° NP0002) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Los geles se tiñeron por incubación en 50 ml de SimplyBlue SafeStain (Invitrogen n° LC6060) durante 1 h con agitación suave a TA. Los geles se destiñeron mediante dos incubaciones con 200 ml de agua durante 1 h con agitación suave a TA y se procesaron en tampón de secado (Bio RAD 161-0752) según las condiciones recomendadas por el fabricante.

Un gel de SDS/PAGE representativo de dos homodímeros de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo (designados los clones D3 y D4) y la proteína de fusión Orenia®, que sirve de control comparativo, se presenta en la Figura 3. El dímero de proteínas de fusión D3-Ig comprende dos monómeros de proteínas de fusión D3-Ig idénticas que están ligados covalentemente por enlaces disulfuro formados entre los residuos de cisteína en cada monómero de D3-Ig. Cada monómero de D3-Ig comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (llamado "D3") que comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 61 fusionada directamente (es decir, sin residuo(s) de aminoácido(s) del "ligador") en su extremo C al extremo N del polipéptido del Fc de hIgG2 mostrada en SEC ID N°: 218. El dímero de proteínas de fusión D4-Ig comprende similarmente dos monómeros de D4-Ig idénticos que están covalentemente ligados por enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en cada monómero de D3-Ig. Cada proteína de fusión D4-IgG2 monomérica comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (llamado "D4") que comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 62 fusionada directamente (es decir, sin residuo(s) de aminoácido(s) del "ligador") en su extremo C con el extremo N de la secuencia de Fc de hIgG2 de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 218.

Como se ha explicado anteriormente, los presentes inventores han encontrado experimentalmente que una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante preparada en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del Fc de hIgG2 previsto mostrado en SEC ID N°: 184 no incluye normalmente el residuo de lisina (K) previsto del extremo C, como se ha determinado por análisis de EM-CL; por tanto, la secuencia de Fc de hIgG2 de polipéptidos de una CTLA-4-IgG2 mutante descrita en el presente documento es la mostrada en SEC ID N°: 218, cuya secuencia de polipéptidos del Fc de hIgG2 no incluye normalmente el residuo de lisina del extremo C, con respecto a la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 184.

Los análisis de SDS/PAGE se realizaron sobre todas las preparaciones de proteína para verificar la calidad de las proteínas en términos de peso molecular aparente, concentración de proteína y pureza. Los resultados de los análisis de SDS/PAGE fueron similares para todas las preparaciones de proteína. De los resultados del gel a modo de ejemplo mostrados en la Figura 3, los dímeros de proteínas de fusión D3-IgG2 y D4-IgG2 purificadas tienen un MW aparente de aproximadamente 80 kDa, que está de acuerdo con el MW previsto de la estructura de la proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante homodimérica a modo de ejemplo representada en la Figura 10 (MW previsto = 78-79 kDa). (Los monómeros de proteínas CTLA-4-IgG2 mutantes purificadas normalmente tienen MW aparentes de 39-40 kDa). Las bandas de proteína en el gel mostradas en la Figura 3 han sido teñidas con intensidades equivalentes; esto confirma la precisión de medir la concentración de proteína para diferentes muestras. En cuanto a la pureza de las proteínas puede observarse una banda de menor MW en la Figura 3 a un MW aparente de aproximadamente 44 kDa, que está de acuerdo con el MW previsto de una proteína de fusión de IgG2 monomérica. La intensidad relativa de esta banda de menor MW es coherentemente baja y se estima que es inferior al 5% de la proteína total.

Pueden usarse análisis análogos de SDS/PAGE para evaluar la pureza de proteínas de fusión CTLA-4 humano-IgG2 o LEA29Y-Ig producidas usando procedimientos similares a aquellos descritos anteriormente.

Análisis de endotoxinas.

Los niveles de endotoxinas de proteínas de fusión de CTLA-4 mutantes se midieron usando un kit de ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* QCL-1000 (Cambrex n° 50-648U) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. El nivel de endotoxinas máximo para proteínas usadas en ensayos basados en células se fijó a 10 unidades de endotoxina (UE)/mg de proteína.

Pueden usarse análisis análogos para medir los niveles de endotoxina de preparaciones de proteína CTLA-4 humano-IgG2 o LEA29Y-Ig.

Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (CET).

Se midieron niveles de agregación de proteínas (incluyendo niveles de agregación de polipéptidos CTLA-4 mutantes y polipéptidos de control) por cromatografía de exclusión por tamaño usando un sistema Dionex BioLC (Dionex). La proteína (5 µg) se ejecutó mediante una columna Tosoh G3000Wx1 (Tosoh Bioscience) en tampón de electroforesis

PBS usando una ejecución isocrática de 20 min y detección por absorbancia (A) a 214 nanómetros (nm). El nivel máximo de agregación para proteína usado en los posteriores ensayos se fijó al 10%.

El análisis de CET se realizó en todas las preparaciones de proteína para verificar la calidad de proteínas en términos de niveles de agregación de proteínas. Los resultados fueron similares para todas las preparaciones de proteína y un perfil de elución representativo de un análisis de CET de un dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes (D3-Ig) se muestra en la Figura 4. El eje y muestra unidades de miliabsorbancia (UmA); el eje x muestra tiempo de elución en minutos. La estructura del dímero de D3-Ig se explica anteriormente en la sección "Análisis de SDS/PAGE". Este dímero de CTLA-4-Ig mutante purificado es ampliamente homogéneo en tamaño y no contiene altos niveles de especies agregadas. Otras proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes se analizaron similarmente y mostraron resultados similares (datos no mostrados). Se encontró que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes purificadas eran homogéneas en tamaño y no contuvieron altos niveles (>10%) de proteínas agregadas. Es importante verificar los estados de agregación de las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes purificadas debido a que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes altamente agregadas pueden unirse con mayor avidéz a moléculas de CD80 humano y/o CD86 humano y, por tanto, pueden presentar mayor actividad biológica.

15 **Ejemplo 4**

Medición de avidéces de unión de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes por proteínas de fusión CD80 humano-Ig murina (hCD80-mIg) y CD86 humano-Ig murina (hCD86-mIg) usando resonancia de plasmones superficiales (SPR) (análisis Biacore™).

Este ejemplo describe un procedimiento para cribar proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes para avidéz de unión mejorada por ligandos hCD80-mIg y/o hCD86-mIg usando un análisis de interacción Biacore. En la nomenclatura usada para describir este tipo de análisis, el componente de unión inmovilizado se denomina el "ligando" y el componente de unión en la fase móvil se denomina el "analito". Las proteínas de fusión que contienen un dominio de Ig normalmente forman estructuras diméricas en disolución en virtud de la fuerte asociación entre dos dominios de Ig. A menos que se indique lo contrario, se espera que tales conformaciones diméricas existan para las proteínas de fusión descritas en este ejemplo (es decir, CTLA-4-Ig mutante, proteína de fusión Orenca®, LEA29Y-Ig, hCD80-mIg y hCD86-mIg). El término "avidéz" normalmente se refiere a la fuerza de unión entre analitos diméricos (por ejemplo, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes) y ligandos diméricos (por ejemplo, proteínas de fusión hCD80-mIg o hCD86-mIg). Los aumentos en la avidéz de unión descritos para las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes resultan de aumentos en la afinidad de unión entre cada dominio ECD de CTLA-4 y su ligando correspondiente. La intensidad de la avidéz de unión se describe normalmente en términos de la constante de disociación en equilibrio (K_D), que describe la concentración molar de analito a la que el 50% del ligando disponible está unido en equilibrio.

En este procedimiento de cribado, chips de sensor Biacore se derivatizaron con ligandos hCD80-mIg o hCD86-mIg y se permitió que proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes en tampón fluyeran sobre los chips de sensor recubiertos con ligando. Se evaluó la capacidad de una molécula de proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante para unirse a un componente de unión específica (es decir, hCD80-mIg o hCD86-mIg). También se permitió que las proteínas de fusión de control (es decir, proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2, proteína de fusión Orenca® y proteína de fusión LEA29Y-Ig mutante) fluyeran sobre los chips de sensor recubiertos con ligando y las capacidades de estas moléculas para unirse a hCD80-mIg o hCD86-mIg se evaluaron similarmente para comparación. Usando el sistema Biacore, la constante de la velocidad de asociación (k_{as}) y disociación (k_{dis}) de una proteína de interés que se une a ligandos hCD80-mIg o hCD86-mIg puede evaluarse y usarse para calcular la constante de disociación en equilibrio, K_D . La proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2, que comprende polipéptido del ECD de CTLA-4 humano WT fusionado con el polipéptido de IgG2 humana, puede servir de "control" de CTLA-4 humano-Ig natural. Además, o alternativamente, debido a que la proteína de fusión Orenca® está compuesta por el polipéptido del ECD de CTLA-4 humano WT fusionado con un polipéptido del Fc de IgG1 modificado, también sirve eficazmente de control de CTLA-4-Ig humano natural para fines comparativos. Se identificaron las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes que tienen aumento de avidéces de unión por hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, en comparación con CTLA-4 humano-IgG2, proteína de fusión Orenca® y/o LEA29Y-Ig. Como se trata en mayor detalle más adelante, el aumento de la avidéz de unión de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante por hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, con respecto a la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenca® (es decir, hCTLA-4-IgG1) y/o LEA29Y-Ig por hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, no fue debido a diferencias entre IgG2 presentes en las moléculas de CTLA-4-Ig mutante y la IgG1 mutante presente en las moléculas de Orenca® o LEA29Y-Ig.

Todos los análisis Biacore™ se realizaron en un sistema Biacore™ 2000 (GE Healthcare) a temperatura ambiente (TA, 25°C). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% de tensioactivo P20) como tampón de flujo para todos los experimentos.

55 *Ensayo cinético convencional.*

El ensayo cinético convencional mide la cinética de unión del ligando dimérico (por ejemplo, proteína de fusión hCD80-mIg o proteína de fusión hCD86-mIg) recubierto en chips de sensor y analitos diméricos (por ejemplo, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes de la invención) en la fase móvil. Se inmovilizó anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón (GE Healthcare, nº BR-1005-14) sobre chips de sensor CM5 (GE Healthcare, nº BR-1000-14)

según el protocolo del fabricante. El anticuerpo se diluyó a 30 µg/ml en tampón de inmovilización (acetato sódico 10 mM, pH 5,0 (BR-1003-51)). A una velocidad de flujo de 5 µl/minuto, el chip de sensor CM5 se activó con una inyección de 35 µl de una mezcla de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (preparada mezclando volúmenes iguales de 11,5 mg/ml de EDC y 75 mg/ml de NHS) (GE Healthcare, nº BR-1000-50), seguido de una inyección de 35 µl de anticuerpo sin diluir. Los sitios sin reaccionar se inactivaron con 35 µl de etanolamina-HCl 1 M, pH 8,5 (GE Healthcare, nº BR-1000-50). Este procedimiento normalmente dio 15.000 unidades de respuesta (UR) de anticuerpo acoplado. Los ligandos de CTLA-4 CD80 humano-Ig murina (hCD80-mIg) (Ansell, nº 510-820) o CD86 humano-Ig murina (hCD86-mIg) (Ansell, nº 509-820) se unieron a chips de sensor recubiertos de anticuerpo mediante inyección de 10 µl o 16 µl, respectivamente, de disolución de ligando (2 µg/ml de proteína en tampón HBS-EP [HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% (v/v) de tensoactivo P-20, GE Healthcare, nº BR-1001-88]) a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Los niveles de captura de ligando fueron normalmente 135-170 UR. Las proteínas CTLA-4-Ig mutantes se diluyeron en tampón HBS-EP y fluyeron sobre chips de sensor recubiertos con ligando durante 2 min a 30 µl/min, seguido de 5 min de incubación con tampón HBS-EP que no contenía proteína a la misma velocidad de flujo. Para proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes que tienen velocidades de disociación muy lentas de hCD86-mIg también se realizaron ensayos cinéticos usando mayores tiempos de disociación (por ejemplo, 20 min). Los niveles de señal de R_{max} para proteínas CTLA-4-Ig mutantes oscilaron de aproximadamente 70-100 UR. La regeneración entre ciclos se realizó por incubación de 3 min con tampón glicina 10 mM (pH 1,7) a 50 µl/min. Nuevos chips se sometieron a 4-5 ciclos de captura/unión/regeneración antes del uso en experimentos reales. Los datos de una celda de referencia que contenía anticuerpo de captura de conejo dirigido contra IgG de ratón solo se restaron de los datos obtenidos de celdas de flujo que contenían hCD80-mIg o hCD86-mIg capturada. Normalmente se analizaron 8 diluciones de proteínas CTLA-4-Ig mutantes que oscilan de 500 nM a 0,2 nM contra una referencia de blanco (tampón HBS-EP solo).

Los trazos del sensograma de un análisis Biacore típico se muestran en la Figura 5. Esta figura muestra la respuesta (UR) con el tiempo (en segundos (s)) generada por la unión de las tres siguientes proteínas de fusión con la proteína de fusión hCD86-mIg: (1) proteína de fusión Orenicia® (que sirve de control y para comparación) (Bristol-Myers Squibb Co.; véase, por ejemplo, Larson C.P. y col., Am. J. Trans. 5:443-453 (2005)); (2) proteína de fusión LEA29Y-Ig (para comparación); y (3) una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo designada “el clon D3” (también llamada D3-IgG2). La proteína de fusión D3-IgG2 comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas que están ligadas covalentemente juntas por uno o más enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en cada monómero. Véase la discusión en la sección “Análisis de SDS/PAGE” anterior. Cada proteína de fusión monomérica comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante maduro mostrado en SEC ID N°: 159 covalentemente fusionado en su extremo C con el extremo N del polipéptido de IgG2 humana mostrado en SEC ID N°: 184 ó 218. Otras proteínas de fusión dimericas puede comprender estructuras similares a las de la proteína de fusión D3-IgG2 dimerica – excepto que el polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante de D3 de cada proteína de fusión monomérica está sustituido por un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante diferente.

La fase de asociación refleja la unión entre el analito de interés y el ligando de interés. En la Figura 5, la fase de asociación para cada analito se representa por la curva en momentos anteriores al tiempo marcado por la flecha y se caracteriza por la unión del analito (D3-IgG2, proteína de fusión Orenicia® o LEA29Y-Ig) al ligando hCD86-mIg. La velocidad a la que un analito se asocia con el ligando hCD86-mIg está reflejada en la curva - véase, por ejemplo, la brusca velocidad de aumento en las unidades de respuesta empezando en aproximadamente 510 segundos.

La fase de disociación del análisis empieza en el momento marcado por la flecha en la Figura 5. Durante la fase de disociación, el analito y el ligando se disocian de su conformación unida. En la Figura 5, la velocidad a la que un analito se disocia del ligando hCD86-mIg se representa por la disminución en las unidades de respuesta (velocidad de disminución de las unidades de respuesta con el tiempo). Basándose en estos datos puede determinarse la constante de la velocidad de disociación relativa (velocidades de “dis”, k_{dis} o k_d) y las constantes de la velocidad de asociación (velocidades de “as”, k_{as} o k_a). La avidéz total de la interacción puede describirse por K_D , (k_{dis})/(k_{as}). El aumento de las avidéces de unión se manifiesta frecuentemente en velocidades de disociación más lentas. Si la velocidad de disociación más lenta está acompañada por una velocidad de asociación igual, mayor o marginalmente más lenta, de forma que la constante de disociación en equilibrio calculada K_D sea menor, la avidéz será mayor. En este caso, una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante que tiene una avidéz de unión por el ligando hCD86-mIg que es mayor que la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® por el mismo ligando también tendrá una constante de disociación más lenta del ligando que la proteína Orenicia®. Una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante que tiene una avidéz de unión por el ligando hCD86-mIg que es mayor que la avidéz de unión de LEA29Y-Ig por el mismo ligando también tendrá una constante de disociación más lenta del ligando que LEA29Y-Ig.

La Figura 5 muestra que la velocidad de disociación de LEA29Y-Ig del ligando hCD86-mIg es significativamente más lenta que la velocidad de disociación de la proteína Orenicia® del mismo ligando. LEA29Y-Ig también tiene una velocidad de asociación para unirse a hCD86-mIg similar a la observada para la proteína de fusión Orenicia®. Por tanto, LEA29Y-Ig tiene una mayor avidéz por hCD86-mIg que la proteína Orenicia®. Este hallazgo está de acuerdo con estudios previos que describen LEA29Y-Ig como que tiene una mayor avidéz de unión por el ligando hCD86-mIg que la proteína de fusión Orenicia® (Larson C.P. y col., Am. J. Trans. 5:443-453 (2005)). La Figura 5 también muestra que la proteína de fusión D3-IgG2 mutante tiene una velocidad de disociación más lenta del ligando hCD86-mIg que tanto la proteína de fusión Orenicia® como LEA29Y-Ig. La proteína de fusión D3-IgG2 también tiene una

velocidad de asociación similar (pero algo más rápida) para unirse al ligando hCD86-mIg en comparación con las velocidades de asociación de tanto las proteínas de fusión Orenicia® como LEA29Y-Ig por el ligando hCD86-mIg. Por tanto, la proteína de fusión D3-IgG2 presenta una mayor avidéz de unión por el ligando hCD86-mIg que tanto la proteína de fusión Orenicia® como LEA29Y-Ig. Por tanto, se espera que la proteína de fusión D3-IgG2 se una a CD86 nativo que incluye, por ejemplo, CD86 como se expresa *in vivo* sobre APC en mamíferos tales como seres humanos, con mayor avidéz de unión. Este punto de vista está adicionalmente soportado por los ensayos basados en células funcionales tratados en los ejemplos más adelante.

Los análisis Biacore se realizaron usando otras proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. Además, los análisis Biacore se realizaron usando chips de sensor recubiertos con hCD80-mIg y proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. Las velocidades de disociación y avidéces de unión de estas moléculas mutantes se determinaron y se compararon con las velocidades de disociación y avidéces de unión de las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig. Resultados representativos se muestran en las Tablas 3 y 4 y se tratan en mayor detalle más adelante.

Análisis de datos de Biacore convencionales.

Después de la delección de las porciones de regeneración y captura de los sensogramas, las curvas se pusieron a cero en un promedio de 5 s de todas las curvas aproximadamente 10 s antes de la inyección de muestra. Una curva del blanco se restó de cada curva de prueba. Los datos se analizaron por el software BIAevaluation (v4.1, disponible de GE Healthcare) usando la función "Cinética de ajuste, k_a/k_d simultánea". El tiempo de inicio de la inyección se definió como un momento antes de la fase de asociación en la que todas las curvas estuvieron próximas a cero. La selección de datos para la fase de asociación empezó aproximadamente 10 s después del tiempo de inicio de la inyección y terminó aproximadamente 10 s antes del tiempo de terminación de la inyección. El tiempo de terminación de la inyección se definió como un momento antes de la aparición de cualquier punta de señal asociada a la fase de disociación. La fase de disociación se seleccionó para empezar 10 s después del tiempo de terminación de la inyección e incluyó 280-295 s de la fase de disociación de 5 min. El modelo de Langmuir 1:1 describe la reacción $A + B \rightleftharpoons AB$. Este modelo representa la unión de un único ligando a una única proteína de interés (por ejemplo, receptor). El modelo de Langmuir 1:1 del software BIAevaluation se usó para determinar la constante de la velocidad de asociación (k_a) y la constante de la velocidad de disociación (k_d) y para calcular la constante de disociación en equilibrio, K_D . $K_D = k_d/k_a$. $K_D = ([A] \cdot [B])/[AB]$. La constante de disociación en equilibrio, K_D , es igual a la inversa de la constante de asociación en equilibrio, K_A . $K_D = 1/K_A$. Las ecuaciones de velocidad para la reacción (analito A más ligando B dando complejo AB), en la que A = analito inyectado, B = ligando libre y t = tiempo, son: $d[B]/dt = -(k_a[A][B] - k_d[AB])$ y $d[AB]/dt = k_a[A][B] - k_d[AB]$. Sustituyendo R, las unidades de respuesta (UR) de Biacore en un momento dado, para [AB], $R_{\text{máx}} - R$ para [B], y C (concentración de analito) para [A], la expresión de la velocidad neta en unidades de Biacore es $dR/dt = k_a C(R_{\text{máx}} - R) - k_d R$, en la que R a $t_0 = 0$, $B[0] = R_{\text{máx}}$, y $AB[0] = 0$ UR, con la respuesta total = [AB] + RI. El desplazamiento de masa (RI) se fijó a cero, y $R_{\text{máx}}$, k_a y k_d se ajustaron globalmente para todas las curvas.

Los ensayos cinéticos convencionales y los análisis de datos descritos anteriormente se realizaron en preparaciones de proteína de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, además de las proteínas de fusión LEA29Y-Ig y Orenicia®. Las Tablas 3 y 4 resumen los datos de unión para proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes representativas.

La Tabla 3 presenta avidéces de unión de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes representativas por hCD86-mIg, como se mide por el ensayo Biacore convencional descrito anteriormente. Específicamente, la Tabla 3 muestra el nombre de cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante; el número de identificación de secuencias (SEC ID N°) correspondiente a la secuencia de polipéptidos de la proteína de fusión del ECD de CTLA-4 mutante monomérica; la constante de disociación en equilibrio (K_D molar (M)) determinada basándose en la avidéz de unión de la proteína mutante por hCD86-mIg; y la avidéz de unión de cada CTLA-4-Ig mutante por hCD86-mIg con respecto a la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® por hCD86-mIg. Esta avidéz de unión relativa (mostrada en la columna de luz lejana) se muestra como una mejora en veces en la avidéz de unión de la proteína de fusión mutante por hCD86-mIg en comparación con la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® por hCD86-mIg. Cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante en la Tabla 3 existe normalmente en disolución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas, en la que cada proteína monomérica comprende un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, llamado D1, D1T, D2, D3, D4, etc.) fusionado directamente en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG2 que comprende la secuencia de SEC ID N°: 184 ó 218. Cada una de tal CTLA-4-Ig mutante dimérica puede prepararse usando técnicas convencionales conocidas en la materia. Alternativamente, cada uno de tal dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes diméricas puede prepararse usando procedimientos expuestos en el Ejemplo 3 anterior. Brevemente, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un ECD de CTLA-4 mutante particular identificado en la Tabla 3 (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante identificada en la Tabla 3) puede clonarse en el vector de fusión de Fc de IgG2, células de mamífero pueden transfectarse con el vector y la proteína de fusión resultante puede expresarse, purificarse y evaluarse como se describe en el Ejemplo 3. Una secuencia de ácidos nucleicos a modo de ejemplo para cada ECD de CTLA-4 mutante se presenta en el Listado de secuencias incluido en la presente. La proteína de fusión Orenicia®, que comprende dos proteínas de fusión monoméricas, comprendiendo cada proteína de fusión monomérica un ECD de CTLA-4 humano natural fusionado con un Fc de IgG1 modificada, sirve de referencia, es decir, con la avidéz de unión por hCD86-mIg fijada a 1. También se muestran los valores de K_D para la proteína de fusión LEA29Y-Ig y la

- 5 proteína de fusión CTLA-4 humano-Ig. Además, también se muestra la mejora en veces en la avidéz de unión por hCD86-mlg de LEA29Y-Ig en comparación con la avidéz de unión por hCD86-mlg de la proteína Orencia®. Las avidéces de unión de las proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 y Orencia® por hCD86-mlg son aproximadamente iguales, confirmando que las diferencias entre el polipéptido de IgG2 humana presente en CTLA-4 humano-IgG2 y la IgG1 modificada presente en la proteína Orencia® contribuyen poco, si algo, a las afinidades de unión por hCD86-mlg respectivas de estas moléculas. Como se trata en mayor detalle en el Ejemplo 5 más adelante, los presentes inventores han confirmado que las diferencias en las actividades funcionales inmunosupresoras entre polipéptidos de CTLA-4-Ig mutante y la proteína Orencia® (o LEA29Y-Ig) no pueden atribuirse a sus regiones Fc de Ig respectivas que comprenden diferentes isotipos de IgG.
- 10 Como se muestra en la Tabla 3, proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes representativas tienen avidéces de unión por hCD86-mlg que son: (1) al menos aproximadamente iguales a o mayores que la avidéz de unión de CTLA-4 humano-IgG2 ("hCTLA-4-IgG2") (que comprende dos proteínas de fusión monoméricas covalentemente ligadas, comprendiendo cada una de tales proteínas monoméricas el polipéptido del ECD de CTLA-4 humano fusionado con un polipéptido del Fc de IgG2); (2) al menos aproximadamente iguales a o mayores que la avidéz de unión de la proteína Orencia® por el ligando hCD86-mlg; y/o (3) al menos aproximadamente iguales a o mayores que la avidéz de unión de LEA29Y-Ig por el ligando hCD86-mlg. La mejora en veces en la avidéz de unión por el ligando hCD86-mlg con respecto a la avidéz de unión de la proteína Orencia® por hCD86-mlg se indica para cada mutante de CTLA-4-Ig (4ª columna en la Tabla 3).
- 15 Se encontró que la mayoría de las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tenían una velocidad de disociación de la proteína de fusión hCD86-mlg que era más lenta que la velocidad de disociación de la proteína de fusión Orencia® de hCD86-mlg (datos no mostrados). Se encontró que varias proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tenían una velocidad de asociación por hCD86-mlg mayor que la velocidad de asociación de la proteína de fusión Orencia® por el mismo ligando (datos no mostrados).
- 20 Todas las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 3 tuvieron constantes de disociación en equilibrio (K_D) de hCD86-mlg que fueron más lentas que la constante de disociación en equilibrio de hCD86-mlg de la proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2 u Orencia®. Además, la mayoría de las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 3 tuvieron constantes de disociación en equilibrio de hCD86-mlg que fueron más lentas que la constante en equilibrio de hCD86-mlg de LEA29Y-Ig.
- 25 Todas las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 3 tuvieron avidéces de unión por hCD86-mlg que fueron mayores que las avidéces de unión de la proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2 u Orencia® por hCD86-mlg (la mejora en veces calculada en la avidéz de unión por hCD86-mlg con respecto a la proteína de fusión Orencia® se muestra en la 4ª columna de la Tabla 3). Además, muchas de las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 3 tuvieron avidéces de unión por hCD86-mlg que fueron mayores que la avidéz de unión de LEA29Y-Ig por hCD86-mlg (4ª columna de tabla 3).
- 30 Una CTLA-4-Ig mutante de la invención que tiene una mayor avidéz de unión por el ligando hCD86-mlg que la proteína de fusión Orencia® o LEA29Y-Ig tendrá probablemente una elevada potencia inmunosupresora *in vivo* en comparación con la proteína de fusión hCTLA-4-IgG2, Orencia® o LEA29Y-Ig, respectivamente, tal como en, por ejemplo, procedimientos terapéuticos y/o profilácticos para suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario de mamíferos tales como, por ejemplo, seres humanos, en los que se desea la inmunoinhibición o inmunosupresión), procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano) y otros procedimientos descritos en otra parte en el presente documento.
- 35
40

Tabla 3.

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	K_D de hCD86-mlg (M)	Avidéz de unión por hCD86-mlg (con respecto al dímero de proteínas de fusión Orencia®)
CTLA-4 humano-IgG2	162	$3,95 \times 10^{-9}$	1,32x
Dímero de proteínas de fusión Orencia®	164	$5,23 \times 10^{-9}$	1
LEA29Y-Ig	166	$1,05 \times 10^{-9}$ - $5,23 \times 10^{-10}$	5x - 10x
D1-IgG2	58	$2,65 \times 10^{-9}$ - $5,23 \times 10^{-10}$	2x - 10x
D1T-IgG2	59	$5,23 \times 10^{-10}$ - $2,62 \times 10^{-10}$	10x - 20x

(continuación)

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	KD de hCD86-mlg (M)	Avidez de unión por hCD86-mlg (con respecto al dímero de proteínas de fusión Orencea®)
D2-IgG2	60	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-IgG2	61	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D4-IgG2	62	$2,65 \times 10^{-9}$ - $5,23 \times 10^{-10}$	2x - 10x
D5-IgG2	63	$2,65 \times 10^{-9}$ - $5,23 \times 10^{-10}$	2x - 10x
D6-IgG2	64	$2,65 \times 10^{-9}$ - $5,23 \times 10^{-10}$	2x - 10x
D20-IgG2	65	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D21-IgG2	66	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D23-IgG2	67	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D24-IgG2	68	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D26-IgG2	69	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D27-IgG2	70	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D28-IgG2	71	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D29-IgG2	72	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D31-IgG2	73	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-1-IgG2	1	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-2-IgG2	2	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-3-IgG2	3	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-4-IgG2	4	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-5-IgG2	5	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-6-IgG2	6	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-7-IgG2	7	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-8-IgG2	8	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-9-IgG2	9	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-11-IgG2	10	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-12-IgG2	11	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-14-IgG2	12	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-15-IgG2	13	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-16-IgG2	14	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-17-IgG2	15	$< 1,31 \times 10^{-10}$	> 40x
D3-19-IgG2	16	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-20-IgG2	17	$2,62 \times 10^{-10}$ - $1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x

(continuación)

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	KD de hCD86-mlg (M)	Avidez de unión por hCD86-mlg (con respecto al dímero de proteínas de fusión Orenzia®)
Yo D3-21-IgG2	18	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-22-IgG2	19	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-23-IgG2	20	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-24-IgG2	21	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-25-IgG2	22	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-26-IgG2	23	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-27-IgG2	24	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-28-IgG2	25	5,23 x 10 ⁻¹⁰ - 2,62 x 10 ⁻¹⁰	10x - 20x
D3-29-IgG2	26	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-30-IgG2	27	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-31-IgG2	28	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-32-IgG2	29	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-33-IgG2	30	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-34-IgG2	31	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-39-IgG2	32	5,23 x 10 ⁻¹⁰ - 2,62 x 10 ⁻¹⁰	10x - 20x
D3-50-IgG2	33	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-52-IgG2	34	5,23 x 10 ⁻¹⁰ - 2,62 x 10 ⁻¹⁰	10x - 20x
D3-53-IgG2	35	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-54-IgG2	36	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-56-IgG2	38	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-62-IgG2	44	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-65-IgG2	47	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-66-IgG2	48	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-69-IgG2	50	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-70-IgG2	51	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-71-IgG2	52	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-72-IgG2	53	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-73-IgG2	54	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-74-IgG2	55	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-75-IgG2	56	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-76-IgG2	57	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x

(continuación)

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	KD de hCD86-mlg (M)	Avidez de unión por hCD86-mlg (con respecto al dímero de proteínas de fusión Orenicia®)
<p>*Nota: Los números de identificación de secuencias (SEC ID N°) mostrados en la Tabla 3 para las proteínas de fusión CTLA-4 humano-IgG2, Orenicia® y LEA29Y-Ig son los de las secuencias de polipéptidos de estas proteínas de fusión de Ig, respectivamente. El SEC ID N° mostrado en la Tabla 3 para cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante identifica la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante identificada. Los datos se refieren a una CTLA-4-Ig mutante que comprende un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de SEC ID N°: 1-48 y 58-73) fusionado en su extremo N con el extremo C del polipéptido del Fc de IgG2 mostrado en SEC ID N°: 184 ó 218. Procedimientos para la preparación de tales proteínas de fusión se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Sin embargo, como se observa anteriormente, los presentes inventores han encontrado experimentalmente que una CTLA-4-Ig mutante preparada en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del Fc de hIgG2 previsto mostrado en SEC ID N°: 184 no incluye normalmente el residuo de lisina (K) previsto del extremo C; por tanto, la secuencia de polipéptidos del Fc de hIgG2 de una CTLA-4-IgG2 mutante es la mostrada en SEC ID N°: 218, cuya secuencia de polipéptidos del Fc de hIgG2 no incluye el residuo de lisina del extremo C con respecto a la secuencia mostrada en SEC ID N°: 184. Secuencias de proteínas de fusión a modo de ejemplo que no incluyen el residuo de lisina del extremo C se muestran en SEC ID N°: 205-214, 219 y 221.</p>			

La Tabla 4 presenta avideces de unión de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes por hCD80-mlg, como se mide por el ensayo Biacore convencional. Específicamente, la Tabla 4 muestra el nombre del clon de una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante; el número de identificación de secuencias (SEC ID N°) correspondiente a la secuencia de polipéptidos de la proteína de fusión del ECD de CTLA-4 mutante monomérica; la constante de disociación en equilibrio (K_D (molar (M))) para el ensayo de avidez de unión por ligando hCD80-mlg; y la avidez de unión de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante por el ligando hCD80-mlg con respecto a la avidez de unión de la proteína de fusión Orenicia® por el mismo ligando. Para cada proteína mutante se muestra la mejora en veces en la avidez de unión por el ligando hCD80-mlg en comparación con la avidez de unión de la proteína de fusión Orenicia® por el ligando hCD80-mlg (4ª columna en la Tabla 4). La proteína de fusión Orenicia® sirve de referencia, es decir, con la avidez de unión por hCD80-mlg fijada a 1. Las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes normalmente existen como proteínas de fusión diméricas en disolución. Como se muestra en la Tabla 4, las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes diméricas desveladas en el presente documento tienen avideces de unión por el ligando hCD80-mlg que son: (1) al menos aproximadamente iguales a o mayores que la avidez de unión de CTLA-4 humano-IgG2; (2) al menos aproximadamente iguales a o mayores que la avidez de unión de la proteína de fusión Orenicia® por el ligando hCD80-mlg; y/o (3) al menos aproximadamente iguales a o mayores que la avidez de unión de LEA29Y-Ig por el ligando hCD80-mlg. Como se ha tratado anteriormente, cada dímero de CTLA-4-Ig mutante dimérica puede prepararse usando procedimientos expuestos en el Ejemplo 3 anterior.

Se encontró que varias proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tenían una velocidad de disociación de la proteína de fusión hCD80-mlg que era aproximadamente igual a o mayor que la velocidad de disociación de la proteína de fusión Orenicia® del mismo ligando (datos no mostrados). Se encontró que algunas proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tenían una velocidad de asociación por hCD80-mlg aproximadamente igual a o mayor que la velocidad de asociación de la proteína de fusión Orenicia® por el mismo ligando (datos no mostrados).

Muchas proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 4 tenían constantes de disociación en equilibrio para hCD80-mlg (K_D) que fueron más lentas que la constante de disociación en equilibrio para hCD80-mlg de la proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2 u Orenicia®. Además, varias proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 4 tuvieron constantes de disociación en equilibrio para hCD80-mlg que fueron al menos aproximadamente iguales a la constante en equilibrio de hCD80-mlg de LEA29Y-Ig.

Muchas proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 4 tuvieron avideces de unión por hCD80-mlg que fueron mayores que las avideces de unión de la proteína de fusión CTLA-4 humano-IgG2 u Orenicia® por el mismo ligando (la mejora en veces en la avidez de unión por hCD80-mlg con respecto a la proteína de fusión Orenicia® se muestra en la 4ª columna). Adicionalmente, varias proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 4 tuvieron avideces de unión por hCD80-mlg que fueron al menos aproximadamente iguales a la avidez de unión de LEA29Y-Ig por el mismo ligando.

Una CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento que tiene una mayor avidez de unión por hCD80-mlg que la proteína de fusión hCTLA-4-IgG1, Orenicia® u LEA29Y-Ig tendrá probablemente un aumento de la potencia inmunosupresora *in vivo* en comparación con la proteína de fusión hCTLA-4-IgG2, Orenicia® o LEA29Y-Ig, respectivamente, tal como en, por ejemplo, procedimientos terapéuticos y/o profilácticos para suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario de mamíferos tales como, por ejemplo, seres humanos, en los que se desea la inmunoinhibición o inmunosupresión), procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano) y otros procedimientos descritos en

otra parte en el presente documento.

Tabla 4.

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	K _D de hCD80-mIg (M)	Avidez de unión por hCD80-mIg (con respecto al dímero de proteínas de fusión Orencia®)
hCTLA-4-IgG2	162	$6,55 \times 10^{-10}$	1,34x
Dímero de proteínas de fusión Orencia®	164	$8,77 \times 10^{-10}$	1
LEA29Y-Ig	166	$4,39 \times 10^{-10}$ - $2,19 \times 10^{-10}$	2x - 4x
D1-IgG2	58	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D1T-IgG2	59	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D2-IgG2	60	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-IgG2	61	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D4-IgG2	62	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D5-IgG2	63	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D6-IgG2	64	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D20-IgG2	65	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D21-IgG2	66	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D23-IgG2	67	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D24-IgG2	68	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D26-IgG2	69	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D27-IgG2	70	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D28-IgG2	71	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D29-IgG2	72	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D31-IgG2	73	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-1-IgG2	1	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-2-IgG2	2	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-3-IgG2	3	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-4-IgG2	4	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-5-IgG2	5	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-6-IgG2	6	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-7-IgG2	7	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x

(continuación)

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	KD de hCD80-mlg (M)	Avidez de unión por hCD80-mlg (con respecto al dímero de proteínas de fusión Orenzia®)
D3-8-IgG2	8	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-9-IgG2	9	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-11-IgG2	10	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-12-IgG2	11	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-14-IgG2	12	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-15-IgG2	13	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-16-IgG2	14	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-17-IgG2	15	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-19-IgG2	16	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-20-IgG2	17	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-21-IgG2	18	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-22-IgG2	19	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-23-IgG2	20	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-24-IgG2	21	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-25-IgG2	22	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-26-IgG2	23	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-27-IgG2	24	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-28-IgG2	25	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-29-IgG2	26	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-30-IgG2	27	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-31-IgG2	28	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-32-IgG2	29	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-33-IgG2	30	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-34-IgG2	31	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-39-IgG2	32	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x

(continuación)

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	KD de hCD80-mlg (M)	Avidez de unión por hCD80-mlg (con respecto al dímero de proteínas de fusión Orencia®)
D3-50-IgG2	33	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-52-IgG2	34	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-53-IgG2	35	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-54-IgG2	36	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-56-IgG2	38	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-62-IgG2	44	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-65-IgG2	47	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-66-IgG2	48	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-69-IgG2	50	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-70-IgG2	51	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-71-IgG2	52	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-72-IgG2	53	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-73-IgG2	54	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-74-IgG2	55	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-75-IgG2	56	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-76-IgG2	57	$1,75 \times 10^{-9}$ - $4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x

* Nota: Los SEC ID N° mostrados en la Tabla 4 para las proteínas de fusión CTLA-4 humano-IgG2, Orencia® y LEA29Y-Ig son los de las secuencias de polipéptidos de estas proteínas de fusión, respectivamente. El SEC ID N° mostrado en la Tabla 4 para cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante identifica la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante identificada. Los datos se refieren a una CTLA-4-Ig mutante que comprende un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de SEC ID N°: 1-48 y 58-73) fusionado en su extremo N con el extremo C del polipéptido del Fc de IgG2 mostrado en SEC ID N°: 184 ó 218. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado experimentalmente por análisis de EM-CL que una CTLA-4-Ig mutante preparada en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del Fc de hIgG2 previsto mostrado en SEC ID N°: 184 no incluye normalmente el residuo de lisina (K) previsto del extremo C; por tanto, la secuencia de Fc de hIgG2 de polipéptidos de una CTLA-4-IgG2 mutante es la mostrada en SEC ID N°: 218, cuya secuencia de polipéptidos del Fc de hIgG2 no incluye normalmente el residuo de lisina del extremo C con respecto a la secuencia mostrada en SEC ID N°: 184. Secuencias de proteínas de fusión a modo de ejemplo que no incluyen el residuo de lisina del extremo C se muestran en SEC ID N°: 205-214, 219 y 221.

Ensayos cinéticos monoméricos.

Se obtuvo confirmación adicional de las propiedades de unión de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes por ensayos de unión cinéticos monovalentes. Estos ensayos miden la unión cinética de una proteína de prueba bivalente (por ejemplo, una proteína de fusión dimerica CTLA-4-Ig mutante) recubierta en chips de sensor y ligando monovalente (hCD86-mlg digerida con papaína) en la fase móvil. Anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana (Jackson ImmunoResearch, n° 109-005-098) se acopló a chips de sensor CM5 según los protocolos del fabricante, normalmente dando 15.000 unidades de respuesta (UR). El ligando se capturó por incubación de chips de sensor recubiertos por anticuerpo con 10 µl de una disolución de 2 µg/ml de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes dimericas en tampón HBS-EP a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Los niveles de captura de ligando fueron normalmente 25-80 UR. Los ligandos hCD86-mlg monoméricos (creados por digestión con papaína y adsorción sobre proteína A-Sepharose de hCD86-mlg como se describe en Hermanson, G.T. BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, 1996) se diluyeron en tampón HBS-EP y fluyeron por los chips de sensor recubiertos de proteína de prueba durante 2 min a 30 µl/min, seguido de 2 min de incubación con tampón HBS-EP que no contenía proteína a la misma velocidad de flujo. La regeneración entre ciclos se realizó por incubación de 3 min con tampón glicina 10 mM (pH 1,7) a 30 µl/min. Normalmente, 8 diluciones de proteínas de análisis monoméricas que oscilan de 3000 nM a 0,2 nM se analizaron contra una referencia del blanco (tampón HBS-EP solo) por duplicado. Los niveles de señal de R_{máx} para unirse a proteínas CTLA-4-Ig mutantes oscilaron de 10-60 UR.

5 Para análisis cinético, los datos de los ensayos de unión monoméricos se seleccionaron como se ha descrito anteriormente, excepto que la selección de datos de asociación empezó y terminó 5 s desde los tiempos de inicio y terminación de la inyección, y la selección de datos de disociación empezó 5 s después del tiempo de terminación de la inyección, y normalmente incluyó 1-60 s del periodo de disociación. Tales datos también se analizaron para afinidades de equilibrio en estado estacionario usando el software BIAevaluation. Los niveles de unión en estado estacionario para cada concentración (valores de Respuesta_{eq} ("Req")) se promediaron durante el intervalo de 5-20 s próximo al final de la inyección de muestra usando la función "Ajuste general: promedio" de BIAevaluation. La afinidad en estado estacionario se determinó a partir de la representación de Req frente a la concentración usando el software BIAevaluation según la fórmula $Req = K_A \times C \times R_{\text{máx}} / (K_A \times C \times n + 1)$ en la que C es la concentración de analito y n, el factor de interferencia estérico, es 1, y $K_D = 1 / K_A$. En algunos casos se observó unión no específica sustancial, representada por un trazo de valor de R plano residual después de la disociación. Tales datos se corrigieron restando los valores de R residuales de los valores de Req. K_D se calculó luego en el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) usando el modelo de "unión específica a un sitio".

15 Este ensayo de unión monomérico se realizó en un subconjunto de proteínas CTLA-4-Ig mutantes representativas y los resultados se resumen en la Tabla 5. En general, el grado de mejora en la unión de ECD de hCD86 a proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes con respecto a LEA29Y-Ig observado en los ensayos de unión monoméricos fue similar al observado para la unión de hCD86-mIg a proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes con respecto a LEA29Y-Ig en los ensayos cinéticos convencionales. Tales resultados soportan la conclusión de que las mejoras observadas en la cinética de unión para las proteínas mutantes son debidas a mejoras reales en las afinidades de unión de las proteínas mutantes (por ejemplo, en comparación con las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig) y no son debidas a posibles artefactos producidos por la mayor valencia de preparaciones de proteína agregadas.

Tabla 5.

Proteína de fusión (dímero)	SEC ID N°* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	K_D de ECD de hCD86 monomérico (M)	Afinidad de unión por ECD de hCD86 monomérico (con respecto a LEA29Y-Ig)
LEA29Y-Ig	166	$1,68 \times 10^{-6}$	1
D3-IgG2	61	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-4-IgG2	4	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-11-IgG2	10	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-12-IgG2	11	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-14-IgG2	12	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-17-IgG2	15	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-20-IgG2	17	$8,4 \times 10^{-7} - 3,36 \times 10^{-7}$	2x-5x
D3-27-IgG2	24	$8,4 \times 10^{-7} - 3,36 \times 10^{-7}$	2x-5x
D3-29-IgG2	26	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-31-IgG2	28	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x
D3-53-IgG2	35	$< 3,36 \times 10^{-7}$	>5x

*Nota: El SEC ID N° mostrado en la Tabla 5 para LEA29Y-Ig es el de la secuencia de polipéptidos de la proteína de fusión LEA29Y-Ig. El SEC ID N° mostrado en la Tabla 5 para cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante identifica la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante presente en la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante identificada. Los datos se refieren a una CTLA-4-Ig mutante que comprende un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de SEC ID N°: 4, 10-12, 15, 17, 24, 26, 28, 35 y 61) fusionado en su extremo N con el extremo C del polipéptido del Fc de IgG2 mostrado en SEC ID N°: 184 ó 218. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado experimentalmente por análisis de EM-CL que una CTLA-4-Ig mutante preparada en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del Fc de hIgG2 previsto mostrado en SEC ID N°: 184 no incluye normalmente el residuo de lisina (K) previsto del extremo C; por tanto, la secuencia de Fc de hIgG2 de polipéptidos de una CTLA-4-IgG2 mutante es la mostrada en SEC ID N°: 208, cuya secuencia de polipéptidos del Fc de hIgG2 no incluye normalmente el residuo de lisina del extremo C con respecto a la secuencia mostrada en SEC ID N°: 184. Secuencias de proteínas de fusión a modo de ejemplo que no incluyen el residuo de lisina del extremo C se muestran en SEC ID N°: 205-214, 219 y 221. Secuencias de proteínas de fusión a modo de ejemplo que incluyen el residuo de lisina del extremo C se muestran en SEC ID N°: 74-79, 197-200, 220 y 222.

Ejemplo 5

25 Medición de la actividad biológica de mutantes de CTLA-4 usando ensayos de proliferación de PBMC humanas (estimulación de anticuerpos dirigidos contra CD3).

Se ha mostrado que CTLA-4-Ig y variantes particulares de la misma son potentes inhibidores de la proliferación de linfocitos T *in vitro* (véase, por ejemplo, Larson y col., Am. J. Transplant. 5, 443). Para medir la actividad mejorada de proteínas CTLA-4-Ig mutantes en tales ensayos se desarrolló un ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

- 5 Se diluyó sangre humana (recientemente recogida de un programa de donantes) con un volumen igual de PBS y se fraccionó para aislar PBMC usando un gradiente de Histopaque (Sigma, nº 10771)-Ficoll según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las PBMC se diluyeron en medio de crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, nº 10565-018) complementado con 10% de SBF (Hyclone nº SV30014.03) y 1x PSG (Invitrogen, nº 10378-016)) y se añadieron a placas de cultivo de 96 pocillos (BD Biosciences, nº 353077) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo.
- 10 Los compuestos de prueba se diluyeron seriadamente en medio de crecimiento y se añadieron a pocillos por triplicado. La proliferación celular se inició mediante la adición de anticuerpo de ratón dirigido contra CD3 humano (BD Pharmingen: 555329) a una concentración final de 5 µg/ml. Después de la incubación a 37°C durante 2 días (d) se añadió ³H-timidina (GE Healthcare, nº TRK758 5MCl) a 1 µCi/pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 16 h adicionales. Las células se recogieron con un recolector de células (recolector FilterMate Omnifilter-96) usando las
- 15 condiciones recomendadas por el fabricante y se midieron para la incorporación de ³H-timidina usando un contador de centelleo (Wallac Trilux, nº 1450-421). El grado de incorporación de ³H-timidina (captación de ³H-timidina) es indicativo del grado de proliferación de linfocitos T. La incorporación de ³H-timidina se mide por técnicas convencionales. La proliferación de linfocitos T se expresa como los recuentos medios por minuto (cpm) de pocillos por triplicado.
- 20 Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando un modelo de ajuste de curvas por regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoide, pendiente variable) y el procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados. Se informan los parámetros de CI50 (también mostrada como CI₅₀) y sus intervalos de confianza del 95% asociados de los resultados (Tabla 6). La Figura 6 muestra curvas de proliferación celular de un ensayo de proliferación de PBMC representativo (usando estimulación con anticuerpos dirigidos contra CD3) que implican un conjunto de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo - es decir, proteínas de fusión D3-04-IgG2, D3-11-IgG2, D3-12-IgG2 y D3-14-IgG2. La gráfica es una representación de la incorporación de ³H-timidina (recuentos por minuto (cpm)) frente a la concentración de proteína (nanoMolar (nM)). La incorporación de ³H-timidina (captación de ³H-timidina), que es indicativa del grado de proliferación celular, se mide por técnicas convencionales.
- 25 Las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación. Estos resultados demuestran que las proteínas de fusión de Ig CTLA-4-Ig mutantes de la invención tienen significativamente mayor potencia o mayor capacidad que la(s) proteína(s) de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig en inhibir o suprimir la activación policlonal de linfocitos T o proliferación de linfocitos T *in vitro*.
- 30 El ensayo de proliferación de PBMC se realizó usando otras proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. La Tabla 6 proporciona un resumen de los datos para un conjunto representativo de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. La Tabla 6 presenta comparaciones de valores de CI50 medios (nanomolar (nM)) para proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo frente a controles (proteínas de fusión Orenicia®, hCTLA-4-IgG2 y LEA29Y-Ig) en el ensayo de proliferación de PBMC (con estimulación con anticuerpos dirigidos contra CD3). Un valor de CI50 representa la concentración de un compuesto (por ejemplo, proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante, hCTLA-4-IgG2, Orenicia® o LEA29Y-Ig) que se requiere para el 50% de inhibición de la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Los valores de CI50 de experimentos individuales se promediaron para proporcionar valores de CI50 medios, que se usaron para análisis estadísticos. Se usó un ANOVA unilaterial con prueba de Dunnett o Bonferroni a posteriori para comparar proteínas de fusión CLTA-4-Ig y hCTLA-4-IgG2 mutantes con la proteína de fusión Orenicia® o LEA29Y-Ig, respectivamente (C.W. Dunnett, New Tables for Multiple Comparisons with a Control, Biometrics 20(3):482-491 (Sept. 1964); Abdi, Herve, "The Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons", en ENCYCLOPEDIA OF MEASUREMENT AND STATISTICS (N.J. Salkind ed., Thousand Oaks, CA 2007); también disponible en la web universal en la dirección web utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf.). El análisis estadístico de la proteína de fusión de Ig compuesta por uno de los siguientes polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante - clones D24, D3-07, D3-15 y D3-16 - no se realizó como n = 1. El término "DE (log CI50 medio)" representa la desviación estándar
- 35 en valores de log CI50 medio.
- 40
- 45
- 50

Tabla 6. Resumen de los datos de ensayos de proliferación de PBMC a modo de ejemplo usando estimulación con anticuerpos dirigidos contra CD3

Proteína de fusión (dímero)	CI50 media (nM)	Log CI50 medio (nM)	DE (log CI50 medio) (nM)
Dímero de proteínas de fusión Orenicia®	5,16	0,71	0,51
hCTLA-4-IgG2	8,46	0,93	0,43
LEA29Y-Ig	0,48 ¹	-0,32	0,54
D3-4-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,27	0,45
D3-7-IgG2	0,12	-0,93	ND

(continuación)

Proteína de fusión (dímero)	CI50 media (nM)	Log CI50 medio (nM)	DE (log CI50 medio) (nM)
D3-11-IgG2	0,08 ^{1,2}	-1,07	0,40
D3-12-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,27	0,17
D3-14-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,17	0,15
D3-15-IgG2	0,21	-0,69	ND
D3-17-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,36	0,37
D3-20-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,19	0,37
D3-26-IgG2	0,15 ¹	-0,83	0,49
D3-27-IgG2	0,10 ^{1,2}	-1,00	0,41
D3-29-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,13	0,53
D3-30-IgG2	0,18 ¹	-0,74	0,35
D3-31-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,42	0,25
D3-32-IgG2	0,10 ¹	-1,00	0,47
D3-33-IgG2	0,12 ¹	-0,94	0,69
D3-34-IgG2	0,41 ¹	-0,39	0,18
D3-39-IgG2	0,47 ¹	-0,33	0,21
D3-50-IgG2	0,35 ¹	-0,46	0,23
D3-52-IgG2	0,49 ¹	-0,31	0,20
D3-53-IgG2	0,02 ^{1,2}	-1,69	0,24
D3-54-IgG2	0,17 ¹	-0,77	0,22
D3-56-IgG2	0,08 ¹	-1,08	0,20
D3-62-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,29	0,23
D3-69-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,34	0,19
D3-70-IgG2	0,08 ¹	-1,10	0,10
D3-71-IgG2	0,05	-1,32	ND
D3-72-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,54	0,19
D3-73-IgG2	0,23 ¹	-0,64	0,25
D3-75-IgG2	0,08 ¹	-1,11	0,33
D3-76-IgG2	0,13 ¹	-0,88	0,36
D3-IgG2	0,14 ¹	-0,85	0,13
D24-IgG2	0,12	-0,93	ND

Los superíndices mostrados en la Tabla 6 son del siguiente modo: ¹Estadísticamente diferente de Orenca con $p < 0,05$ como se ha determinado por ANOVA unilateral con prueba de Dunnett a posteriori. ²Estadísticamente diferente de LEA con $p < 0,05$ como se ha determinado por ANOVA unilateral con prueba de Bonferroni a posteriori. Las proteínas de fusión que comprenden los ECD de CTLA-4 mutantes de D3-7, D3-15, D3-71 y D24 se probaron una vez y, por tanto, no pudo realizarse comparación estadística. Nota: El término "ND" en la Tabla 6 significa "no disponible".

El análisis estadístico reveló que todas las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes que se probaron en al menos dos ensayos separados y se designan con el superíndice (1) (véase la Tabla 6) fueron estadísticamente superiores en potencia a las proteínas de fusión Orenca® y hCTLA-4-IgG2 ($p < 0,05$) (es decir, tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de PBMC *in vitro* que las proteínas de fusión Orenca® y hCTLA-4-IgG2). Aquellas designadas con el superíndice (2) (véase la Tabla 6) también fueron estadísticamente superiores en potencia a la proteína de fusión LEA29Y-Ig ($p < 0,05$) (es decir, tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de PBMC *in vitro* que la proteína de fusión LEA29Y-Ig), como se ha determinado por ANOVA unilateral con pruebas de Dunnett y Bonferroni a posteriori tratado arriba. No hubo diferencia estadística entre proteínas de fusión de CTLA-4 humano que comprenden tanto Fc de IgG1 modificada (como en Orenca®) como Fc de IgG2 natural (como en hCTLA4-IgG2). Este hallazgo implica que las diferencias en las actividades funcionales mostradas en la Tabla 6 entre las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes desveladas en el presente documento (que comprenden cada una un Fc de IgG2 humana) y tanto

Orencia® como hCTLA4-IgG2 fueron una consecuencia directa de los cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones de aminoácidos) hechos en la región ECD de CTLA-4. Las diferencias en las actividades funcionales entre estas proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes y, por ejemplo, Orencia® (que comprende un Fc de IgG1 modificada) no fueron debidas a diferencias en sus secuencias de polipéptidos del Fc de Ig respectivas.

- 5 Se cree que dado el aumento de las capacidades de las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes desveladas en el presente documento para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos *in vitro* con respecto a las proteínas de fusión Orencia®, LEA29Y-Ig y/o hCTLA-4-IgG2, tales proteínas mutantes también deberían presentar potencias inmunosupresoras elevadas en procedimientos terapéuticos y/o profilácticos *in vivo* con respecto a las proteínas de fusión Orencia®, LEA29Y-Ig y/o hCTLA-4-IgG2. Se cree que cada proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante tal desvelada en el presente documento tiene una mayor capacidad para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en procedimientos o aplicaciones *in vivo* con respecto a las proteínas de fusión Orencia®, LEA29Y-Ig y/o hCTLA-4-IgG2 tal como en, por ejemplo, procedimientos terapéuticos y/o profilácticos para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario en un mamífero tal como por ejemplo, un ser humano), procedimientos para suprimir o inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como por ejemplo, un ser humano) y/u otro tratamiento o procedimientos de diagnóstico descritos en otra parte en el presente documento.

- 20 Aplicando los mismos análisis estadísticos, los presentes inventores no encontraron diferencia estadística entre la proteína de fusión Orencia® (que comprende IgG1 mutante del ECD de CTLA-4 humano) y CTLA-4 humano-IgG2. Por tanto, se cree que las diferencias en los dominios de Ig de estas moléculas (es decir, la IgG1 mutante de la proteína de fusión Orencia® y la IgG2 humana de hCTLA-4-IgG2) no afectaron la funcionalidad de estas moléculas. Véase la Figura 11. La inhibición de la proliferación observada con dosis crecientes de la proteína de fusión Orencia® no fue significativamente diferente de la observada con CTLA-4-IgG2, que indica que sus actividades inmunosupresoras respectivas no están sesgadas según sus diferentes isotipos de IgG, sino que resultan de sus polipéptidos del ECD de hCTLA-4. Por tanto, las diferentes actividades inmunosupresoras entre polipéptidos de CTLA-4-Ig mutante desvelados en el presente documento y la proteína de fusión Orencia® (o LEA29Y-Ig, ya que contiene la misma Ig que en la proteína Orencia®) no pueden atribuirse a sus regiones Fc respectivas que comprenden diferentes isotipos de IgG.

- 30 La divulgación incluye proteínas del ECD de CTLA-4 mutantes monoméricas que tienen una capacidad y, en algunos casos, una mayor capacidad para suprimir o inhibir la activación o proliferación de linfocitos T que una proteína de CTLA-4 humana monomérica o un dominio extracelular de la misma. También se proporcionan proteínas de fusión del ECD de CTLA-4 mutantes monoméricas que tienen una capacidad y, en algunos casos, una mayor capacidad para suprimir o inhibir la activación o proliferación de linfocitos T que una proteína de fusión hCTLA-4 Ig monomérica o un dominio extracelular de la misma. También se incluyen dímeros de proteínas del ECD de CTLA-4 mutante que tienen una capacidad y, en algunos casos, una mayor capacidad para suprimir o inhibir la activación o proliferación de linfocitos T que un dímero que comprende dos dominios extracelulares de CTLA-4 humano. Algunos dímeros de proteínas de fusión del ECD de CTLA-4 mutante desvelados en el presente documento (por ejemplo, dímeros de proteínas de fusión CTLA-4-ECD-Ig mutantes) tienen una capacidad y, en algunos casos, una mayor capacidad para suprimir o inhibir la activación o proliferación de linfocitos T que un dímero de proteínas de fusión hCTLA-4-IgG2, dímero de proteínas de fusión Orencia® y/o dímero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig.

Ejemplo 6

Medición de la actividad biológica de moléculas de CTLA-4-Ig mutantes usando ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ humanos.

- 45 Se ha mostrado que CTLA-4 humano-Ig y variantes particulares de la misma inhiben la proliferación de linfocitos T bloqueando la señalización de CD80 y CD86 por CD28 (Linsley P.S., *Immunity* 1:793-801 (1994); Larson C. P. y col., *Am. J. Transplant.* 5:443-453 (2005)). Debido a que las proteínas CTLA-4-Ig mutantes desveladas en el presente documento tienen avidéz de unión mejorada por el ligando CD86-Ig, se desarrolló un ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺ para medir la actividad de proteínas CTLA-4-Ig mutantes en bloquear la señalización mediante CD86.

- 50 *Creación de secuencia de ADN que codifica una proteína de CD86 humano de longitud completa.*

- Se creó el plásmido pcDNA3.1 hB7.2 FL para codificar la proteína de CD86 humano de longitud completa para la expresión sobre la superficie de células transfectadas. Se generó ADN que codifica CD86 humano por amplificación por PCR de ADNc derivado de leucocitos humanos (BD Biosciences, nº de cat. HL4050AH) usando cebadores de oligonucleótidos directos e inversos diseñados basándose en homología de secuencias con la secuencia de nucleótidos que codifica CD86 expuesta en SEC ID N°: 176. Los cebadores se diseñaron, prepararon y ensamblaron usando técnicas convencionales muy conocidas para aquellos expertos en la materia e incluyeron codones de terminación y de iniciación y sitios de restricción según fuera necesario. Los procedimientos de amplificación por PCR empleados también son muy conocidos en la técnica. Tales técnicas se describen en, por ejemplo, Berger, Ausubel y Sambrook, todos arriba. Se usaron 50 nanogramos (ng) de ADNc como molde en una reacción de PCR

de 100 µl con cebadores directo e inverso 1 µM, tampón polimerasa herculasa (Stratagene; nº 600260) y dNTP 200 µM durante 30 ciclos de amplificación (94°C, 30 s; 50°C, 30 s; 72°C, 60 s). El producto de PCR se purificó por columnas de centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen nº 28106) y se digirió con enzimas de restricción *KpnI* y *NotI*. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, nº 28704) según recomendación del fabricante y se ligaron en el plásmido pcDNA 3.1(+)

similarmemente digerido (Invitrogen, nº de cat. V790-20). Las ligaciones se transformaron en células de *E. coli* TOP10 (Qiagen, nº de cat. C4040-10) según recomendaciones del fabricante. Las células transformadas se incubaron en LB (medio de caldo Luria) que contenía 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante la noche a 37°C y luego se usaron para preparar un caldo de maxiprep (Qiagen; nº 12362) de ADN de plásmido según las condiciones recomendadas por el fabricante.

La secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de CD86 humano de longitud completa se muestra en SEC ID N°: 175. En esta secuencia, los residuos de aminoácidos 1-23 comprenden la secuencia señal predicha, los residuos de aminoácidos 24-241 comprenden el dominio extracelular de CD86 humano, los residuos de aminoácidos 242-270 comprenden el dominio transmembrana y los residuos de aminoácidos 271-329 comprenden el dominio citoplásmico.

Creación de líneas celulares estables que expresan CD86 humano sobre la superficie celular.

Se cultivaron células HEK293 al 80-90% de confluencia en matraces T-75 que contenían 20 ml de medio de crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, nº de cat. 10565-018) complementado con 10% de SBF (nº de cat. de Hyclone SV30014.03) y 1x PSG (Invitrogen, nº de cat. 10378-016)). Las células se transfectaron con 10 µg de ADN de plásmido (pcDNA3.1 hB7.2 FL) mezclado con 60 µl de Eugene 6 (ROCHE, nº 11814443001) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células se incubaron durante 2 días (d) a 37°C en medio de crecimiento y adicionalmente se incubaron durante 10 d a 37°C en medio de selección (medio de crecimiento que contenía 300 µg/ml de geneticina (Invitrogen, nº 10131-027), cambiando los medios cada 2 d. Para permitir la clasificación por FACS, las células transfectadas se tiñeron con anticuerpo dirigido contra CD86 marcado con FITC (BD Biosciences, nº 555) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Usando un clasificador de células (Dako, MoFlo) seleccionado para la señal de FITC, células positivas para CD86 se clasificaron individualmente en placas de cultivo de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, nº CLS-3596) que contenían 200 µl/pocillo de medio de crecimiento que contenía 25% de medio acondicionado (medio de crecimiento previamente recogido de cultivos celulares sin transferir (o sin tratamiento previo)). Después de la incubación a 37°C durante 13-19 d, las células se dispersaron por hidrólisis con tripsina y se transfirieron a placas de cultivo de 24 pocillos que contenían 0,5 ml/pocillo de medio de crecimiento. Después de la incubación a 37°C durante 7 d, las células se dispersaron por hidrólisis con tripsina y se transfirieron a matraces T-75 que contenían 20 ml de medio de crecimiento. Se seleccionaron líneas celulares finales basándose en los altos niveles de expresión de CD86 en la superficie de la célula como se mide por análisis de FACS de células teñidas con anticuerpo dirigido contra CD86 marcado con FITC usando FACSCalibur (BD Biosciences), según las condiciones recomendadas por el fabricante.

Ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ se enriquecieron a >96% a partir de preparaciones de capa leucocitaria humana (Stanford University Blood Center, Stanford, CA) usando el kit de selección positiva para CD4 humano EasySep (StemCell Technologies, nº 18052R) con un separador de células magnético (RoboSep, StemCell Technologies, nº 20000) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los linfocitos T CD4⁺ enriquecidos se ajustaron a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio Yssel (Gemini Bio-Products, nº 400-102) complementado con 10% de SBF (Hyclone SV30014.03) y se añadieron a placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. Las células HEK293 que expresan CD86 humano unido a membrana se irradiaron a 6000 rads (Stanford Research Institute, Menlo Park, CA), se ajustaron a 1×10^6 células/ml en el mismo medio y se añadieron a las placas de cultivo a 50 µl/pocillo. Los compuestos de prueba se diluyeron seriadamente en el mismo medio y se añadieron a los pocillos por triplicado. La proliferación celular se inició mediante la adición de anticuerpo de ratón dirigido contra CD3 humano (BD Pharmingen: 555329) a una concentración final de 5 µg/ml. Después de la incubación a 37°C durante 3 d se añadió ³H-timidina (GE Healthcare, nº TRK758-5MCI) a 1 µCi/pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 18 h adicionales. Las células se recogieron usando un recolector de células (recolector de filtro de Perkin Elmer D961962) y la ³H-timidina se midió usando un contador de centelleo líquido (Wallac Trilux 1450) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando una ecuación de pendiente variable ($Y = \text{Pie} + (\text{Cima} - \text{Pie}) / (1 + 10^{-(\text{LogCI50} - X) \cdot (\text{Pendiente})})$) para generar una CI50 para cada compuesto de prueba. El término “(LogCI50-X)(Pendiente)” es un exponente en la ecuación.

La Figura 7 muestra curvas de proliferación celular de ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ representativos que implican un conjunto de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo - es decir, D3-04-IgG2, D3-11-IgG2, D3-12-IgG2 y D3-14-IgG2. Las proteínas de fusión Orenica® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación. La gráfica es una representación de la incorporación de ³H-timidina (cpm) frente a la concentración (nM) de proteína. La incorporación de ³H-timidina es indicativa del grado de proliferación celular y se mide por técnicas convencionales. Estos resultados demuestran que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes como se desvelan en el presente documento tienen potencia significativamente mayor o mayor capacidad que las proteínas de fusión Orenica® y/o LEA29Y-Ig en inhibir o suprimir la co-estimulación de CD86 *in vitro*.

5 Este ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺ se realizó en varias otras proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. La Tabla 7 proporciona un resumen de los datos para un conjunto de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo. La Tabla 7 presenta comparaciones de valores de CI50 medios (nanomolar (nM)) para proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo frente a controles de referencia (proteínas de fusión Orencea®, LEA29Y-Ig y CTLA-4 humano-IgG2) usando el ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺. Las CI50 de experimentos individuales se promediaron para proporcionar valores de CI50 medios que se usaron para análisis estadísticos. El término "DE (log CI50 medio)" representa la desviación estándar en valores de log CI50 medio.

Tabla 7. Resumen de datos de ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ a modo de ejemplo

Proteína de fusión (dímero)	CI50 media (nM)	Log CI50 medio (nM)	DE (log CI50 medio) (nM)
Dímero de proteínas de fusión Orencea®	1,56	0,19	0,22
hCTLA-4-IpG2	2,24	0,35	0,28
LEA29Y-Ig	0,21	-0,67	0,25
D3-02-IgG2	0,03	-1,56	NA
D3-03-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,40	0,11
D3-04-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,47	0,02
D3-06-IgG2	0,05 ¹	-1,32	0,03
D3-11-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,52	0,07
D3-12-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,45	0,09
D3-14-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,37	0,11
D3-15-IgG2	0,02 ^{1,2}	-1,62	0,08
D3-17-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,47	0,11
D3-20-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,40	0,11
D3-27-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,37	0,10
D3-29-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,36	0,13
D3-31-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,58	0,21
D3-34-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,28	0,13
D3-39-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,35	0,10
D3-50-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,23	0,24
D3-52-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,14	0,24
D3-53-IgG2	0,02 ^{1,2}	-1,70	0,25
D3-54-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,40	0,12
D3-56-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,41	0,07
D3-62-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,44	0,09
D3-65-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,26	0,14
D3-69-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,59	0,14
D3-70-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,30	0,06
D3-71-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,43	0,09
D3-72-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,48	0,05
D3-73-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,26	0,18
D3-75-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,51	0,12
D2-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,52	0,18
D3-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,45	0,17

10 Los superíndices mostrados en la Tabla 7 son del siguiente modo: ¹Estadísticamente diferente a Orencea con p<0,05 como se ha determinado por ANOVA unilateral con prueba de Dunnett a posteriori. ²Estadísticamente diferente a LEA con p<0,05 como se ha determinado por ANOVA unilateral con prueba de Bonferroni a posteriori. La proteína de fusión que comprende el ECD de CTLA-4 mutante de D3-02 se probó una vez y, por tanto, no pudo realizarse comparación estadística.

El análisis estadístico reveló que todas las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes que se probaron en al menos dos ensayos separados y se designan con el superíndice (1) (véase la Tabla 7) fueron estadísticamente superiores en potencia a las proteínas de fusión Orencia® y hCTLA-4-IgG2 ($p < 0,05$) (es decir, tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de linfocitos T CD4⁺ *in vitro* que las proteínas de fusión Orencia® y hCTLA-4-IgG2). Aquellas designadas con el superíndice (2) (véase la Tabla 7) también fueron estadísticamente superiores en potencia a la proteína de fusión LEA29Y-Ig ($p < 0,05$) (es decir, tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de linfocitos T CD4⁺ *in vitro* que la proteína de fusión LEA29Y-Ig), como se ha determinado por ANOVA unilateral con pruebas de Dunnett y Bonferroni a posteriori, tratado arriba. No hubo diferencia estadística entre proteínas de fusión de CTLA-4 humano que comprenden tanto Fc de IgG1 modificada (como en Orencia®) como Fc de IgG2 natural (como en hCTLA4-IgG2). Este hallazgo implica que las diferencias en las actividades funcionales mostradas en la Tabla 7 entre las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes (que comprenden cada una un Fc de IgG2 humana) y tanto Orencia® como hCTLA4-IgG2 fueron una consecuencia directa de los cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones de aminoácidos) hechos en la región ECD de CTLA-4. Las diferencias en las actividades funcionales entre estas proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes y, por ejemplo, Orencia® (que comprende un Fc de IgG1 modificada) no fueron debidas a diferencias en sus secuencias de polipéptidos del Fc de Ig respectivas.

Se cree que dado el aumento de las capacidades de las proteínas CTLA-4-Ig mutantes desveladas en el presente documento para suprimir o inhibir la co-estimulación de linfocitos T mediada por CD86 (por ejemplo, linfocitos T humanos) en ensayos *in vitro* con respecto a proteínas de fusión Orencia®, LEA29Y-Ig y/o hCTLA-4-IgG2, tales proteínas mutantes también deberían presentar potencias inmunosupresoras elevadas en procedimientos o aplicaciones terapéuticos y/o profilácticos *in vivo* con respecto a proteínas de fusión Orencia®, LEA29Y-Ig y/o CTLA-4 humano-Ig (por ejemplo, CTLA-4 humano-IgG2 ("hCTLA-4-IgG2")), respectivamente. En un aspecto se cree que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes como se desvelan en el presente documento tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la co-estimulación de linfocitos T mediada por CD86 (por ejemplo, linfocitos T humanos) en procedimientos o aplicaciones *in vivo* en comparación con proteínas de fusión Orencia®, LEA29Y-Ig y/o CTLA-4 humano-Ig (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2), respectivamente, tal como en, por ejemplo, procedimientos terapéuticos y/o profilácticos para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario en, por ejemplo, un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano), procedimientos para suprimir o inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano) y/u otro tratamiento o procedimientos de diagnóstico descritos en otra parte en el presente documento.

Ejemplo 7

Medición de la actividad biológica de moléculas de CTLA-4-Ig mutante usando ensayos de proliferación de PBMC humanas (estimulación de antígenos de memoria).

La activación de linfocitos T de memoria es un aspecto importante de la autoinmunidad (Rogers N.J. y col. Eur. J. Immunol 35:2909-2919 (2005)). A este respecto, para medir la actividad inmunosupresora de proteínas CTLA-4-Ig mutantes se desarrolló un ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando estimulación con antígeno PPD.

Se diluyó sangre humana (recientemente recogida de un programa de donantes) con un volumen igual de PBS y se fraccionó para aislar PBMC usando un gradiente de Histopaque (Sigma, n° 10771)-Ficoll según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las PBMC se diluyeron en medio RPMI (Sigma, n° R8758) complementado con 10% de SBF (Hyclone n° SV30014.03) y 1x PSG (penicilina, estreptomycin y glutamina) (Invitrogen, n° 10378-016) y se añadieron a placas de cultivo de 96 pocillos (BD Biosciences, n° 353077) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Los compuestos de prueba se diluyeron seriadamente en el mismo medio y se añadieron a pocillos por cuadruplicado. La proliferación celular se inició mediante la adición de antígeno PPD (proteína purificada derivada de *Mycobacterium tuberculosis*, Mycos, n° P-1000-001) a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$. Después de la incubación a 37°C durante 5 d se añadió ³H-timidina (GE Healthcare, n° TRK758-5MCI) a 1 $\mu\text{Ci/pocillo}$ y las placas se incubaron a 37°C durante 18 h adicionales. Las células se recogieron con un recolector de células (recolector FilterMate Omnifilter-96, Perkin Elmer) usando las condiciones recomendadas por el fabricante y se midieron para la incorporación de ³H-timidina usando un contador de centelleo (Wallac Trilux, n° 1450-421). Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando un modelo de ajuste de curvas por regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoide, pendiente variable) y el procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados. Se informan los parámetros de CI₅₀ (o "CI50") y sus intervalos de confianza del 95% asociados.

La Figura 8 muestra curvas de proliferación celular de ensayos de proliferación de PBMC representativos que implican un conjunto de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo - es decir, proteínas de fusión D3-IgG2, D3-12-IgG2, D3-17-IgG2 y D3-29-IgG2. Las proteínas de fusión Orencia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación. La gráfica es una representación de la incorporación de ³H-timidina (cpm) frente a la concentración de proteína (nM). La incorporación de ³H-timidina, que es indicativa del grado de proliferación celular, se mide por técnicas convencionales. Estos resultados demuestran que, en un aspecto, las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes como se desvelan en el presente documento tienen significativamente mayor potencia que las proteínas Orencia® y/o LEA29Y-Ig en inhibir o suprimir la proliferación de linfocitos T de memoria *in vitro* (por

ejemplo, proteínas CTLA-4-Ig mutantes tienen una mayor capacidad que las proteínas Orenicia® y/o LEA29Y-Ig en inhibir o suprimir la proliferación de linfocitos T de memoria *in vitro* en ensayos de proliferación de PBMC humanas (estimulación de antígenos de memoria).

5 Este ensayo de proliferación de PBMC con estimulación de antígenos PPD se realizó en varias otras proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes. La Tabla 8 proporciona un resumen de los datos para un conjunto de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo. La Tabla 8 presenta comparaciones de valores de CI50 medios (nanomolar (nM)) para proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo frente a controles de referencia (proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig) usando el ensayo de proliferación de PBMC con estimulación de antígenos de memoria. Los valores de CI50 de experimentos individuales se promediaron para proporcionar valores de CI50
10 medios que se usaron para análisis estadísticos. El término “DE (log CI50 medio)” representa la desviación estándar en valores de log CI50 medios.

Tabla 8. Resumen de los datos de ensayos de proliferación de PBMC a modo de ejemplo usando estimulación con antígenos PPD

Proteína de fusión (dímero)	CI50 media (nM)	Log CI50 medio (nM)	DE (log CI50 medio) (nM)
Dímero de proteínas de fusión Orenicia®	5,92	0,67	0,37
LEA29Y-Ig	0,31	-0,71	0,53
D3-IgG2	0,03	-1,49	ND
D3-12-IgG2	0,06	-1,27	0,17
D3-14-IgG2	0,07	-1,17	0,15
D3-17-IgG2	0,07	-1,24	0,25
D3-20-IgG2	0,13	-0,91	0,18
D3-27-IgG2	0,17	-0,84	0,30
D3-29-IgG2	0,07	-1,16	0,18
D3-34-IgG2	0,51	-0,29	ND
D3-50-IgG2	0,28	-0,55	ND
D3-53-IgG2	0,05	-1,29	ND
D3-54-IgG2	0,01	-2,00	ND
D3-56-IgG2	0,01	-1,92	ND
D3-69-IgG2	0,01	-2,00	ND
D3-71-IgG2	0,01	-1,87	ND
D3-75-IgG2	0,01	-2,02	ND
D3-76-IgG2	0,01	-1,89	ND

Nota: El término “ND” en la Tabla 8 significa “no disponible”.

15 El análisis estadístico reveló que todas las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes probadas fueron estadísticamente superiores en potencia a tanto las proteínas de fusión Orenicia® como LEA29Y-Ig con $p < 0,05$, como se ha determinado por ANOVA unilateral con pruebas de Dunnett y Bonferroni a posteriori, respectivamente, tratado arriba (por ejemplo, las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tienen una mayor capacidad que las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig en inhibir o suprimir la proliferación de linfocitos T de memoria *in vitro* en ensayos de proliferación de PBMC humanas (estimulación de antígenos de memoria)).

20 Se cree que dado el aumento de las capacidades de las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes como se desvelan en el presente documento para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T de memoria (por ejemplo, linfocitos T de memoria humanos) en ensayos *in vitro* con respecto a las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig, tales proteínas mutantes también deberían presentar potencias inmunosupresoras elevadas en procedimientos o aplicaciones terapéuticos y/o profilácticos *in vivo* con respecto a proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig y/o CTLA-4 humano-Ig (por ejemplo, CTLA-4 humano-IgG2). En un aspecto se cree que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes como se desvelan en el presente documento tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T de memoria (por ejemplo, linfocitos T de memoria humanos) en un procedimiento o aplicación *in vivo* en comparación con proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig y/o CTLA-4 humano-Ig (por ejemplo, CTLA-4 humano-IgG2) tales como en, por ejemplo, procedimientos terapéuticos y/o profilácticos para
25 suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario en, por ejemplo, un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano), procedimientos para suprimir o inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano) y/u otro tratamiento o procedimientos de
30

diagnóstico descritos en otra parte en el presente documento.

Ejemplo 8

Medición de la actividad biológica de moléculas de CTLA-4-Ig mutante usando ensayos de MLR (reacción de linfocitos mixtos) humanos.

5 CTLA-4-Ig y variantes de la misma son potentes inhibidores de alorrespuestas primarias *in vitro* (Vaughan, A. N. y col., J. Immunol. 165:3175-3181 (2000); Wallace P. M., y col., Transplantation 58:602-610 (1994)). Para medir la actividad mejorada de proteínas CTLA-4-Ig mutantes en tales ensayos se desarrolló un ensayo de proliferación celular por reacción de linfocitos mixtos (MLR) humanos.

10 Se diluyó sangre humana (recientemente recogida de un programa de donantes humanos) con un volumen igual de PBS y se fraccionó para aislar PBMC usando un gradiente de Histopaque (Sigma, n° 10771)-Ficoll según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las PBMC de un donante se diluyeron en medio RPMI (Sigma, n° R8758) complementado con 10% de SBF (Hyclone n° SV30014.03) y 1x PSG (Invitrogen, n° 10378-016) y se añadieron a placas de cultivo de 96 pocillos (BD Biosciences, n° 353077) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Las PBMC de un donante diferente se irradiaron a 2500 rads, se diluyeron en el mismo medio y se añadieron a las mismas placas a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Los compuestos de prueba se diluyeron seriadamente en el mismo medio y se añadieron a los pocillos por cuadruplicado. Después de la incubación a 37°C durante 5 d se añadió ^3H -timidina (GE Healthcare, n° TRK758 5MCI) a 1 μCi /pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 18 h adicionales. Las células se recogieron con un recolector de células (recolector FilterMate Omnifilter-96, Perkin Elmer) usando las condiciones recomendadas por el fabricante y se midieron para la incorporación de ^3H -timidina usando un contador de centelleo (Wallac Trilux, n° 1450-421). Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando un modelo de ajuste de curvas por regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoide, pendiente variable) y el procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados. Se informan los parámetros de CI50 y sus intervalos de confianza del 95% asociados.

25 La Figura 9 muestra curvas de proliferación celular de ensayos de proliferación por MLR representativos que implican una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo: D3-IgG2. Las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación. La gráfica es una representación de la incorporación de ^3H -timidina (cpm) frente a la concentración de proteína (nM). La incorporación de ^3H -timidina, que es indicativa del grado de proliferación celular, se mide por técnicas convencionales. Estos resultados demuestran que D3-IgG2 tiene potencia significativamente mayor que las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig en inhibir o suprimir la aloestimulación primaria de linfocitos T *in vitro* (por ejemplo, D3-IgG2 tiene una mayor capacidad para suprimir o inhibir la aloestimulación primaria de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de MLR *in vitro* que las proteínas de fusión Orenicia® o LEA29Y-Ig).

35 Este ensayo de MLR se realizó en varias otras proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes desveladas en el presente documento. La Tabla 9 proporciona un resumen de los datos para un conjunto de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo. La Tabla 9 presenta comparaciones de valores de CI50 medios (nanomolar (nM)) para proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes a modo de ejemplo frente a controles de referencia (proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig) en el ensayo de MLR. Los valores de CI50 de dos experimentos separados se promediaron para proporcionar valores de CI50 medios. El término "DE (log CI50 medio)" representa la desviación estándar en valores de log CI50 medio. Los valores de CI50 medios para las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes mostradas en la Tabla 9 fueron inferiores a los valores de CI50 medios respectivos de las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig.

45 Se desvelan proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes que se cree que son superiores en potencia a las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig (por ejemplo, se cree que las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la aloestimulación primaria de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de MLR *in vitro* que las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig).

50 Se cree que, basándose en las capacidades potenciadas esperadas de proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes como se desvela en el presente documento para suprimir o inhibir la aloestimulación primaria de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos) en ensayos *in vitro* con respecto a proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig, tales proteínas mutantes también deberían presentar potencias inmunosupresoras elevadas en procedimientos o aplicaciones terapéuticos y/o profilácticos *in vivo* con respecto a las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig.

55 En un aspecto, las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes como se desvelan en el presente documento tienen potencia significativamente mayor que las proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig y/o CTLA-4 humano-Ig (por ejemplo, CTLA-4 humano-IgG2) en inhibir o suprimir la aloestimulación primaria de linfocitos T *in vitro* (por ejemplo, las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes tienen una mayor capacidad para suprimir o inhibir la aloestimulación primaria de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de MLR *in vitro* que Orenicia®, LEA29Y-Ig y/o CTLA-4 humano-Ig). En un aspecto se cree que una CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento tiene una mayor capacidad para suprimir o inhibir la aloestimulación primaria de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos) en un procedimiento o aplicación *in vivo* en comparación con las proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-

- 5 Ig y/o CTLA humano-4-Ig tal como en, por ejemplo, un procedimiento terapéutico y/o profiláctico de supresión de o inhibición de una respuesta inmunitaria en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario en un mamífero tal como por ejemplo, un ser humano), un procedimiento de supresión de o inhibición de rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero tal como por ejemplo, un ser humano) y/u otro tratamiento o procedimientos de diagnóstico descritos en otra parte en el presente documento.

Tabla 9. Resumen de los datos de ensayos de MLR a modo de ejemplo

Proteína de fusión (dímero)	CI50 media (nM)	Log CI50 medio (nM)	DE (log CI50 medio) (nM)
Dímero de proteínas de fusión Orencea®	12,53	1,05	0,23
LEA29Y-Ig	0,92	-0,19	0,48
D3-IgG2	0,06	-1,26	ND
D3-12-IgG2	0,09	-1,11	0,34
D3-14-IgG2	0,08	-1,20	0,43
D3-17-IgG2	0,09	-1,15	0,43
D3-20-IgG2	0,14	-1,11	0,64
D3-27-IgG2	0,13	-1,29	0,86
D3-29-IgG2	0,11	-1,14	0,54
D3-34-IgG2	0,10	-1,09	0,39
D3-53-IgG2	0,02	-1,64	0,11
D3-54-IgG2	0,07	-1,13	ND
D3-56-IgG2	0,06	-1,23	ND
D3-69-IgG2	0,04	-1,41	ND
D3-71-IgG2	0,05	-1,32	ND
D3-75-IgG2	0,08	-1,11	ND
D3-76-IgG2	0,08	-1,11	ND

Nota: El término "ND" en la Tabla 9 significa "no disponible".

Ejemplo 9

- 10 Un paciente humano adulto que padece artritis reumatoide puede tratarse con una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble del siguiente modo. Se prepara una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS). Una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble a modo de ejemplo comprende dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas idénticas ligadas juntas por uno o más enlaces disulfuro, comprendiendo cada proteína de fusión monomérica tal un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada de cualquiera de SEC ID N°: 1-73 fusionada en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG2 humana. Proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden secuencias de polipéptidos expuestas en cualquiera de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222. Tales proteínas de fusión se expresan normalmente en forma dimérica. La concentración de la proteína de fusión en la composición farmacéutica puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, y similares. Por ejemplo, la concentración de proteína de fusión en la composición farmacéutica puede ser aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml o 200 mg/ml. El pH de tal composición farmacéutica es aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, que incluye aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, preferentemente aproximadamente pH 6,0 a pH 8,0, aproximadamente 6,5 a pH 7,5, o aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0.
- 30 El tratamiento de la artritis reumatoide del paciente se lleva a cabo administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de CTLA-4-Ig mutante al paciente (por ejemplo, dosis eficaz) por inyección intravenosa o subcutánea. El sitio de inyección puede ser, por ejemplo, el brazo, torso o pierna del paciente. La dosis eficaz de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante administrada es normalmente, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente humano adulto tal como, por ejemplo, de

aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg, aproximadamente 0,01-3,0 mg/kg, aproximadamente 0,05-2,5 mg/kg, aproximadamente 0,1-2,0 mg/kg, aproximadamente 0,1-1,0 mg/kg, aproximadamente 0,01-0,05 mg/kg, aproximadamente 0,5-1,5 mg/kg, aproximadamente 1,0-4,0 mg/kg, aproximadamente 1,0-3,0 mg/kg, aproximadamente 1,0-2,0 mg/kg, que incluye, pero no se limitan a, aproximadamente 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,25 mg/ml, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg o 100 mg/kg de peso corporal del paciente se administra al paciente. Alternativamente puede usarse una cantidad o dosis eficaz o intervalo de dosis descrito en la sección "Procedimientos de la invención" anterior. La dosis de la proteína de fusión que va a administrarse se determina basándose en la potencia de la proteína de fusión y/o la gravedad de los síntomas o signos de artritis reumatoide del paciente. La cantidad total de proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante administrada al paciente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, normalmente de aproximadamente 1 mg a 100 mg, de aproximadamente 10 mg a 100 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 75 mg, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg. El volumen de la composición farmacéutica administrada al paciente se determina basándose en la concentración de proteína de fusión en la composición y la dosis de proteína de fusión a administrar. Para inyección subcutánea normalmente se administran uno a dos mililitros de la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión por inyección. Para inyección intravenosa puede administrarse un volumen apropiado de la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión.

Tras la inyección de la dosis inicial puede administrarse una segunda dosis idéntica de la proteína de fusión al paciente subcutáneamente (por ejemplo, inyección s.c.) o intravenosamente (por ejemplo, inyección i.v.), por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 semanas después de la dosis inicial. El programa de dosificación puede ser una dosis cada dos semanas, una dosis/mes, una dosis cada dos meses, etc., dependiendo, por ejemplo, de la afección del paciente. Pueden administrarse dosis posteriores cada cuatro semanas o más o menos frecuentemente, según sea necesario. La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo de la afección del paciente y puede depender de la gravedad de los síntomas o signos de artritis reumatoide del paciente.

En un aspecto a modo de ejemplo, una cantidad de una composición farmacéutica que comprende un dímero de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento (tal como D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, etc.) y un excipiente farmacéuticamente aceptable suficiente para proporcionar una dosis del dímero de proteínas de fusión de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal se administra por inyección subcutánea a un ser humano que padece artritis reumatoide una vez por semana o una vez por mes, según se necesite, dependiendo de la afección del paciente y respuesta al fármaco.

En otro aspecto a modo de ejemplo, una cantidad de una composición farmacéutica que comprende un dímero de proteínas de fusión CTLA-4-Ig como se desvela en el presente documento (tal como D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, etc.) y un excipiente farmacéuticamente aceptable suficiente para proporcionar una dosis del dímero de proteínas de fusión de aproximadamente 10 mg/kg se administra intravenosamente a un ser humano que padece artritis reumatoide una vez por semana o una vez por mes, según se necesite, dependiendo de la afección del paciente y la respuesta al fármaco. Pueden usarse procedimientos i.v. convencionales para tal administración. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede infundirse en el ser humano con otro líquido tal como una solución salina estéril, disolución de dextrosa u otra disolución isotónica usando un goteo intravenoso continuo convencional mediante un dispositivo de acceso intravenoso convencional.

Se espera que cada procedimiento de tratamiento anteriormente descrito por inyección s.c. o i.v. reduzca o alivie uno o más signos, síntomas o respuestas biológicas asociados a artritis reumatoide tales como, por ejemplo, inflamación, dolor con la palpación de las articulaciones, hinchazón de articulaciones, dolor, atrofia del tejido y rigidez en el paciente. Tal tratamiento puede reducir adicionalmente la progresión de la enfermedad en el paciente, particularmente en los tejidos conjuntivo, muscular y esquelético. Por ejemplo, tal tratamiento puede reducir la progresión de lesión a o deterioro de tejido conjuntivo, tejido muscular por atrofia, hueso, articulaciones, cartílago y/o columna espinal, y similares en el paciente. También pueden reducirse o aliviarse síntomas clínicos adicionales de la enfermedad, que incluyen lesión producida a la piel, sistema nervioso central u órganos. Tal tratamiento también puede mejorar el funcionamiento físico del paciente.

50 Ejemplo 10

Un paciente humano adulto que se somete a terapia de mantenimiento para la prevención del rechazo del trasplante de órgano puede tratarse con una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble del siguiente modo. Se prepara una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS o similares). Una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante soluble a modo de ejemplo comprende dos proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes monoméricas idénticas ligadas juntas por uno o más enlaces disulfuro, comprendiendo cada proteína de fusión monomérica tal un polipéptido del ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada de cualquiera de SEC ID N°: 1-73 fusionada en su extremo C con el extremo N de un polipéptido del Fc de IgG2 humana. Proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden secuencias de polipéptidos expuestas en cualquiera de SEC ID N°: 74-79, 197-200, 205-214 y 219-222. La concentración de la proteína de fusión en la composición farmacéutica puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 1

5 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, y similares. Por ejemplo, la concentración de proteína fusión en la composición farmacéutica puede ser aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml o 200 mg/ml. El pH de tal composición farmacéutica es aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, que incluye aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 6,0 a pH 8,0, aproximadamente 6,5 a pH 7,5, o aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0.

La terapia de mantenimiento para la prevención o supresión del rechazo del trasplante de órgano se lleva a cabo administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de CTLA-4-Ig mutante al paciente (por ejemplo, dosis eficaz) que ha recibido un trasplante de órgano (por ejemplo, trasplante de riñón) por inyección intravenosa o subcutánea. El sitio de inyección puede ser, por ejemplo, el brazo, torso o pierna del paciente. La dosis eficaz de la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante administrada es normalmente, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente humano adulto tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg, aproximadamente 0,01-3,0 mg/kg, aproximadamente 0,05-2,5 mg/kg, aproximadamente 0,1-2,0 mg/kg, aproximadamente 0,1-1,0 mg/kg, aproximadamente 0,01-0,05 mg/kg, aproximadamente 0,5-1,5 mg/kg, aproximadamente 1,0-4,0 mg/kg, aproximadamente 1,0-3,0 mg/kg, aproximadamente 1,0-2,0 mg/kg, que incluye, pero no se limita a, aproximadamente 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,25 mg/ml, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg o 100 mg/kg de peso corporal del paciente se administra al paciente. Alternativamente puede usarse una cantidad o dosis eficaz o intervalo de dosis descrito en la sección "Procedimientos" anterior. La dosis de la proteína de fusión que va a administrarse se determina basándose en la potencia de la proteína de fusión y/o la gravedad de los síntomas o signos de rechazo del trasplante de órgano del paciente. La cantidad total de proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante administrada al paciente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, normalmente de aproximadamente 1 mg a 100 mg, de aproximadamente 10 mg a 100 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 75 mg, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg. El volumen de la composición farmacéutica administrada al paciente se determina basándose en la concentración de proteína de fusión en la composición y la dosis de proteína de fusión que va a administrarse. La proteína de fusión puede administrarse cualquier día después del trasplante, por ejemplo, día 1, 4, 7, 14, 28, 56, 84, etc. después del trasplante. Para inyección subcutánea normalmente se administran uno a dos mililitros de la composición farmacéutica. Para inyección intravenosa puede administrarse un volumen apropiado de la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión.

Tras la inyección de la dosis inicial puede administrarse una segunda dosis idéntica de la proteína de fusión al paciente subcutáneamente o intravenosamente 1, 2, 3 ó 4 semanas después de la dosis inicial. El programa de dosificación puede ser una dosis cada dos semanas, una dosis/mes, una dosis cada dos meses, etc., dependiendo, por ejemplo, de la afección del paciente. Pueden administrarse dosis posteriores cada cuatro semanas o más o menos frecuentemente, según sea necesario, y continuar, si se desea, mensualmente. La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo de la afección del paciente y puede depender de la gravedad de los síntomas o signos de rechazo de trasplante del órgano del paciente.

Se espera que tal tratamiento reduzca o alivie uno o más signos, síntomas o respuestas biológicas asociados a rechazo del trasplante de órgano tales como, por ejemplo, rechazo agudo del órgano trasplantado, rechazo crónico del órgano trasplantado, disminución en la función del órgano trasplantado, aumento en los niveles de creatinina en suero en el paciente y/o aumento de la infiltración de linfocitos T en el órgano trasplantado. Tal tratamiento puede reducir la probabilidad de rechazo del órgano trasplantado por el sistema inmunitario del paciente.

Ejemplo 11

Evaluación farmacocinética de proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes en ratas.

La concentración en suero de un agente terapéutico después de la administración externa a un organismo vivo influye enormemente en la eficacia terapéutica, y se determina por evaluación farmacocinética (PC). En el siguiente procedimiento, los perfiles PC se evaluaron en ratas para los artículos de prueba de CTLA-4-IgG2 mutante representativos D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2 y D3-75-IgG2 en comparación con tanto artículos de prueba de proteína de fusión hCTLA-4-IgG2 como Orencia®. Inmediatamente se describen el diseño del estudio y la generación e interpretación de datos.

Diseño del estudio in vivo.

Se usaron ratas Hans Wistar macho del mismo peso después de un periodo de aclimatación de al menos 5 días. Los volúmenes de dosificación de artículos de prueba se calcularon para animales individuales basándose en su peso de forma que todos recibieran 1 mg/kg del artículo de prueba. Por tanto, una rata de 150 gramos (g) típica recibió 150 µl

de volumen de dosificación ya que cada artículo de prueba se preparó a 1 mg/ml en PBS. Se administró una única administración de un artículo de prueba de CTLA-4-IgG2 mutante descrito anteriormente, proteína de fusión hCTLA-4IgG2 u Orenicia®, tanto como un bolo intravenoso (i.v. o IV) como por la vía subcutánea (abreviada “s.c.” o “SC”). El tamaño del estudio fue suficiente para un mínimo de cuatro muestreos de sangre de 300 µl por momento de tiempo, mientras que se restringió el volumen de sangre extraído de cualquier rata dada a no más del 10% del volumen de sangre total. El transcurso del tiempo de muestreo de sangre fue tanto antes de la dosis, 5 minutos (min), 30 min, 2 horas (h), 4 h, 8 h, 1 día (d), 2 d, 3 d, 4 d, 6 d, 8 d, 10 d, 12 d y 14 d después de la dosis, o 5 min, 30 min, 2 h, 4 h, 8 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 6 d, 8 d, 10 d, 11 d, 12 d, 13 d, 14 d y 15 d después de la dosis para administraciones i.v y s.c., respectivamente. Se preparó suero a partir de muestras de sangre individuales y se probó por ELISA para cuantificar la presencia del artículo de prueba administrado.

Procedimiento PC de ELISA.

La proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante, hCTLA-4IgG2 u Orenicia® presente en las muestras de suero se unió a CD80 humano-IgG murina (descrita anteriormente) previamente recubierta sobre placas de microtitulación. La detección se logró mediante adición de un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch n° 109-035-098). La cuantificación fue mediante el uso de un sustrato HRP cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), más peróxido de hidrógeno (Kem-En-Tec n° 4390A), por lo que la reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 0,2 N (H₂SO₄) y la absorbancia óptica se midió a 450 nm por un espectrofotómetro. Las muestras de suero se diluyeron previamente 1/20 antes de la adición a la placa de ELISA de forma que la matriz se normalizó al 5% de sueros de rata y adicionalmente se diluyó en 5% de sueros de rata para un total de ocho diluciones. La concentración de cada muestra de suero diluido se cuantificó contra una curva patrón preparada usando valoraciones del mismo artículo de prueba enriquecido en 5% de sueros de rata. La curva patrón osciló de 10 a 0,078 ng/ml, y se determinó que el intervalo de precisión era dos veces el ruido a 5 ng/ml en 5% de sueros de rata. La calidad de la curva patrón se evaluó por controles de calidad (QC) del mismo artículo de prueba preparado en 5% de sueros de rata a concentraciones altas, medias y bajas del intervalo de precisión de la curva patrón. El criterio de aceptación de QC fue que la concentración de QC observada estuviera dentro del 20% de la concentración de QC esperada. La concentración de una muestra de suero desconocida individual se generó promediando las concentraciones asignadas a diluciones con densidades ópticas (DO) dentro del intervalo de precisión de la curva patrón. Se usaron al menos 4 muestras de suero individuales para calcular la concentración en suero media en cada momento nominal.

Parámetros PC.

Las Figuras 15A y 15B muestran perfiles PC para la proteína de fusión Orenicia®, hCTLA-4-IgG2 y las proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes administradas a 1 mg/kg como un único (A) bolo intravenoso (IV) o (B) inyección subcutánea (SC) en ratas. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (DE). La línea discontinua representa el límite más bajo de cuantificación para ELISA (~3 ng/ml para el artículo de prueba en 100% de sueros). La concentración en suero media en cada momento nominal después de la administración del artículo de prueba en el momento 0 h comprende los puntos de datos del perfil de concentración semilogarítmica-tiempo en la Figura 15.

Las concentraciones en suero medias se usaron para generar parámetros PC usando WinNonLin modelo 201 (entrada de bolo i.v.), o modelo 200 (entrada extravascular) para las vías de dosificación i.v. (IV) o s.c. (SC), respectivamente. La Tabla 10 resume los parámetros PC clave para las vías de administración s.c. y i.v., respectivamente.

Tabla 10. Resumen de parámetros PC para proteína de fusión Orenicia®, hCTLA-4-IgG2 y proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes administradas a 1 mg/kg como un único bolo I.V. o S.C. a ratas

Compuesto	Vía	Cmáx (ug/l)	T1/2 (h)	ABC (h*ng/l)	Cl (ml/h/kg)	Vz (ml/kg)
Orenicia	SC	3,3	70,0	391	2,6	258,13
CTLA-4IgG2	SC	5,9	45,0	838	1,2	77,49
D3-29	SC	4,6	11,2	650	1,5	24,90
D3-54	SC	4,5	23,6	528	1,9	64,52
D3-56	SC	7,4	23,7	1049	1,0	32,67
D3-69	SC	6,0	28,1	967	1,0	41,97
D3-75	SC	9,0	56,4	1204	0,8	67,59
Orenicia	IV	22,3	42,3	728	1,37	83,9
CTLA-4IgG2	IV	66,2	49,8	2483	0,40	29,0
D3-29	IV	43,0	33,0	912	1,10	52,2
D3-54	IV	20,6	39,4	1034	0,97	55,0
D3-56	IV	34,2	15,3	1822	0,55	12,1
D3-69	IV	81,9	83,0	2133	0,47	56,1
D3-75	IV	30,1	65,4	2326	0,43	40,5

5 $C_{m\acute{a}x}$ se refiere a la concentración máxima en suero del artículo de prueba. El valor de la semivida terminal ($T_{1/2}$) es el tiempo necesario en horas para que la concentración del artículo de prueba en el suero disminuya a la mitad durante la fase de terminación del perfil de concentración-tiempo. El área bajo la curva (ABC) de la concentración en suero-tiempo se cuantifica desde el tiempo cero hasta el infinito usando la regla trapezoidal. La eliminación (Cl) se calculó usando la ecuación dosis/ABC, mientras que el volumen de distribución (Vz) de la fase terminal se calculó usando la ecuación Cl/k .

El factor de biodisponibilidad (F) para cada compuesto se presenta en la Tabla 11, y se determinó calculando el ABC por la vía subcutánea / ABC por la vía intravenosa.

10 Tabla 11. Comparación de la biodisponibilidad de la proteína de fusión Orencia®, proteínas de fusión hCTLA-4-Ig2, D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2 y D3-75-IgG2

Compuesto	Biodisponibilidad
Orencia	0,54
CTLA-4IgG2	0,34
D3-29	0,71
D3-54	0,51
D3-56	0,58
D3-69	0,45
D3-75	0,52

15 La proteína de fusión CTLA humano-4-IgG2 y Orencia® presentaron perfiles PC similares a pesar de su diferencia en regiones estructurales de IgG, implicando que las porciones de Fc de IgG2 humana y IgG1 humana mutada de estos artículos de prueba respectivos tienen actividad PC comparable cuando el dominio funcional es constante. Por inferencia, cualquier cambio observado en el perfil PC para proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes con respecto a la proteína de fusión Orencia® debe ser por tanto atribuible a diferencias en el dominio funcional, y no a la porción de Fc.

20 Para cada proteína de fusión CTLA-4-IgG2 mutante, la eliminación fue lenta como se ha sugerido por los largos valores de semivida y grandes áreas bajo las curvas. Las semividas oscilaron de 11,2 a 56,4 h para la dosificación SC y de 15,3 a 83,0 horas (h) para la dosificación IV en comparación con la proteína de fusión Orencia®, que tuvo una semivida de 70,0 ó 42,3 horas cuando se administró por vías SC o IV, respectivamente. Los valores del ABC para las proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes fueron en promedio superiores a los de la proteína de fusión Orencia®. Después de la dosificación SC, la media fue 879,5 +/- 281,6 h*kg*ng/l/mg con respecto a 391 h*kg*ng/l/mg para la proteína de fusión Orencia® SC, mientras que una administración IV dio un ABC promedio de 1645,5 +/- 641,1 h*kg*ng/l/mg con respecto a 728 h*kg*ng/l/mg para la proteína de fusión Orencia® IV.

25 El volumen de distribución fue similar para ambas vías de administración en las que las proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes se distribuyeron fuera del suero pero dentro del líquido extravascular como se sugiere por el valor promedio de 44,8 ml/kg, que es superior al volumen de referencia para el plasma de 30 ml/kg, y dentro del límite de referencia del líquido extracelular de 300 ml/kg para una rata convencional (Davies, B. y col., Pharm. Res. 10(7):1093-95 (1993)).

30 La biodisponibilidad también fue similar para la mayoría de las proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes, con un promedio de 0,6+/- 0,1, que se comparó favorablemente con la biodisponibilidad de 0,53 de la proteína de fusión Orencia®.

35 Finalmente, $C_{m\acute{a}x}$ fue generalmente mayor para las proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes con respecto a la proteína de fusión Orencia®. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ oscilaron de 4,5 a 9,3 ug/l para la dosificación SC y de 20,6 a 81,9 ug/l para la dosificación IV en comparación con la proteína de fusión Orencia®, que tuvo una $C_{m\acute{a}x}$ de 3,3 ó 22,3 ug/l cuando se administra por vías SC o IV, respectivamente.

40 En general, los datos PC mostraron que todas las proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes evaluadas tuvieron normalmente un perfil PC no inferior a la proteína de fusión Orencia® cuando se administran a ratas a 1 mg/kg mediante vías SC o IV, y que las porciones de Fc de IgG1 o IgG2 fueron comparables cuando el dominio funcional fue constante.

Ejemplo 12

45 Este ejemplo describe un procedimiento para crear una línea celular establemente transfectada para expresar proteínas de fusión CTLA4-Ig mutantes de la invención usando la línea celular para la producción a escala de laboratorio rutinario de la proteína de fusión CTLA4-Ig mutante, y purificar las proteínas de fusión CTLA-4-Ig mutantes de los medios de expresión de células. Aunque este ejemplo describe específicamente un procedimiento para crear una línea celular CHO-K1 establemente transfectada para expresar la proteína de fusión D3-54-IgG2

usando tal célula para la producción a escala de laboratorio y purificar la proteína de medios, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse con cualquier proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención y/o cualquier línea celular apropiada desvelada anteriormente.

Creación de línea celular establemente transfectada.

5 *Materiales.*

Células CHO-K1 sin tratamiento previo (sin transfectar): Células CHO-K1 adaptadas a crecimiento en suspensión sin suero en medio químicamente definido (ID de célula: M4-PeM-0436-112-01) se almacenaron en fase vapor de nitrógeno líquido (Dewar MVE1536P). Un vial de M4-PeM-0436-112-01 se descongeló y se cultivó con medio CD OptiCHO™ (Invitrogen, n° 12681) en matraces agitados. Los cultivos proporcionaron células para la transfección y el medio se acondicionó para el crecimiento y la clonación. Todos cultivos se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂.

Plásmido: ADN que codifica el ECD de CTLA-4 mutante de D3-54 fusionado con una región Fc de IgG2 humana se insertó en el vector CET1019AS UCOE (Millipore) y el plásmido CET1019AS-D3-54-IgG2 resultante se usó para todas las transfecciones.

Medio de cultivo celular: Se usó medio sin componente animal químicamente definido CD Opti-CHO (Invitrogen n° 12681), complementado con 2% v/v de L-glutamina 200 mM (Invitrogen n° 25031), para todos los cultivos.

Medio acondicionado: Se obtuvo medio acondicionado cultivando la línea celular CHO-K1 parental en medio CD Opti-CHO. A cifras de células $\geq 5 \times 10^5$ células/ml, el cultivo celular se centrifugó y el sobrenadante del medio acondicionado se esterilizó por filtración. El medio acondicionado se preparó fresco cada día para su uso o se guardó a 2-8°C durante hasta 7 días.

50% de medio acondicionado: Se usa el medio acondicionado (anterior) combinado con un volumen igual de medio de cultivo celular fresco; preparado fresco cada día.

Procedimientos analíticos.

La determinación de la cifra de células y la viabilidad se realizaron con un contador de células Cedex o Cedex HiRes (Innovatis).

El cribado inicial de clones que expresan la proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante (D3-54-IgG2) para la producción se realizó por ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con proteína de fusión hCD80-Ig murina durante la noche. Al día siguiente, las muestras a analizar se transfirieron a las placas de ELISA a diluciones de 50 y 200 veces por duplicado. Después de dos horas de incubación se añadió anticuerpo dirigido contra IgG humana-HRP y se incubó durante 30 minutos. Las placas se revelaron con TMB y se leyeron a 450 nm. Se informaron las densidades ópticas (DO) brutas.

La determinación cuantitativa de la concentración de proteína de fusión D3-54-IgG2 se realizó por un procedimiento de HPLC con proteína A usando una columna Poros A/20 (ABI n° 1-5024-12). Se usaron dos tampones: tampón A: ácido fosfórico 50 mM, cloruro de potasio 150 mM, pH 7,6 \pm 0,1 y tampón B: ácido fosfórico 50 mM, cloruro de potasio 150 mM, pH 2,5 \pm 0,1. Ambos tampones tuvieron adicionalmente 5% de isopropanol añadido. El equilibrio y lavado después de la inyección de la muestra fue con 42% de tampón A y 58% de tampón B (pH 6,5). La elución fue un gradiente lineal al 12% de tampón A y 88% de tampón B durante 1 minuto.

Procedimiento.

Las células CHO-K1 adherentes sin tratamiento previo usadas para la creación de líneas celulares estables usadas en la producción de GMP de la proteína de fusión D3-54-IgG2 se adaptaron al crecimiento en suspensión en medio CD OptiCHO™ químicamente definido. Un vial de estas células CHO-K1 sin tratamiento previo se descongeló y se cultivó en matraces agitados de 125 ml que contenían medio CD OptiCHO™ a una densidad de 5×10^5 células viables/ml. 2×10^6 células viables se resuspendieron en 400 μ l de 50% de medio acondicionado y se combinaron con 20 μ g de ADN de plásmido (D3-54-IgG2 en un vector CET1019AS UCEO) en una cubeta. La electroporación se realizó con un pulsador Gene Xcell (BioRad) a 320 voltios (V) con una longitud de pulso de onda cuadrada de 15 milisegundos (ms). Se realizaron transfecciones por duplicado y las células se reunieron luego. Las células reunidas se transfirieron a un matraz T-25 que contenía 5 ml de 50% de medio acondicionado y se incubaron durante dos días.

Las células transfectadas tanto se dispensaron directamente en placas de 96 pocillos para la clonación como se cultivaron con selección de antibiótico hasta que se obtuvo un conjunto estable, y luego se dispensaron en placas de 96 pocillos. Dos días después de la electroporación, el cultivo se diluyó a 1250 células/ml en medio acondicionado que contenía 8 μ g/ml de puromicina para la presión de selección. Las células se dispensaron en placas de 96 pocillos a 200 μ l por pocillo (250 células/pocillo). Las placas se incubaron durante aproximadamente 10 días para destruir las células sin transfectar y transitoriamente transfectadas. Después de 10-12 días, cada pocillo en cada placa se inspeccionó visualmente para identificar pocillos con colonias individuales. Estos pocillos se volvieron a

inspeccionar después para verificar que contenían colonias sanas individuales adecuadas para la expansión en placas de 24 pocillos.

5 Dos días después de la electroporación, el cultivo se centrifugó y se resuspendió en 50% de medio acondicionado que contenía 7 µg/ml de puromicina para la presión de selección. También se inoculó un matraz de control con células sin transfectar en el mismo medio. Basándose en estudios de optimización continuos, la concentración de puromicina aumentó a 8 µg/ml después de 3 días. El conjunto estable se generó 10-12 días después de la selección, cuando murieron todas células en el matraz de control. La expresión del producto en el conjunto estable se verificó por HPLC con proteína A y se verificó la viabilidad del cultivo que era > 95%. Las células se diluyeron seriadamente en medio acondicionado sin puromicina a una densidad final de 3,8 células/ml. Las células se sembraron sobre 10 placas de 96 pocillos a 200 µl por pocillo (75 células/placa o 0,8 células/pocillo).

Después de un día cada pocillo en cada placa se inspeccionó visualmente para identificar pocillos con células o colonias individuales. Al día siguiente se seleccionaron los pocillos con colonias individuales de 2-4 células. Se eliminó cualquier pocillo con más de dos colonias. Un segundo operario verificó las selecciones. Los pocillos se volvieron a inspeccionar después para verificar que contuvieran colonias sanas individuales adecuadas para la 15 expansión en placas de 24 pocillos

Los clones de las placas de 96 pocillos se expandieron en placas de 24 pocillos que contenían 1 ml de medio acondicionado por pocillo con 8 µg/ml de puromicina. Los contenidos enteros de los pocillos seleccionados de las placas de 96 pocillos con colonias individuales se transfirieron a pocillos individuales en las placas de 24 pocillos. Se tomaron 200 µl de cada pocillo nuevo en la placa de 24 pocillos para lavar el pocillo correspondiente en la placa de 20 96 pocillos y se transfirieron de nuevo. Para apoyo, 200 µl de medio acondicionado que contenía 8 µg/ml de puromicina se volvieron a añadir a cada pocillo en las placas de 96 pocillos.

Después de 1-3 días, cada pocillo en las placas de 24 pocillos se muestreó y se probó para la expresión de D3-54-IgG2 por ELISA. Se seleccionaron clones para la expansión adicional basándose en los valores de DO para ELISA brutos, además de la demostración de crecimiento adecuado.

25 Los 35-40 clones superiores, basándose en ELISA y resultados de crecimiento observables, se expandieron en matraces T-25 que contenían 5 ml de medio acondicionado con 8 µg/ml de puromicina. Los contenidos enteros de cada uno de los pocillos seleccionados de las placas de 24 pocillos se transfirieron a matraces T-25 individuales. Las células residuales en los pocillos se lavaron con el mismo medio y se añadieron al matraz T-25 correspondiente. Para apoyo, 1 ml de medio acondicionado que contenía 8 µg/ml de puromicina se volvió a añadir a cada pocillo en 30 las placas de 24 pocillos.

El número de clones se redujo adicionalmente seleccionando clones con la mayor productividad. Las células se resuspendieron en medio fresco a $1-2 \times 10^5$ células viables/ml y se sembraron en matraces de T25 (5 ml cultivo) o matraces agitados de 125 ml (12 ml de cultivo). Los cultivos se incubaron durante 22-24 horas y luego se hizo una determinación de la densidad de células y viabilidad final y se tomó una muestra para la determinación de la 35 concentración de producto por HPLC con proteína A. La productividad se calculó dividiendo la cantidad total de proteína producida por el número total de células viables en el matraz y dividiendo entre la duración del cultivo. Las unidades se convirtieron en picogramos por célula por día o "pcd". Los clones se clasificaron según sus valores de pcd, pero se omitieron los clones que no presentaron crecimiento significativo. Los clones superiores se expandieron en matraces con agitación de 125 ml para la criopreservación y posterior evaluación del crecimiento y productividad.

40 Los clones que iban a evaluarse adicionalmente se sembraron en matraces con agitación de 250 ml a 1×10^5 células viables/ml en 50 ml de medio fresco. Cuando la densidad de células alcanzó 1×10^6 células viables/ml, el cultivo se pasó a un nuevo matraz con agitación, de nuevo a 1×10^5 células viables/ml en 50 ml de medio fresco. El pase se repitió una vez más. Durante este tercer pase, el cultivo se muestreó diariamente para la determinación de la cifra de células, viabilidad y concentración de producto por HPLC con proteína A.

45 Los clones superiores que expresan la proteína de fusión D3-54-IgG2 basándose en el crecimiento y velocidades de producción específicas se seleccionaron para la subclonación. La subclonación se realizó por dilución limitante como se describe en la sección anterior para conjuntos estables, con la excepción de que no se usó puromicina en ningún momento. La expansión, cribado y evaluación de subclones también se realizaron como se ha descrito anteriormente.

50 Los subclones seleccionados se sometieron a pases repetidos en matraces con agitación durante aproximadamente 90 días para evaluar la estabilidad de la producción. En cada pase, las células se sembraron en matraces con agitación de 125 ml a 1×10^5 células viables/ml en 25 ml de medio fresco. Los cultivos se sometieron a pases cada 3-4 días. Antes de cada pase se midieron la densidad de células y la viabilidad y se tomó una muestra para la determinación de la concentración de producto por HPLC con proteína A.

55 Los clones y subclones seleccionados se criopreservaron desde el momento de la clasificación por valores de pcd en diversos momentos en la evaluación de la estabilidad. El medio de congelación se preparó nuevo con 90% de medio de crecimiento y 10% de DMSO (Sigma). Las células de los cultivos del matraz con agitación se centrifugaron y se resuspendieron en medio de congelación a densidades que oscilan de $2 - 10 \times 10^6$ células/ml. La suspensión de

células se dispensó en alícuotas de 1 ml en viales criogénicos. Los viales criogénicos se dispusieron en un recipiente de congelación con isopropanol y se guardaron a -80°C durante la noche. Los viales congelados se transfirieron a almacenamiento en fase vapor de nitrógeno líquido al día siguiente.

Producción de proteínas de fusión CTLA4-IgG2 mutantes.

- 5 Un criovial que contenía 1 ml de volumen de células CHO-K1 que expresan la proteína de fusión D3-54-IgG2 se descongela y se cultiva en matraces con agitación de 125 ml que contenían medio CD OptiCHO™ a 37°C y 5% de CO₂ a una densidad de 5 x 10⁵ células viables/ml. Se combinan varios matraces para inocular una bolsa ondulada a 1-2 x 10⁵ células/ml en un volumen de 5 ó 10 l de medio CD OptiCHO™ con glutamina 4 mM. El cultivo de la bolsa ondulada se mantiene en una estufa de incubación a 37°C complementado con 5% de CO₂ en un entorno de plataforma de balanceo de 18-22 rpm y ángulo de 8 grados para equipo comprado de Sartorius Stedim Biotech. El cultivo se muestra diariamente para cifra de células, viabilidad, nivel de nutrientes, perfil de metabolitos y nivel de expresión de la CTLA-4-IgG2 mutante (es decir, D3-54-IgG2) usando un ensayo de HPLC con proteína A. El cultivo se recoge cuando la viabilidad disminuye a ~50%, normalmente 9-11 días después de la inoculación. El material de cultivo celular se clarifica por filtración usando una combinación de filtración profunda y filtración estéril y se usa tanto inmediatamente para el procesamiento adicional como se guarda a 2-8 °C.

Purificación de proteínas de fusión CTLA-4-IgG2 mutantes.

- 20 Las proteínas de fusión CTLA4-IgG2 mutantes (D3-54-IgG2) se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A usando un sistema de HPLC AKTA Explorer (GE Healthcare). Una proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante (D3-54-IgG2) se unió a columnas de proteína A FF MabSelect (GE Healthcare, nº 17-5079-01) en tampón PBS (Invitrogen), se cargó a ~10 mg/ml de medio de cromatografía, se lavó con el mismo tampón, se eluyó con tampón ácido cítrico 100 mM (pH 4,0) y luego se neutralizó mediante la adición de 1/10 de volumen de base Tris 2 M. La muestra purificada de proteína A se procesa adicionalmente por diafiltración usando un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) con un intercambio de tampón en Tris-Cl 20 mM, pH 7,5.

- 25 La muestra de proteína intercambiada por tampón se purifica adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico sobre una columna Q-Sepharose cargada a ~10 mg/ml de densidad de carga. La proteína unida se eluye usando un gradiente de NaCl lineal de 20 volúmenes de columna (VC) de NaCl 0-500 mM en Tris-Cl 20 mM, pH 7,5. Las principales fracciones de pico se reúnen y la concentración se determina midiendo la absorbancia a 280 nm.

- 30 La pureza de proteínas se confirma por análisis de SDS-PAGE y el contenido de monómero se determina usando un procedimiento de HPLC de exclusión por tamaño. Las muestras se almacenan en alícuotas a 2-8°C o a -20°C durante periodos prolongados antes de uso.

- 35 Aunque la anterior invención se ha descrito con algún detalle a objeto de claridad y entendimiento, será evidente para un experto en la materia a partir de una lectura de la presente divulgación que pueden hacerse diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del alcance verdadero de la invención. Se entiende que los materiales, ejemplos y realizaciones en el presente documento sólo se describen para fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes y que diversas modificaciones o cambios a la luz de la misma serán sugeridos por expertos en la materia.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Maxygen, Inc.
Karrer, Erik E.
Paidhungat, Madan M.
Bass, Steven H.
Neighbors, Margaret
Punnonen, Juha
Chapin, Steven J.
45 Viswanathan, Sridhar
Larsen, Brent R.

<120> POLIPÉPTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS INMUNOSUPRESORES

- 50 <130> 0364.210WO

<150> US 60/984.631
<151> 01-11-2007

- 55 <150> US 61/051.215
<151> 07-05-2008

<160> 228

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Mutante de ECD de CTLA-4 D3-1

10

<400> 1

```

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

15

<210> 2
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> D3-2 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 2

```

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

25

<210> 3
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>

ES 2 399 088 T3

<223> D3-3 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 3

```

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

```

5

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> D3-4 mutante del ECD de CTLA-4

15

<400> 4

```

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

```

20

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> D3-5 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 5

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-6 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 6

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Met Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85          90          95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

15 <210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-7 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 7

ES 2 399 088 T3

```

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

```

<210> 8
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> D3-8 mutante del ECD de CTLA-4

10

<400> 8

```

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

```

<210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> D3-9 mutante del ECD de CTLA-4

20

<400> 9

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 10
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-11 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 10

```

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

```

15 <210> 11
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-12 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 11

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 12
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-14 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 12

```

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

```

15 <210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-15 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 13

ES 2 399 088 T3

```

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

Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

5 <210> 14
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-16 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 14

```

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

```

15 <210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-17 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 15


```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1      5      10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
      20      25      30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
      35      40      45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
      50      55      60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
      65      70      75      80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
      85      90      95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

```

```

              100              105              110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
      115              120

```

- 5 <210> 16
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> D3-19 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 16

```

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

```

- 15 <210> 17
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> D3-20 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 17

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 18
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-21 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 18

```

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

```

15 <210> 19
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-22 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 19

```

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

```

5 <210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-23 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 20

```

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

```

15 <210> 21
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-24 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 21

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 22
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-25 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 22

```

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

```

15 <210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-26 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 23

```

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

```

5 <210> 24
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-27 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 24

```

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

      Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

15 <210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-28 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 25

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 26
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-29 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 26

```

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

```

15 <210> 27
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-30 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 27

```

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

```

- <210> 28
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> D3-31 mutante del ECD de CTLA-4

- <400> 28

```

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

```

- <210> 29
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> D3-32 mutante del ECD de CTLA-4

- <400> 29

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

```

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

<210> 30
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> D3-33 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 30

```

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

<210> 31
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> D3-34 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 31

ES 2 399 088 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60

Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

5 <210> 32
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-39 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 32

```

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

```

15 <210> 33
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-50 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 33

ES 2 399 088 T3

```

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

```

115

120

5
<210> 34
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> D3-52 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 34

```

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

```

15
<210> 35
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> D3-53 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 35

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 36
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-54 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 36

```

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

```

15 <210> 37
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-55 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 37

```

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

```

5
<210> 38
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> D3-56 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 38

```

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

```

15
<210> 39
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> D3-57 mutante del ECD de CTLA-4

25
<400> 39

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 40
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-58 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 40

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
          20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
          35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
          85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
          100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

15 <210> 41
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-59 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 41

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 42
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-60 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 42

```

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

```

15 <210> 43
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-61 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 43

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 44
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-62 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 44

```

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

```

15 <210> 45
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-63 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 45

```

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

```

5 <210> 46
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-64 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 46

```

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

```

15 <210> 47
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-65 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 47

ES 2 399 088 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val

          20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
          85          90          95
Met Tyr Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
          100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

5 <210> 48
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-66 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 48

```

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

```

15 <210> 49
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-68 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 49

ES 2 399 088 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
          20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
          35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
          50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65          70          75          80

Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
          85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
          100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

- 5 <210> 50
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> D3-69 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 50

```

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

```

- 15 <210> 51
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> D3-70 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 51

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 52
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-71 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 52

```

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

```

15 <210> 53
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-72 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 53

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5
 <210> 54
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> D3-73 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 54

```

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

```

15
 <210> 55
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> D3-74 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 55

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5
<210> 56
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> D3-75 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 56

```

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

```

15
<210> 57
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> D3-76 mutante del ECD de CTLA-4

25
<400> 57

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 58
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D1 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 58

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Thr Glu Ile
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asn Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Phe Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

          85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

15 <210> 59
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D1T mutante del ECD de CTLA-4

<400> 59

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 60
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D2 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 60

```

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

```

15 <210> 61
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 61

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5
 <210> 62
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> D4 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 62

```

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

```

15
 <210> 63
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> D5 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 63

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 64
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D6 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 64

```

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

```

15 <210> 65
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D20 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 65

ES 2 399 088 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1      5      10      15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro His Lys Ala Thr Glu Ile
      20      25      30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

          35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Met Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
      50          55          60
Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
      65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
          85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
          100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

- 5 <210> 66
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> D21 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 66

```

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

```

- 15 <210> 67
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> D23 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 67

ES 2 399 088 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ser Ala Pro His Asn Ala Ala Glu Ile
          20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
          35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Glu Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
          85          90          95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Gln Ile
          100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

- 5 <210> 68
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> D24 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 68

```

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

```

- 15 <210> 69
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> D26 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 69

```

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

```

5
<210> 70
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> D27 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 70

```

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

```

15
<210> 71
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> D28 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 71

ES 2 399 088 T3

```

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

```

5 <210> 72
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D29 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 72

```

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

```

15 <210> 73
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D31 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 73

ES 2 399 088 T3

```

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

```

<210> 74

<211> 352

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión D3-12-IgG2 (con lisina del extremo C)

<400> 74

5

10

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1      5      10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35      40      45

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

```

<210> 75
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-14-IgG2 (con lisina del extremo C)

10

<400> 75

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1      5      10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20      25      30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35      40      45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50      55      60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65      70      75
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85      90      95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100      105      110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
 115      120      125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 130      135      140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 145      150      155
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 165      170      175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 180      185      190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 195      200      205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 210      215      220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 225      230      235
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305      310      315
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340      345      350

```

<210> 76
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-17-IgG2 (con lisina del extremo C)

10

<400> 76

ES 2 399 088 T3

```

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      145      150      155      160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
      165      170      175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      180      185      190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
      195      200      205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      210      215      220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
      225      230      235      240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
      245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
      290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      340      345      350

```

<210> 77
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-20-IgG2 (con lisina del extremo C)

10

<400> 77

ES 2 399 088 T3

```

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

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

```

<210> 78
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-27-IgG2 (con lisina del extremo C)

<400> 78

5

10

ES 2 399 088 T3

```

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

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 245     250     255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260     265     270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275     280     285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290     295     300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305     310     315
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325     330     335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340     345     350

```

<210> 79

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión D3-29-IgG2 (con lisina del extremo C)

10

<400> 79

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290 295 300
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305 310 315 320
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325 330 335
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345 350

<210> 80
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-1 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 80

5

10

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccgag caaagccaac gaaattagag tcacagtgcg cgcgcaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 81
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-2 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 81

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccgag caaagccaac gaaattagag tcacagtgcg cgcgcaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 82
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-3 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 82

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccgag caaagccaac gaagttagag tcacagtgcg cgcgcaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 83
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-4 mutante del ECD de CTLA-4

35 <400> 83

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccgag caaagccaac gaaattagag tcacagtgcg cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

ES 2 399 088 T3

<210> 84
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-5 mutante del ECD de CTLA-4

10

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctgcg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15

<210> 85
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-6 mutante del ECD de CTLA-4

25

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga tgggagatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30

<210> 86
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-7 mutante del ECD de CTLA-4

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

40

<210> 87
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-8 mutante del ECD de CTLA-4

ES 2 399 088 T3

<400> 87

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatt ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 88
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-9 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 88

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatt ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 89
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-11 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 89

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatt ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 90
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-12 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 90

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcategatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 91
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-14 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 91

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcategatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 92
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Mutante del ECD de CTLA-4

<400> 92

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcategatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 93
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-16 mutante del ECD de CTLA-4

35 <400> 93

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcgcaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240

```

```

ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 94
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-17 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 94

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 95
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-19 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 95

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cgcggtatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 96
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-20 mutante del ECD de CTLA-4
 35 <400> 96

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcceaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5
<210> 97
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Secuencia codificante de D3-21 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 97

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcceaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15
<210> 98
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Secuencia codificante de D3-22 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 98

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcceaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25
<210> 99
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Secuencia codificante de D3-23 mutante del ECD de CTLA-4

35
<400> 99

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcceaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

ES 2 399 088 T3

5
 <210> 100
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-24 mutante del ECD de CTLA-4

10
 <400> 100

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

15
 <210> 101
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-25 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 101

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

25
 <210> 102
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-26 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 102

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

35
 <210> 103
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-27 mutante del ECD de CTLA-4

45
 <400> 103

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatecc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5
 <210> 104
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-28 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 104

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
ctcgacgac ccactctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatecc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15
 <210> 105
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-29 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 105

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatecc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30
 <210> 106
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-30 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 106

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 107
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-31 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 107

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 108
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-32 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 108

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 109
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-33 mutante del ECD de CTLA-4

35 <400> 109

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcategatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

- 5 <210> 110
- <211> 372
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia codificante de D3-34 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 110

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccccg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcategatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

- 15 <210> 111
- <211> 372
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia codificante de D3-39 mutante del ECD de CTLA-4
- <400> 111

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcategatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

- 25 <210> 112
- <211> 372
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Secuencia codificante de D3-50 mutante del ECD de CTLA-4
- 35 <400> 112

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgac ccactctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 113
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-52 mutante del ECD de CTLA-4

10

<400> 113

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccactctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15

<210> 114
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-53 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 114

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccggg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggataggg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25

<210> 115
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-54 mutante del ECD de CTLA-4

35

<400> 115

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccactctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

ES 2 399 088 T3

5 <210> 116
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-55 mutante del ECD de CTLA-4

10 <400> 116

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccatctgcac aggtaccttt tccggaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 117
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-56 mutante del ECD de CTLA-4

20 <400> 117

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 118
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-57 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 118

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgata ccatctgcac aggtaccttt tccggaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360

```

35 **cctgattctg at 372**

40 <210> 119
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 399 088 T3

<223> Secuencia codificante de D3-58 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 119

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5

<210> 120

<211> 372

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante de D3-59 mutante del ECD de CTLA-4

15

<400> 120

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccggg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

20

<210> 121

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Secuencia codificante de D3-60 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 121

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30

<210> 122

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia codificante de D3-61 mutante del ECD de CTLA-4

40

<400> 122

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgtc cgcceaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgtatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5
<210> 123
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Secuencia codificante de D3-62 mutante del ECD de CTLA-4
<400> 123

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgtc cgcceaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgtatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15
<210> 124
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Secuencia codificante de D3-63 mutante del ECD de CTLA-4
<400> 124

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgtc cgcceaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgtatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25
<210> 125
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Secuencia codificante de D3-64 mutante del ECD de CTLA-4
35
<400> 125

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgtc cgcceaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgtatg acatacatga tggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

ES 2 399 088 T3

5
 <210> 126
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-65 mutante del ECD de CTLA-4

10
 <400> 126

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccgga caaagccaac gaagttagag tcacagtgcg cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

15
 <210> 127
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-66 mutante del ECD de CTLA-4

20
 <400> 127

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccgga caaagccaac gaagttagag tcacagtgcg cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

25
 <210> 128
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-68 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 128

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccgga caaagccaac gaaattagag tcacagtgcg cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgctgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

35
 <210> 129
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-69 mutante del ECD de CTLA-4

40
 <400> 129

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
 tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcceaagcc 120

gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
 cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

<210> 130
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-70 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 130

10

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
 tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaagttagag tcacagtgc cgcceaagcc 120
 gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
 cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

<210> 131
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-71 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 131

20

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
 tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcceaagcc 120
 gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
 cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

25

<210> 132
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-72 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 132

35

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
 tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcceaagcc 120
 gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
 cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

ES 2 399 088 T3

5
 <210> 133
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-73 mutante del ECD de CTLA-4

10
 <400> 133

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccactctgac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

15
 <210> 134
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3-74 mutante del ECD de CTLA-4

20
 <400> 134

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccactctgac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

25
 <210> 135
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-75 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 135

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

35
 <210> 136
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Secuencia codificante de D3-76 mutante del ECD de CTLA-4

ES 2 399 088 T3

<400> 136

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgata ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300

ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 137
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D1 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 137

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccacc gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgata ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 138
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D1T mutante del ECD de CTLA-4

25 <400> 138

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgata ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30 <210> 139
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D2 mutante del ECD de CTLA-4

35 <400> 139

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgac ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtatcccccc 300
ccttactacc tgggtatggg taatggcact cagatctacg tcacgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 140
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de D3 mutante del ECD de CTLA-4

10

<400> 140

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtatcccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcacgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15

<210> 141
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia codificante de D4 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 141

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatata gctcaccgg gaaagccgac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
tctagtcaag tcacagaagt ctgcgctatg acatacatgg agggagatga actaaccttc 180
cttgacgacc ccacctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgtcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtatcccccc 300
ccttactacc tgggtttcgg taatggcact cagatctacg tcacgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25

<210> 142
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Secuencia codificante de D5 mutante del ECD de CTLA-4

35

<400> 142

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg catccccgg aaaagccact gaagttagag tcacagtctt ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatataatga tgggcgacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtatcccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

ES 2 399 088 T3

5
 <210> 143
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D6 mutante del ECD de CTLA-4

10
 <400> 143

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg catcccccg aaagccact gaaattagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tgggcgacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

15
 <210> 144
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D20 mutante del ECD de CTLA-4

20
 <400> 144

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtccccca caaagccact gaaattagag tcacagtgc cgcaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcactgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

25
 <210> 145
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D21 mutante del ECD de CTLA-4

30
 <400> 145

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgctcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatt ccgccccca caacgcgac gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
tcttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg aagaagatga actcaccttc 180
ctcgacgacc ccacctgac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc tgggttcg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

35
 <210> 146
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de D23 mutante del ECD de CTLA-4

ES 2 399 088 T3

<400> 146

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatt cgcgccccca caacgcgcgc gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

5 <210> 147
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D24 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 147

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60

tgtgaatatt agtcaccccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgc cgcgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

15 <210> 148
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia codificante de D26 mutante del ECD de CTLA-4

25 <400> 148

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatt aggccccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgcgaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

30 <210> 149
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia codificante de D27 mutante del ECD de CTLA-4

<400> 149

ES 2 399 088 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgctctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 150
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de D28 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 150

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agggccccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggatcacaag taacagaagt ctgctctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 151
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia codificante de D29 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 151

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agggccccca caaagccgat gaaattagag tcacagtcct ccgccaagct 120
gattcacaag taacagaagt ctgctctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 152
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia codificante de D31 mutante del ECD de CTLA-4
 <400> 152

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agggccccca caacgccgat gaaatcagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgctctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacaagt caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 153
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-12-IgG2

<400> 153

10

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cggagtgcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgcggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatgat ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa
    
```

<210> 154
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-14-IgG2

<400> 154

20

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgcggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatgat ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa
    
```

<210> 155
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-17-IgG2

<400> 155

10

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgactc ttctctttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg ctctctcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctgt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170
    
```

<210> 156
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-20-IgG2

<400> 156

20

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgactc ttctctttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg ctctctcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctgt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170
    
```

<210> 157
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-27-IgG2

<400> 157

10

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgat ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa . 1170
    
```

<210> 158
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-29-IgG2

<400> 158

20

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgat ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170
    
```

ES 2 399 088 T3

<210> 159
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> ECD de CTLA-4 humano natural

10

<400> 159

```

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

<210> 160
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

15

<220>
 <223> CTLA-4 de longitud complete humano natural

20

<400> 160

ES 2 399 088 T3

```

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

```

<210> 161
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión CTLA4 humano WT-IgG2T predicha

<400> 161

5

10

```

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

145      150      155      160
Asp Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 165     170     175
Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 180     185     190
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 195     200     205
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 210     215     220
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 225     230     235
Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
 245     250     255
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
 260     265     270
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 275     280     285
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 290     295     300
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 305     310     315
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 325     330     335
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 340     345     350
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 355     360     365
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 370     375     380
Leu Ser Pro Gly Lys
385

```

<210> 162
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión CTLA4 humano WT-IgG2 madura

5

10

<400> 162

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

145 150 155 160
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 165 170 175
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 180 185 190
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 195 200 205
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 210 215 220
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 225 230 235 240
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 245 250 255
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260 265 270
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275 280 285
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290 295 300
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305 310 315 320
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325 330 335
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345 350

5 <210> 163
 <211> 1167
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión CTLA4 humano WT-IgG2 humana

<400> 163

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gtcactca atctcgtac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt ttgtgaatat 180
gcatcccccg gaaaagccac tgaagttaga gtcacagtcc tccgccaggc tgattcacia 240
gtaacagaag tctgcgctgc aacatataat atgggcaacg aactcacott cctcgacgac 300
tcaatttgca caggtacctc ctccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcca 360
gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
cttggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgcaca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tetccccccc aaaaccacaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctgt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgac ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccattgctg 1020
gactccgacg gtcctctctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg 1140
aagagcctct ccctgtctcc ggtgtaa 1167

```

<210> 164
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Orenicia(R) (Bristol-Myers Squibb Co.)

<400> 164

```

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

```

<210> 165
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión LEA29Y-Ig predicha

10

<400> 165

```

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

```

<210> 166
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión LEA29Y-Ig madura

<400> 166

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

<210> 167
<211> 1182
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia codificante de la proteína de fusión LEA29Y-Ig

10

<400> 167

ES 2 399 088 T3

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
 ccttgtactc ttctcttttt tctctctctc atcccagttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
 gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt ttgtgaatat 180

gcatcccccg gaaaatatac tgaagttaga gtcacagtc tccgccaggc tgattcacia 240
 gtaacagaag tctgcgctgc aacatatatg atgggcaacg aactcacctt cctcgacgac 300
 tcaatttgca caggtacctc ctccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
 gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
 gagggatag gtaatggcac tcagatctac gtcattgacc ccgaaccctg ccctgattct 480
 gatcaggagc ccaaattctc tgacaaaact cacacatccc caccgtcccc agcacctgaa 540
 ctctgggtg gatcgtcagt cttctctctc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 600
 tcccggacc ctgaggtcac atgctgggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 660
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 720
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 780
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 840
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 900
 tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat 960
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1020
 acgctcccg tgctggactc cgacggctcc ttctctctc acagcaagct caccgtggac 1080
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1140
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1182

<210> 168
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de LEA29Y

<400> 168

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

<210> 169
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante del ECD de LEA29Y

<400> 169

ES 2 399 088 T3

```
atgcacgtcg ctcaaccage cgtegtactc ggcgcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg catcccccg aaatataact gaagttagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatataatga tgggcaacga actcaccttc 180
ctcgacgact caatttgac aggtacctcc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg aggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
```

- 5 <210> 170
- <211> 476
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Proteína de fusión de CD80 humano-IgG1 humana predicha

- <400> 170

Met	Gly	His	Thr	Arg	Arg	Gln	Gly	Thr	Ser	Pro	Ser	Lys	Cys	Pro	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Asn	Phe	Phe	Gln	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	His	Phe	Cys
			20					25					30		
Ser	Gly	Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu
		35					40					45			
Ser	Cys	Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile
	50					55					60				
Tyr	Trp	Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp
65					70					75					80
Met	Asn	Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr
				85					90					95	
Asn	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly
			100					105					110		
Thr	Tyr	Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg
		115					120					125			
Glu	His	Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr
	130					135					140				
Pro	Ser	Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile
145				150						155					160
Ile	Cys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu
				165					170						175
Glu	Asn	Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp
			180					185					190		
Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met
		195				200						205			
Thr	Thr	Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg
	210					215						220			
Val	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro
225					230					235					240
Asp	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
				245					250					255	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
			260					265					270		
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
		275					280					285			
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
	290				295						300				
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
305					310					315					320
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
				325					330					335	
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
			340					345					350		
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
		355					360					365			
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
	370					375					380				
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
385					390						395				400
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
				405						410					415
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
			420						425				430		
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
			435				440					445			
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
	450					455					460				
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
465					470						475				

<210> 171
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de CD80 humano WT-IgG1 humana madura

<400> 171

10

```

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

					325					330					335
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
				340				345					350		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
		355					360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		370				375					380				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385					390				395						400
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				405				410						415	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			420					425					430		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
		435					440								

<210> 172
 <211> 1428
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión CD80 humano WT-IgG1 humana

10

<400> 172

```

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtggtatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatacactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcggaacac ctggetgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgtcaa cctctggagg ttttctgag cctcacctct cctggetgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagat 660
ggacatttaa gactgaatca gaccttcaac tggaatataa cgaagcaaga gcattttctt 720
gataacgggg tgaccccaaa gagctgcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 780
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccxaa ggacaccctc 840
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggg acgtgagcca cgaagaccct 900
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 960
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag 1020
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggctcca acaaagccct cccagcccc 1080
atcgagaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1140
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc 1200
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1260
aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc 1320
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaa 1428
    
```

<210> 173
 <211> 726
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia codificante del péptido señal de CD80 humano WT y ECD de CD80 humano WT

<400> 173

atgggccaca cacggaggca gggaaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60

cagctcttgg tgetggctgg tctttctcac ttctgttcag gtggtatcca cgtgaccaag 120
 gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
 caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
 atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
 atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
 tatgaaaaag acgctttcaa gcggaacac ctggctgaag tgacgttata agtcaaagct 420
 gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
 atttgctcaa cctctggagg ttttctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
 gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
 ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa cgaagcaaga gcattttcct 720
 gataac 726

<210> 174
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5

<220>
 <223> ECD de CD80 humano WT

10

<400> 174

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

<210> 175
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

15

<220>
 <223> CD86 humano WT de longitud completa previsto

20

ES 2 399 088 T3

<400> 175

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

5 <210> 176
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia codificante de CD86 humano WT de longitud completa

<400> 176

ES 2 399 088 T3

```

atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatgga cttcctgctc 60
tctggtgctg ctctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcaccc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcctg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600

```

```

atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatggt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780
atggttttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840
aaatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900
atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtggtt taaaagttc gaagacatct 960
tcatgcgaca aaagtgatag atgtttt 987

```

<210> 177

<211> 477

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión CD86 humano WT-IgG1 humana predicha

10

<400> 177

Met Asp Pro Gln Cys Thr Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe
20 25 30
Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln
35 40 45
Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val
50 55 60
Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser
65 70 75 80
Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
85 90 95
Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
100 105 110
His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
115 120 125
Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
130 135 140
Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
145 150 155 160
His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
165 170 175
Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
180 185 190
Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
195 200 205
Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
210 215 220
Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225 230 235 240
Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
245 250 255
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
260 265 270
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
275 280 285
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
290 295 300
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305 310 315 320
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
325 330 335
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
340 345 350
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
355 360 365
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
370 375 380
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385 390 395 400
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
405 410 415
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
435 440 445
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
450 455 460
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

ES 2 399 088 T3

<210> 178
<211> 454
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Proteína de fusión CD86 humano WT-IgG1 humana madura

10

<400> 178

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

 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

ES 2 399 088 T3

<211> 1431
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión CD86 humano WT-IgG1 humana

<400> 179

```

atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttectgctc 60
tctgggtgctg ctccctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcaccc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcctg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttetaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt cctgatggtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggacctcag 720
cctccccag gggtgacccc aaagagctgc gacaaaactc acacatgcc accgtgccca 780
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 840
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 900
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 960
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1020
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1080
cccacgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1140
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 1200
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1260
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctca cagcaagctc 1320
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1380
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1431
    
```

10

<210> 180
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

15

<220>
 <223> ECD de CD86 humano WT

20

<400> 180

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

<210> 181
 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante del péptido señal de CTLA-4 humano WT

<400> 181

atggcttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
 ccttgtactc tctctttttt tctcctcttc ataccggttt tttgt 105

<210> 182
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223> Péptido señal de CTLA-4 humano WT

<400> 182

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1 5 10 15
 Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30
 Val Phe Cys
 35

<210> 183
 <211> 684

ES 2 399 088 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia codificante del polipéptido de Fc de IgG2 humana (con lisina del extremo C)

<400> 183

```

gagcgc.aaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 60
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac cctgaggtc 120
acgtgcgtgg tgg.tggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacia aggcctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaaacc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggttct accccagcga categccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 540
tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684
    
```

10 <210> 184
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

15 <220>
 <223> Polipéptido de Fc de IgG2 humana (con lisina del extremo C)

20 <400> 184

ES 2 399 088 T3

```

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195     200     205
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210     215     220
Ser Pro Gly Lys
 225

```

<210> 185
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5

<220>
 <223> Polipéptido de Fc de IgG1 humana

10

<400> 185

ES 2 399 088 T3

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

<210> 186
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido de Fc de IgG1 mutante

10

<400> 186

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

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

<210> 187
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador

10

<400> 187
 ctattgctac ggccgctatg gccmtkacg tcgctcaacc agccgctgta ctgcgctcc 59

15

<210> 188
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> cebador

<400> 188
 gtgatggtga tgggtgctgg ccgcatcaga 30

25

<210> 189
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> cebador

<400> 189

aagctgtcac cggatgatcg atcccgaacc ctgccctgat tctgatgagc gcaaattgtt 60

tgtcagatgc ccaccgt

77

5 <210> 190
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 190
 cagaattcat tattaccg gagacagga gaggctctc tg 42

15 <210> 191
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 191
 ggaataccg tttttgtaa agccatgcac gtcgctcaac cagccgtcgt actc 54

25 <210> 192
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 192
 ggcactcaga tctacgtcat cgatcccga 30

35 <210> 193
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia codificante de ECD de CTLA-4 humano

45 <400> 193

atgcacgtgg cccagcctgc tgtggtactg gccagcagcc gaggcacgc cagctttgtg 60
 tgtgagtatg catctccagg caaagccact gaggtccggg tgacagtgct tcggcaggct 120
 gacagccagg tgactgaagt ctgtgcggca acctacatga tggggaatga gttgacctc 180
 ctagatgatt ccatctgcac gggcacctcc agtggaaatc aagtgaacct cactatccaa 240
 ggactgaggg ccatggacac gggactctac atctgcaagg tggagctcat gtaccaccg 300
 ccatactacc tgggcatagg caacggaacc cagatttatg taattgatcc agaaccgtgc 360
 ccagattctg ac 372

50 <210> 194
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de CTLA-4 humano de longitud completa

<400> 194

```

atggcttgcc ttggatttca ggggcacaag gctcagctga acctggctac caggacctgg 60
ccctgcactc tcctgttttt tcttctcttc atccctgtct tctgcaaagc aatgcacgtg 120
gcccagcctg ctgtgttact ggccagcagc cgaggcatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180
gcatctccag gcaaagccac tgagggtccgg gtgacagtgc ttcggcaggc tgacagccag 240
gtgactgaag tctgtgcggc aacctacatg atggggaatg agttgacctt cctagatgat 300
tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcaactatcca aggactgagg 360
gccatggaca cgggactcta catctgcaag gtggagctca tgtaccacc gccatactac 420
ctgggcatag gcaacggaac ccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480
gacttcctcc tctggatcct tgcagcagtt agttcggggg tgttttttta tagctttctc 540
ctcacagctg tttctttgag caaaatgcta aagaaaagaa gccctcttac aacaggggtc 600
tatgtgaaaa tgcccccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttattttatt 660
cccatcaatt ga 672
    
```

5 <210> 195
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <220>
 <223> CD80 humano de longitud completa previsto

<400> 195

```

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

15

ES 2 399 088 T3

<210> 196
 <211> 867
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de CD80 humano de longitud completa

10

<400> 196

```

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtggtatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccagagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttata agtcaaagct 420
gacttcctca cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atgtgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gacottcaac tggaatataa ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacctgc tccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780
tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
agaagggaaa gtgtacgccc tgtataaa                                     867
    
```

<210> 197
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-54-IgG2 (con lisina del extremo C)

20

<400> 197

ES 2 399 088 T3

```

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 225      230      235      240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340      345      350

```

5 <210> 198
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión D3-56-IgG2 (con lisina del extremo C)

<400> 198

ES 2 399 088 T3

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

<210> 199
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-69-IgG2 (con lisina del extremo C)

10

<400> 199

```

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      340      345      350

```

<210> 200
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-75-IgG2 (con lisina del extremo C)

<400> 200

5

10

```

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

```

<210> 201
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-54-IgG2

<400> 201

5

10

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc ctctcttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcaccgc gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccacttgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttoga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccattgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

```

<210> 202
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-56-IgG2

10

<400> 202

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc ctctcttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcaccgc gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccacttgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttoga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccattgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

```

<210> 203
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-69-IgG2

<400> 203

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggttgtg cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

```

<210> 204
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-75-IgG2

10

<400> 204

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggttgtg cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc cccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

```

<210> 205
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-12-IgG2 (sin lisina del extremo C)

<400> 205

ES 2 399 088 T3

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

<210> 206
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-14-IgG2 (sin lisina del extremo C)

10

<400> 206


```

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

```

<210> 207
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-17-IgG2 (sin lisina del extremo C)

10

<400> 207

```

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

```

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

<210> 208
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-20-IgG2 (sin lisina del extremo C)

10

<400> 208

ES 2 399 088 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1      5      10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
      20      25      30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
      35      40      45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
      50      55      60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
      65      70      75      80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

      85      90      95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
      100      105      110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
      115      120      125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
      130      135      140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      145      150      155      160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
      165      170      175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      180      185      190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
      195      200      205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      210      215      220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
      225      230      235      240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
      245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
      290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      340      345      350

```

<210> 209
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-27-IgG2 (sin lisina del extremo C)

10

<400> 209

```

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

      130      135      140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
145      150      155      160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165      170      175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
180      185      190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195      200      205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
210      215      220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225      230      235      240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340      345      350

```

<210> 210
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-29-IgG2 (sin lisina del extremo C)

10

<400> 210

```

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

180      185      190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195      200      205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
210      215      220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225      230      235      240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340      345      350

```

<210> 211
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-54-IgG2 (sin lisina del extremo C)

<400> 211

5

10

```

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

225      230      235      240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 340      345      350

```

<210> 212
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-56-IgG2 (sin lisina del extremo C)

<400> 212

```

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

```

<210> 213
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-69-IgG2 (sin lisina del extremo C)

<400> 213

5

10

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

<210> 214
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-75-IgG2 (sin lisina del extremo C)

<400> 214

5

10

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

<210> 215
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la secuencia del péptido señal de hCTLA-4 WT que comprende los residuos de aminoácidos 1-37 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa

10

<400> 215

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
 ccttgtaactc ttctcttttt tctctcttctc ataccgggttt tttgtaaagc c 111

15

<210> 216

<211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> Secuencia del péptido señal de hCTLA-4 WT que comprende los residuos de aminoácidos 1-37 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa

10 <400> 216

Met	Ala	Cys	Leu	Gly	Phe	Gln	Arg	His	Lys	Ala	Gln	Leu	Asn	Leu	Ala
1				5					10					15	
Thr	Arg	Thr	Trp	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu	Phe	Ile	Pro
			20				25						30		
Val	Phe	Cys	Lys	Ala											
		35													

15 <210> 217
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia codificante del polipéptido del Fc de IgG2 humana
 <400> 217

gagcgc	caaat	gttgtgtcga	gtgccc	accg	tgccc	cagcac	cacctgtg	ggc	aggacc	gtca	60
gtcttctct	tcccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctccc	ggac	ccctgagg	tc	120			
acgtgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gacccc	gagg	tccagtt	caa	ctggtac	gtg	180		
gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccac	ggg	aggagc	agtt	caacagc	acg	240		
ttccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgttgtg	caccaggact	ggctga	acgg	caaggagt	ac	300			
aagtgaagg	tetccaacaa	aggcctccca	gccccatcg	agaaa	accat	ctccaaa	acc	360			
aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catccc	ggga	ggagatg	acc	420			
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	acccc	agcga	catcgcc	gtg	480			
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaa	aactacaaga	ccacac	ctcc	catgctg	gac	540			
tccgacggct	ccttcttct	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagag	cag	gtggcag	cag	600			
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaacc	acta	cacgcaga	ag	660			
agcctctccc	tgtctccggg	taaa						684			

25 <210> 218
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido de Fc de IgG2 humana (sin lisina del extremo C)
 <400> 218

```

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

```

<210> 219
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-71-IgG2 (sin lisina del extremo C)

10

<400> 219

```

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
165          170          175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
180          185          190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
195          200          205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
210          215          220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225          230          235
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
245          250          255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260          265          270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
275          280          285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
290          295          300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305          310          315
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325          330          335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340          345          350

```

<210> 220
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-71-IgG2 (con lisina del extremo C)

10

<400> 220

```

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

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

```

<210> 221
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-76-IgG2 (sin lisina del extremo C)

10

<400> 221

```

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

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260          265          270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275          280          285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290          295          300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305          310          315          320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325          330          335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 340          345          350

```

<210> 222
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión D3-76-IgG2 (con lisina del extremo C)

<400> 222

5

10

```

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

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305     310     315
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325     330     335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340     345     350

```

<210> 223
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-71-IgG2

<400> 223

5

10

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgctctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tttttgtaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
gagggatag gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

```

<210> 224
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión D3-76-IgG2

<400> 224

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgctctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcacccg gcaaagccaa cgaagtaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccatctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tttttgtaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840

accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

```

<210> 225
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión CD86 humano-Ig murina

<400> 225

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

```

          355                360                365
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val
   370                375                380
Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser
 385                390                395
Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp
          405                410                415
Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr
          420                425                430
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
          435                440                445
Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val
          450                455                460
His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser
 465                470                475                480
Leu Gly Lys Ser Gly
          485

```

<210> 226
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión CD80 humano-Ig murina

<400> 226

```

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

```

			260					265				270			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile
			275				280					285			
Ser	Leu	Ser	Pro	Met	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp
	290					295					300				
Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His
305				310						315				320	
Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg
				325					330					335	
Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys
			340					345					350		
Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu
		355					360					365			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Arg	Gly	Pro	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr
	370					375					380				
Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Glu	Phe	Ser	Leu
385				390						395					400
Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Pro	Ala	Glu	Ile	Ala	Val	Asp	Trp
			405						410					415	
Thr	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Glu	Gln	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Val
			420					425					430		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Gln
		435					440					445			
Lys	Ser	Thr	Trp	Glu	Arg	Gly	Ser	Leu	Phe	Ala	Cys	Ser	Val	Val	His
	450					455					460				
Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	Leu	Thr	Thr	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Leu
465				470						475					480
Gly	Lys	Ser	Gly												

<210> 227
 <211> 1458
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión CD86 humano-Ig murina

10

<400> 227

```

atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctgggtgctg ctccctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagaact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcaccc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatggt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cttttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctccccccag gggtgacccc cagagtgcc ataacacaga acccctgtcc tccactcaaa 780
gagtgctccc catgcgcagc tccagacctc ttgggtggac catccgtctt catcttccct 840
ccaaagatca aggatgtact catgatctcc ctgagcccca tggtcacatg tgtgggtggtg 900
gatgtgagcg aggatgaccc agacgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta 960
cacacagctc agacacaaac ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt 1020
gccctcccca tccagcacca ggactggatg agtggaagg agttcaaatg caaggtcaac 1080
aacagagccc tccatcccc catcgagaaa accatctcaa aaccagaggg gccagtaaga 1140
gctccacagg tatatgtctt gcctccacca gcagaagaga tgactaagaa agagttcagt 1200
ctgacctgca tgatcacagg cttcttacct gccgaaattg ctgtggactg gaccagcaat 1260
    
```

```

gggcgtacag agcaaaacta caagaacacc gcaacagtc tggactctga tggttcttac 1320
tcatgtaca gcaagctcag agtacaaaag agcacttggg aaagaggaag tcttttcgcc 1380
tgctcagtgg tccacgaggg tctgcacaat caccttacga ctaagacat ctccccggtct 1440
ctgggtaaat ccggataa 1458

```

<210> 228
 <211> 1455
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de la proteína de fusión CD80 humano-Ig murina

10

<400> 228

```

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatata ggcccagta caagaaccgg accatcttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggtctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgtctgaag 360
tatgaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcecta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
attgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gacctcaac tggaatata ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacgggg tgacccccag agtgcccata acacagaacc cctgtcctcc actcaaagag 780
tgcccccat gcgcagctcc agacctctg ggtggaccat ccgtcttcat ctccctcca 840
aagatcaagg atgtactcat gatctccctg agccccatgg tcacatgtgt ggtggtgat 900
gtgagcgagg atgaccaga cgtccagatc agctggttg tgaacaacgt ggaagtacac 960
acagctcaga cacaaacca tagagaggat tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc 1020
ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaagcaa ggtcaacaac 1080
agagccctcc catccccat cgagaaaacc atctcaaac ccagagggcc agtaagagct 1140
ccacaggtat atgtcttgc tccaccagca gaagagatga ctaagaaaga gttcagtctg 1200
acctgcatga tcacaggctt cttacctgcc gaaattgctg tggactggac cagcaatggg 1260
cgtacagagc aaaactaaa gaacaccgca acagtcctgg actctgatgg ttcttacttc 1320
atgtacagca agctcagagt acaaaagagc acttgggaaa gaggaagtct tttcgctctc 1380
tcagtgttcc acgaggtct gcacaatcac cttacgacta agaccatctc ccggtctctg 1440
ggtaaatccg gataa 1458

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de SEC ID N°: 36 en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en SEC ID N°: 36, en el que el polipéptido se une a CD80 humano o CD86 humano o un dominio extracelular de cualquiera de ambos y tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunitaria que es mayor que la capacidad de un polipéptido LEA29Y que comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168 para inhibir una respuesta inmunitaria.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se diferencia de SEC ID N°: 36 en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 residuos de aminoácidos.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 36.
- 15 4. Un dímero de polipéptidos aislado o recombinante que comprende dos polipéptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el dímero tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria que un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 168.
- 20 5. El polipéptido de la reivindicación 1 que es una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de SEC ID N°: 36 en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en SEC ID N°: 36 y (b) un segundo polipéptido, en el que el segundo polipéptido es un polipéptido del Fc de Ig, en el que la proteína de fusión tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria que una proteína de fusión LEA29Y-Ig, en el que la proteína de fusión LEA29Y-Ig comprende la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 166.
- 25 6. La proteína de fusión de la reivindicación 5, en el que la proteína de fusión comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 197 ó 211.
- 30 7. El dímero de polipéptidos de la reivindicación 4, que es un dímero de proteínas de fusión aisladas o recombinantes que comprende dos proteínas de fusión monoméricas ligadas por al menos un enlace disulfuro formado entre dos residuos de cisteína presentes en cada proteína de fusión mutante monomérica, en el que cada proteína de fusión monomérica comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de SEC ID N°: 36 en no más de 6 residuos de aminoácidos y que incluye residuos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en SEC ID N°: 36 y (b) un polipéptido del Fc de Ig, y en el que el dímero de proteínas de fusión tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunitaria que un dímero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig, en el que el dímero de proteínas de fusión LEA29Y-Ig comprende dos proteínas de fusión LEA29Y-Ig monoméricas comprendiendo cada una la secuencia de polipéptidos de SEC ID N°: 166.
- 35 8. El dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 7, en el que cada proteína de fusión monomérica comprende la secuencia de polipéptidos mostrada en SEC ID N°: 197 ó 211.
- 40 9. Un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un dímero de polipéptidos de la reivindicación 4, una proteína de fusión de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, o un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo.
10. Un vector que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Una célula huésped aislada o recombinante que comprende:
- 45 (a) un polipéptido de cualquier de las reivindicaciones 1-3;
 (b) un dímero de polipéptidos de la reivindicación 4;
 (c) una proteína de fusión de la reivindicación 5 o la reivindicación 6;
 (d) un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 7 o la reivindicación 8;
 (e) un ácido nucleico de la reivindicación 9; y/o
 (f) un vector de la reivindicación 10.
- 50 12. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable o vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más de los siguientes:
- (a) un polipéptido de cualquier de las reivindicaciones 1-3;
 (b) un dímero de polipéptidos de la reivindicación 4;
 (c) una proteína de fusión de la reivindicación 5 o la reivindicación 6;

- (d) un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 7 o la reivindicación 8;
 - (e) un ácido nucleico de la reivindicación 9;
 - (f) un vector de la reivindicación 10; y/o
 - (g) una célula huésped de la reivindicación 11.
- 5 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable o vehículo farmacéuticamente aceptable y un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 8.
- 10 14. Un polipéptido de cualquier de las reivindicaciones 1-3, un dímero de polipéptidos de la reivindicación 4, una proteína de fusión de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, un ácido nucleico de la reivindicación 9, un vector de la reivindicación 10 o una célula de la reivindicación 11 para su uso en:
- (i) un tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero;
 - (ii) el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario; o
 - (iii) el tratamiento de rechazo de trasplante de tejido u órgano en un mamífero.
- 15 15. El dímero de proteínas de fusión para su uso de la reivindicación 14, en el que el dímero de proteínas de fusión es un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 8.
16. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un dímero de polipéptidos de la reivindicación 4, una proteína de fusión de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, un ácido nucleico de la reivindicación 9, un vector de la reivindicación 10 o una célula de la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento para:
- 20 (i) un tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria en un mamífero;
- (ii) el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario; o
- (iii) el tratamiento de rechazo de trasplante de tejido u órgano en un mamífero.
17. El uso de un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 16, en el que el dímero de proteínas de fusión es un dímero de proteínas de fusión de la reivindicación 8.
- 25 18. Un procedimiento de producir un polipéptido que comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 11 en un medio de cultivo y recuperar el polipéptido expresado por la célula.

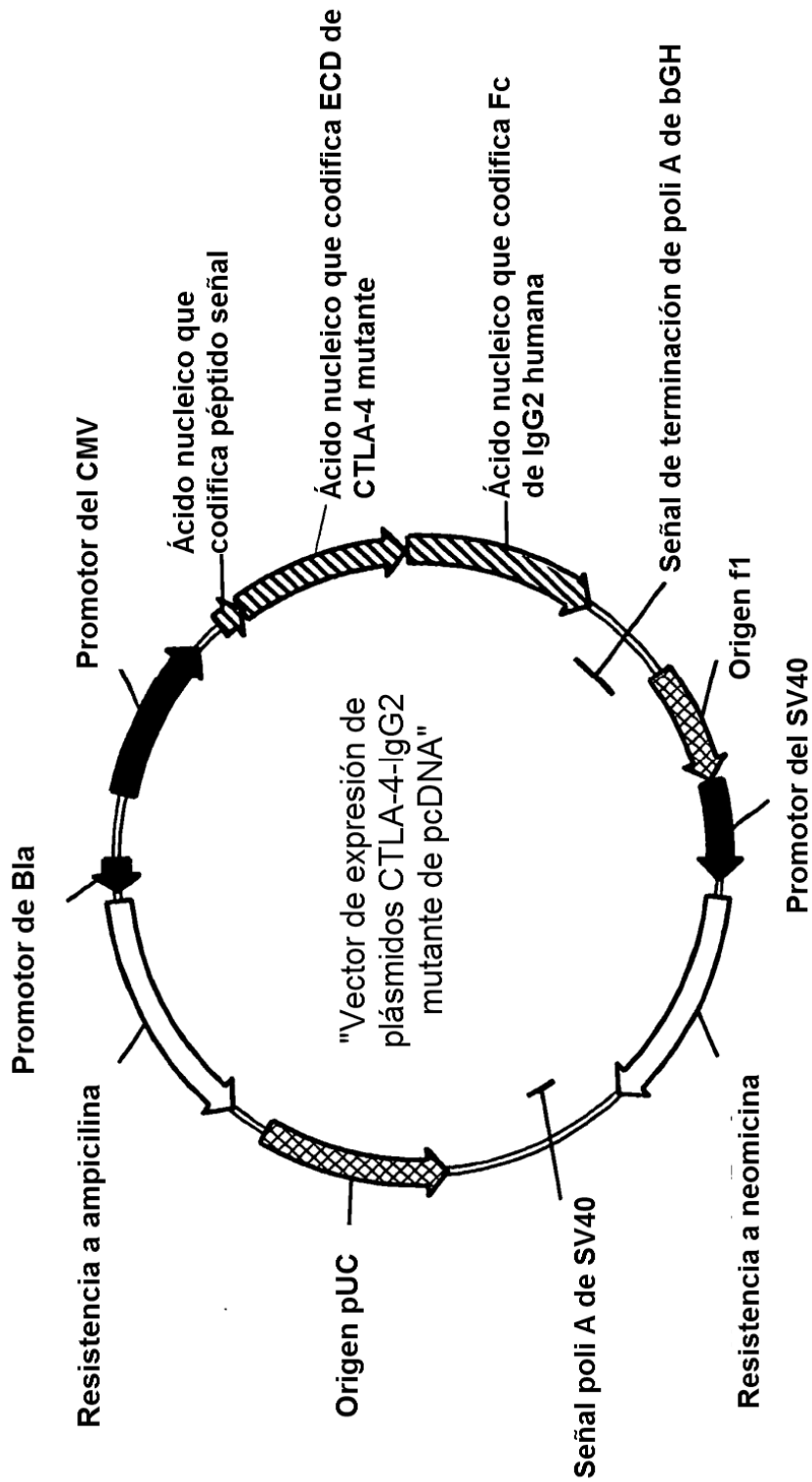


Figura 1

Figura 2A

...FCSG	VIHVT.....	HFPDN	GVT	PKSCD.....	LSPGK
Señal (1 - 34)	ECD de CD80 humano (35 - 242)		Ligador (243-245)	Fc de IgG1 humana (246-476)	

Figura 2B

...LSGA	APLKI.....	EDPQPPP	GVT	PKSCD.....	LSPGK
Señal (1 - 23)	ECD de CD86 humano (24 - 243)		Ligador (244-246)	Fc de IgG1 humana (247-477)	

Figura 2C

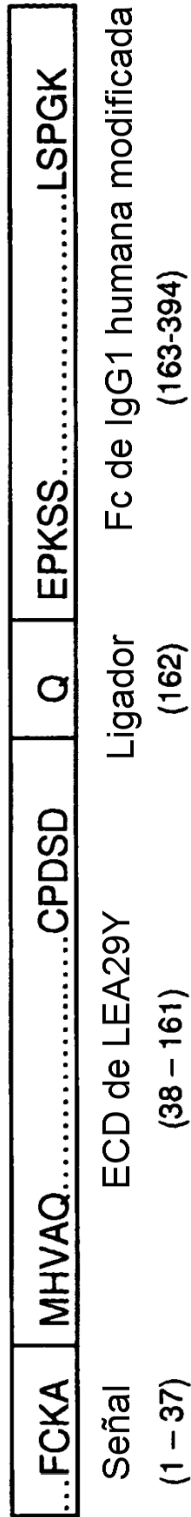
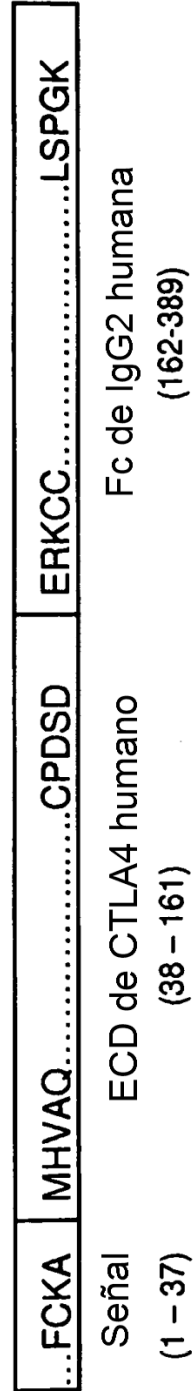


Figura 2D



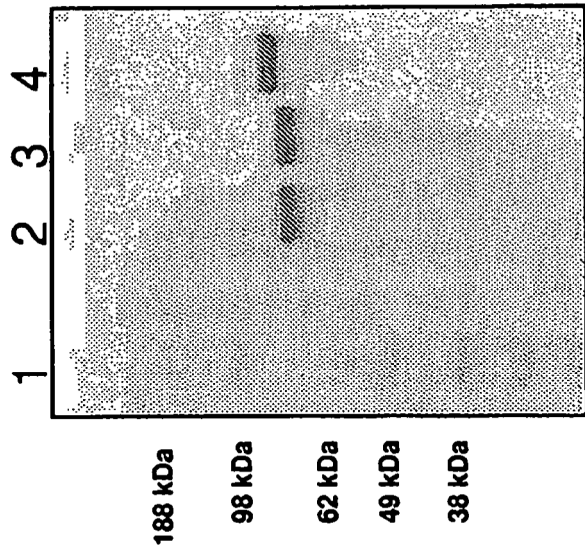


Figura 3

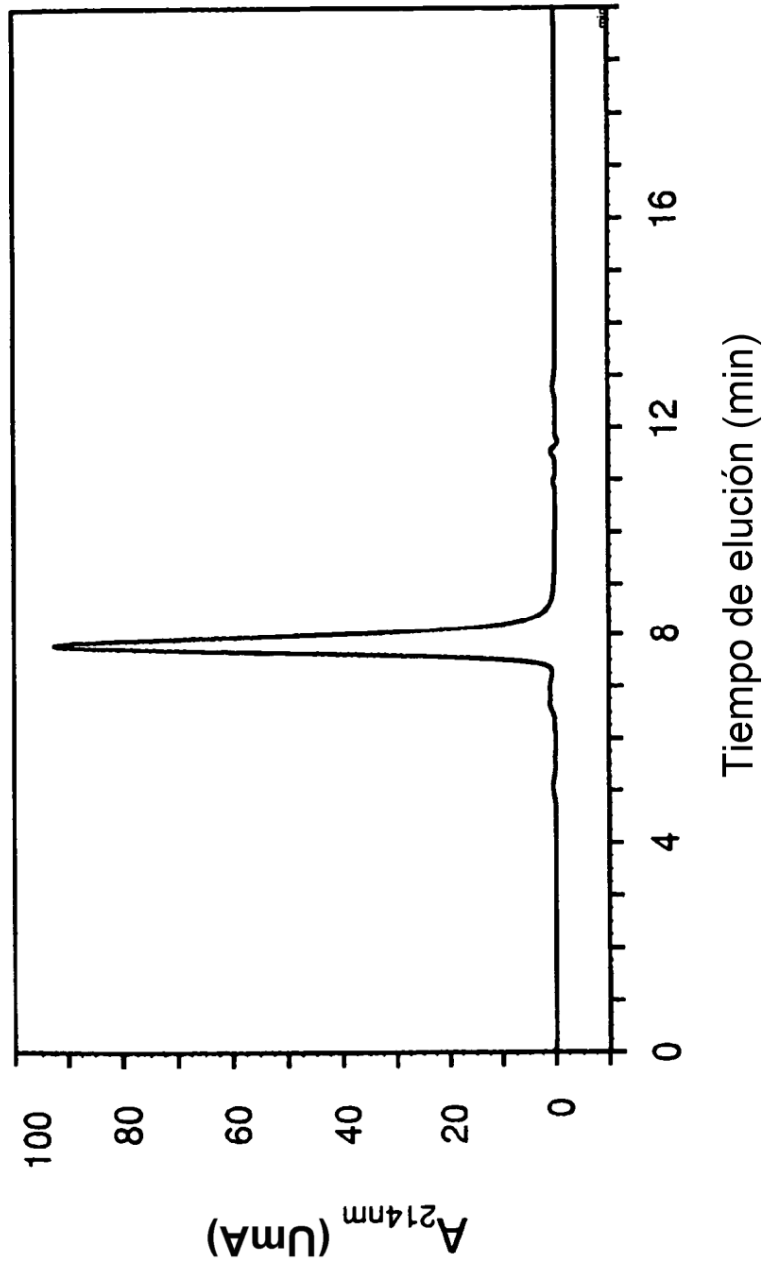


Figura 4

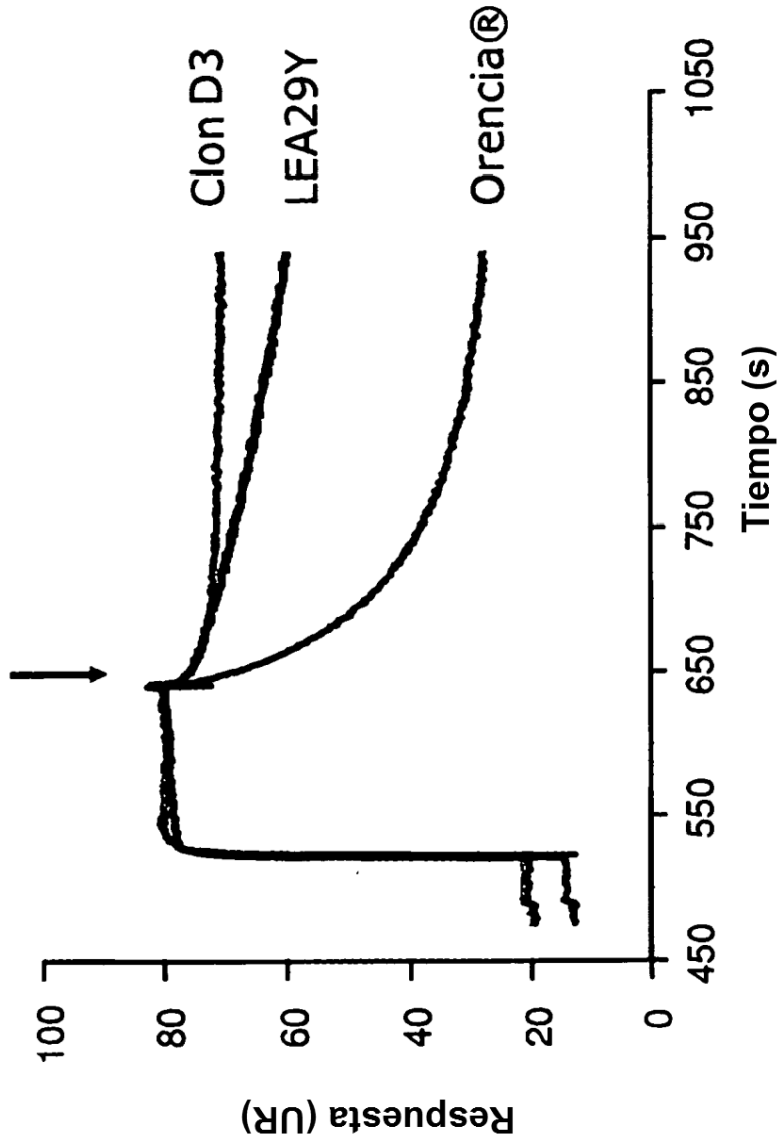


Figura 5

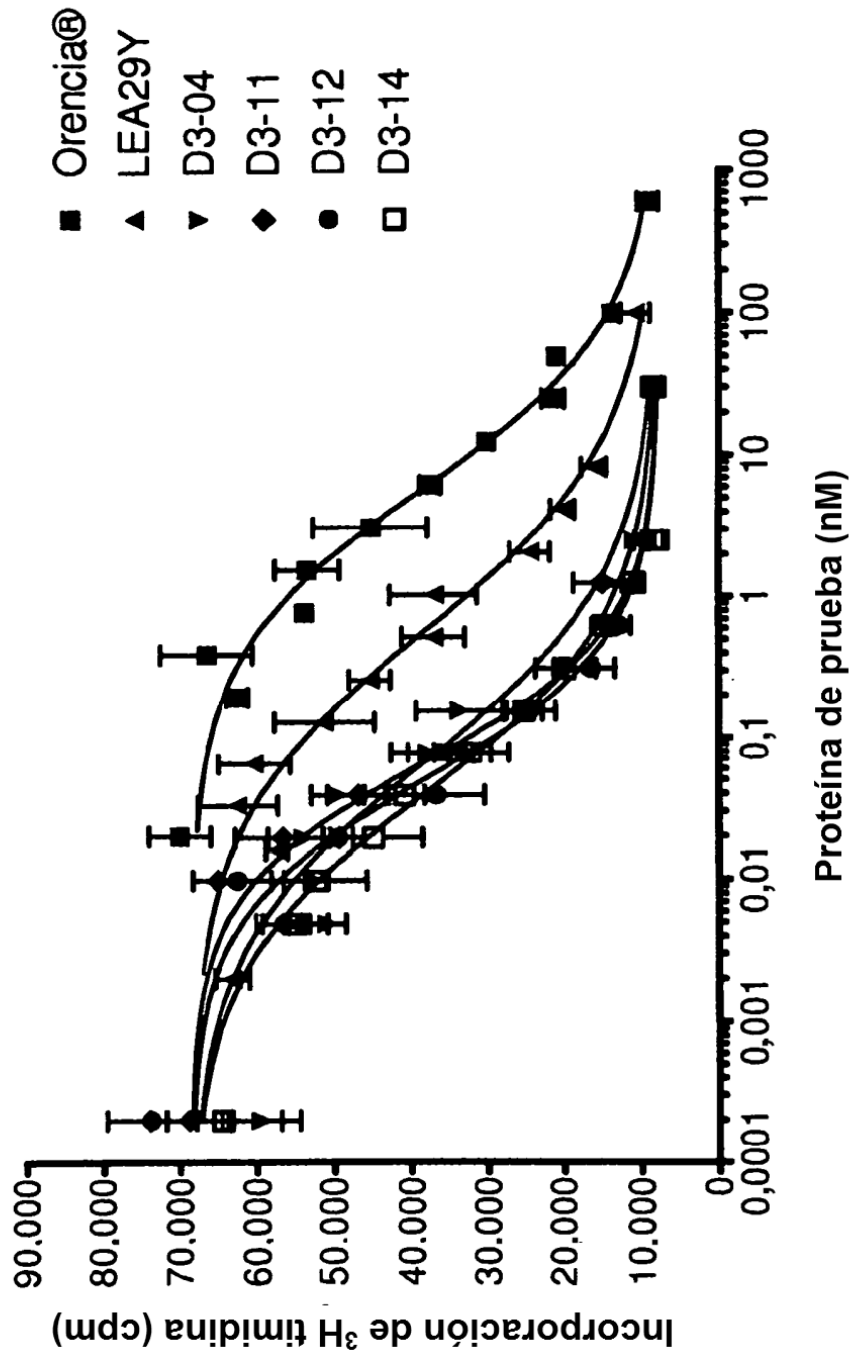


Figura 6

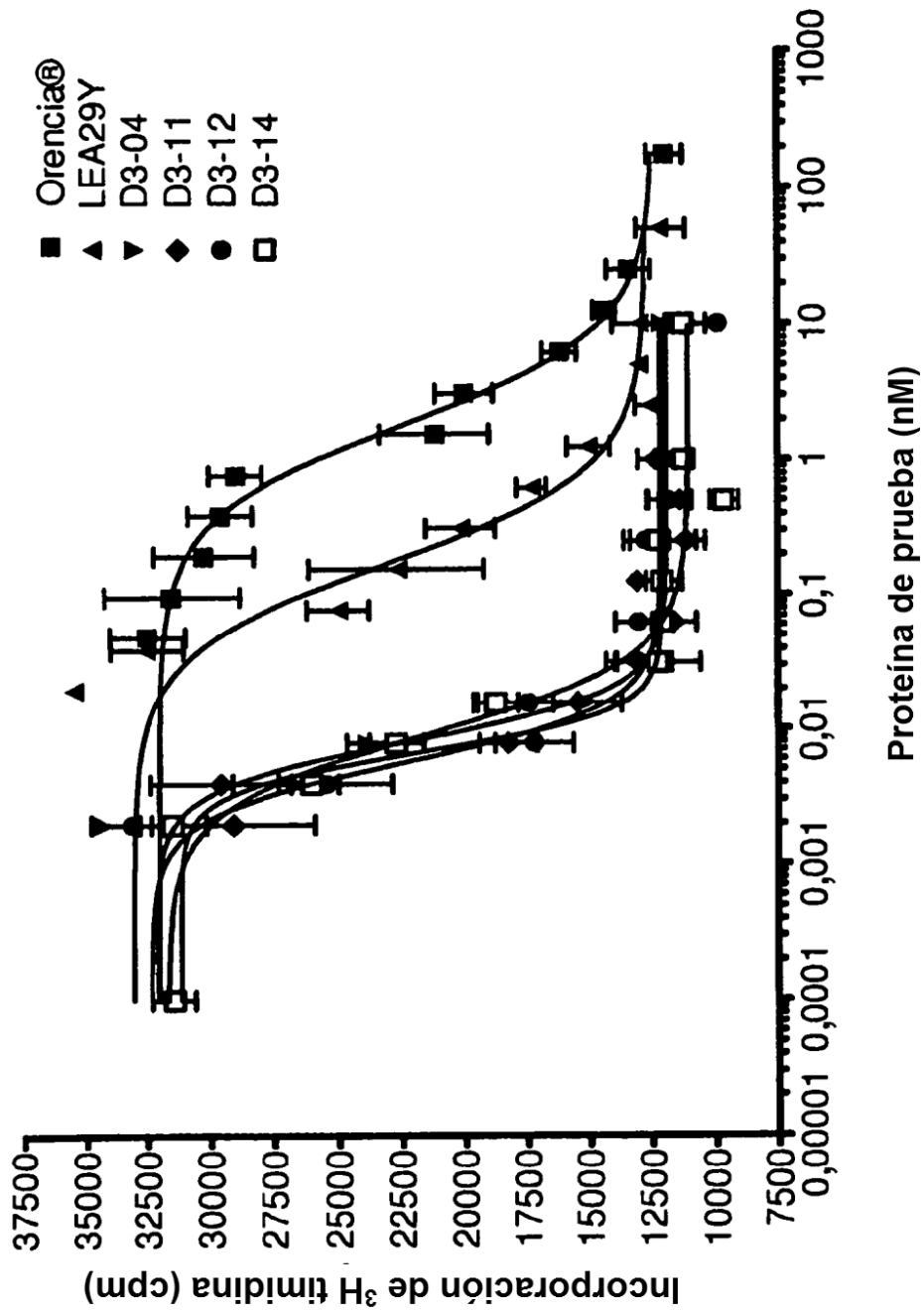


Figura 7

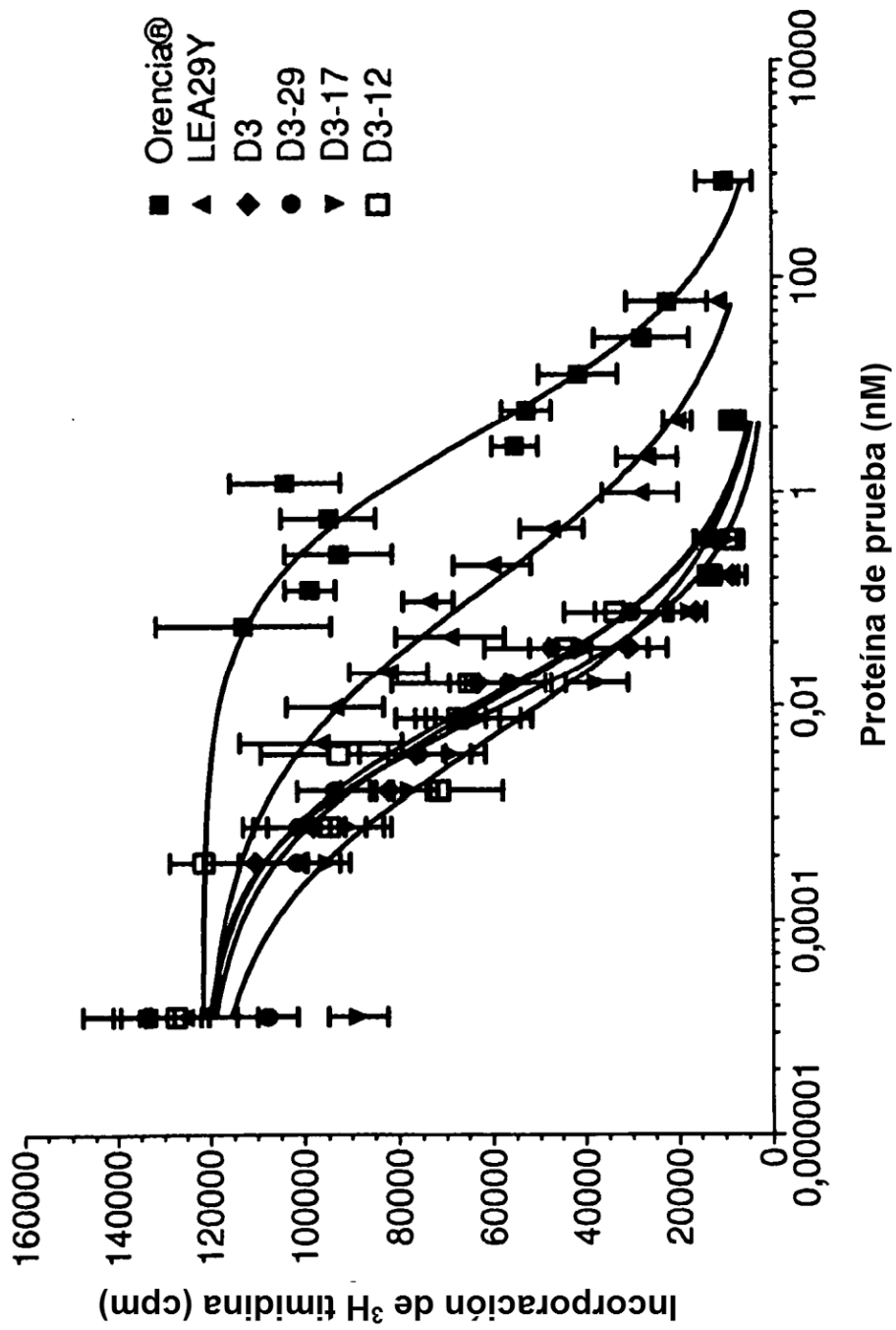


Figura 8

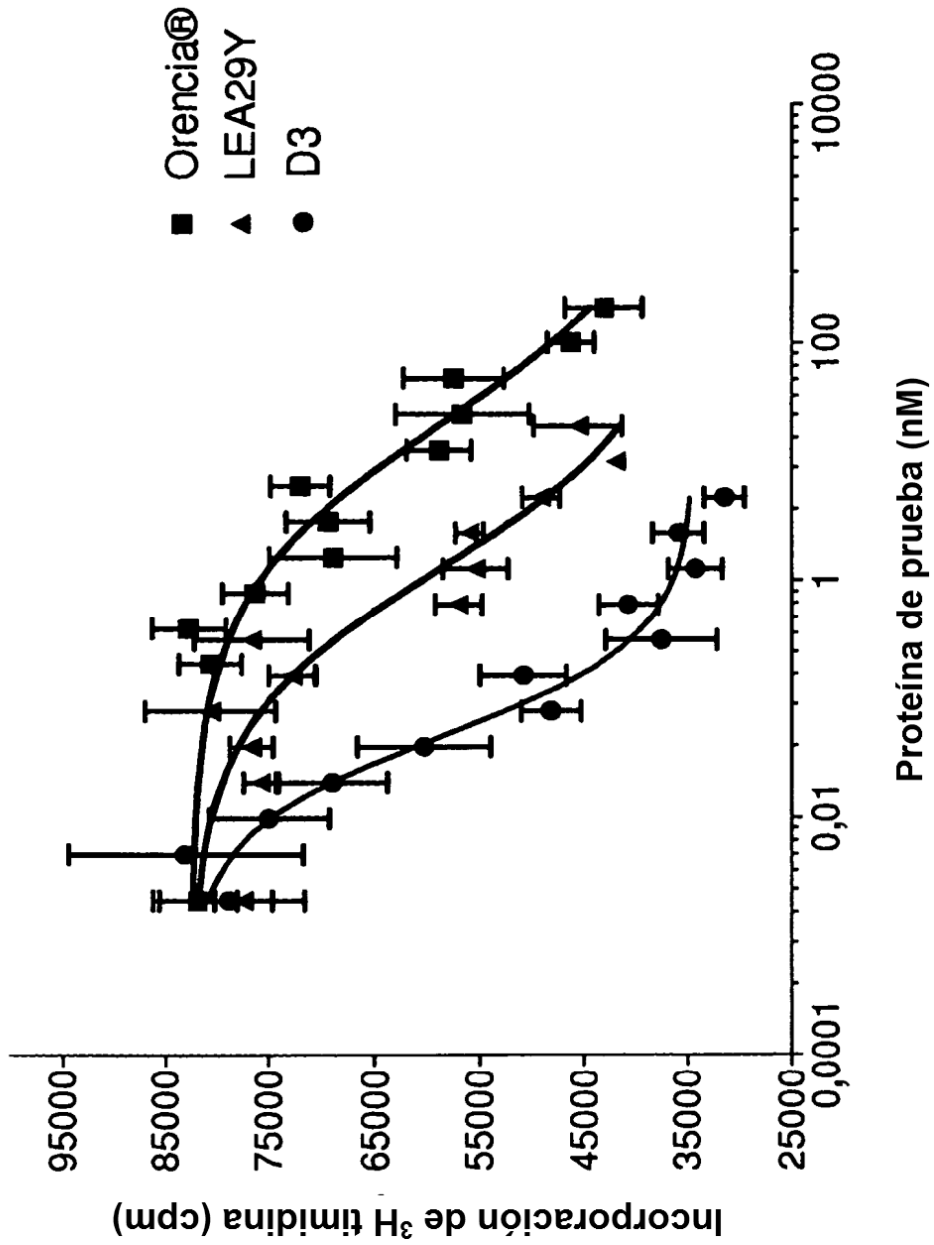


Figura 9

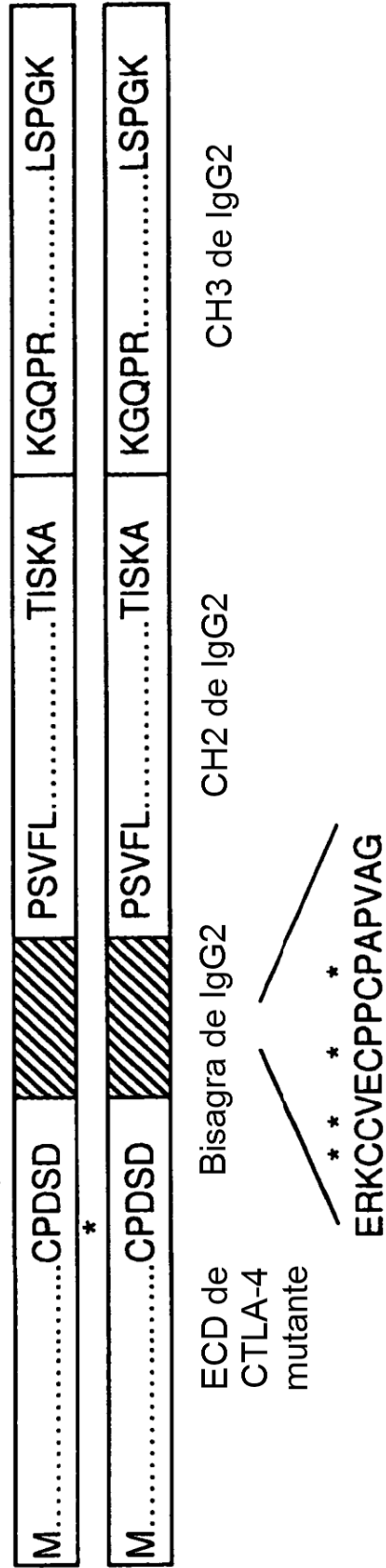


Figura 10

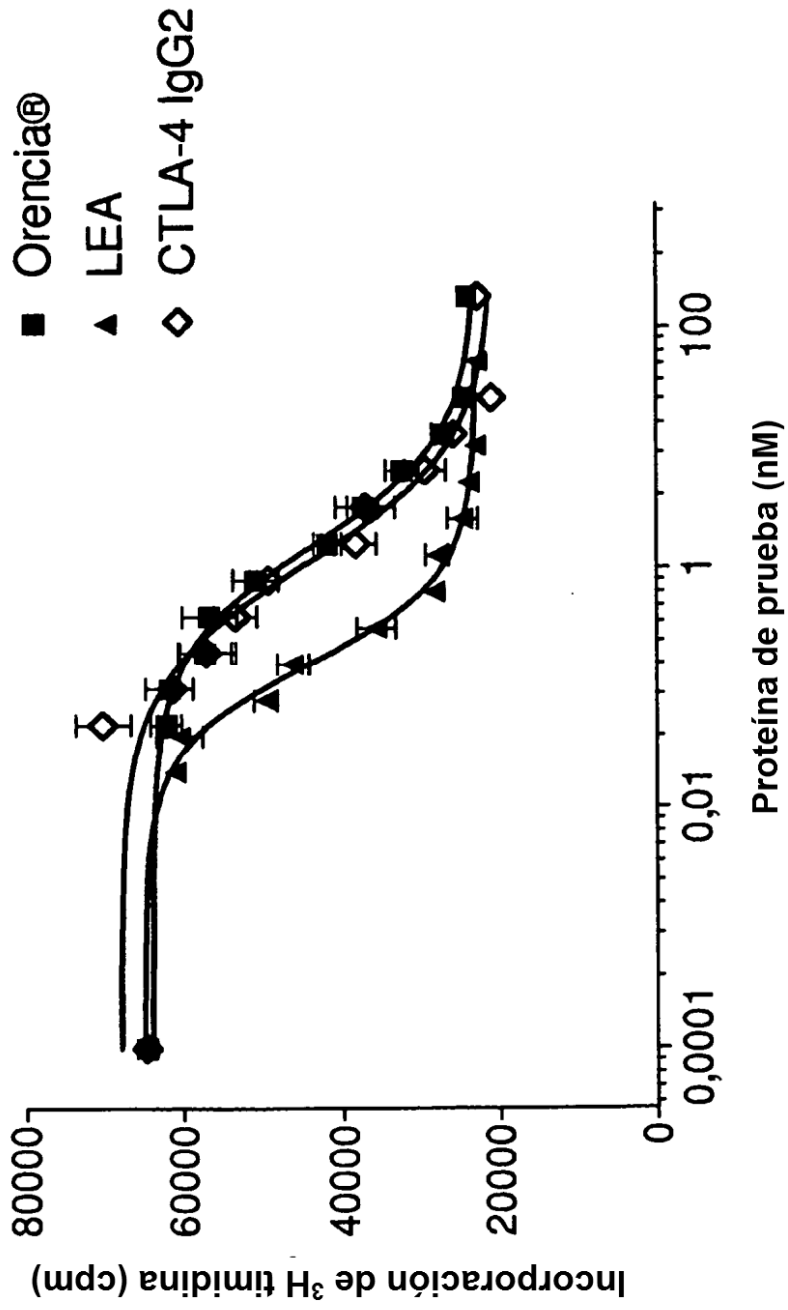


Figura 11

```

hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTIVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELIFLDDSI : 65
LEA29YECD : .....Y.....*.....40.....*.....60.....: 65
D3-1 : .....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-2 : .....E.....I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-3 : .....E.....N.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-4 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-5 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-6 : .....E.....N.I.....G.....M...D.....PS : 65
D3-7 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-8 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....S : 65
D3-9 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....P : 65
D3-11 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-12 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-14 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-15 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-16 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-17 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-19 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-20 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-21 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-22 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-23 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-24 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-25 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-26 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-27 : .....E.....N.....G.....M...K.....PS : 65
D3-28 : .....E.....N.I.....G.....M...K.....P : 65
D3-29 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-30 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....P : 65
D3-31 : .....E.....N.I.....G.....M...KED.....PS : 65

```

Figura 12A

```

hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELFLDDSI : 65
LEA29YECD : .....Y..... : 60
D3-32 : .....E.....N.I.....K.....M...K.D.....PS : 65
D3-33 : .....E.....N.I.....K.....M...KED.....PS : 65
D3-34 : .....N.....N.....M...K.....PS : 65
D3-39 : .....E.....N.....M...K.....P. : 65
D3-50 : .....N.....N.....M...K.D.....P. : 65
D3-52 : .....N.I.....M...K.....P. : 65
D3-53 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-54 : .....N.....M...KE.....P. : 65
D3-55 : .....E.....N.....M...KE.....P. : 65
D3-56 : .....N.....M...KE.....PS : 65
D3-57 : .....N.I.....M...KED.....P. : 65
D3-58 : .....N.....M...KED.....PS : 65
D3-59 : .....E.....N.I.....M...KE.....P. : 65
D3-60 : .....N.I.....M...KE.....PS : 65
D3-61 : .....E.....N.I.....M...KE.....PS : 65
D3-62 : .....N.I.....M...KED.....PS : 65
D3-63 : .....N.....M...KE.....P. : 65
D3-64 : .....N.....M...E.....P. : 65
D3-65 : .....N.....M...K.....PS : 65
D3-66 : .....N.....M...K.D.....P. : 65
D3-68 : .....E.....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-69 : .....E.....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-70 : .....E.....N.....M...K.....PS : 65
D3-71 : .....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-72 : .....E.....N.I.....M...K.....PS : 65
D3-73 : .....E.....N.....M...K.....P. : 65
D3-74 : .....N.I.....M...K.....P. : 65
D3-75 : .....E.....N.....M...KE.....PS : 65
D3-76 : .....N.....M...KED.....P. : 65

```

Figura 12B

```

hCTLA4ECD : MHVAQPAVVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI : 65
LEA29YECD : .....Y..... : 65
D1 : .....E.H...I.....N.....M...K.D.....PF : 65
D1T : .....E.H.N.I.....N.....M...K.D.....PF : 65
D2 : .....E.H.N.I.....N.....M...K.D.....PF : 65
D3 : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D4 : .....S.....D.I.....S.....M...E.D.....PT : 65
D5 : ..... : 65
D6 : ..... : 65
D20 : .....E.H...I.....M...ED.....P : 65
D21 : .....SA.HN.D.I.....K.S.....M...EED.....PT : 65
D23 : .....SA.HN.A.I.....K.G.....M...KED.....PS : 65
D24 : .....E.....N.I.....K.G.....M...KED.....PS : 65
D26 : .....EA.H.N.....E.G.....M...VED.....PS : 65
D27 : .....E.....N.....E.G.....M...VED.....PS : 65
D28 : .....EA.H.N.....G.....M...ED.....PS : 65
D29 : .....EA.H.D.I.....K.....M...ED.....PS : 65
D31 : .....EA.HN.D.I.....G.....M...VED.....K... : 65

```

Figura 12C

```

hCTLA4ECD : * 80 * 100 * 120 124
LEA29YECD : . . . . . E . . . . . : 124
D3-1 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-2 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-3 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-4 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-5 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-6 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-7 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-8 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-9 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-11 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-12 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-14 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-15 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-16 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-17 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-19 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-20 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-21 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-22 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-23 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-24 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-25 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124
D3-26 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-27 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-28 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-29 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-30 : . . . . . F . . . . . F . . . . . : 124
D3-31 : . . . . . A . . . . . F . . . . . : 124

```

Figura 12D

```

*      80      *      100      *      120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPYPYLLGIGNGTQIYVIDPEPCPDS : 124
LEA29YECD : .....E..... : 124
D3-32 : .....A..... : 124
D3-33 : .....A..... : 124
D3-34 : ..... : 124
D3-39 : ..... : 124
D3-50 : ..... : 124
D3-52 : ..... : 124
D3-53 : .....A.....E..... : 124
D3-54 : ..... : 124
D3-55 : ..... : 124
D3-56 : ..... : 124
D3-57 : ..... : 124
D3-58 : ..... : 124
D3-59 : ..... : 124
D3-60 : ..... : 124
D3-61 : ..... : 124
D3-62 : ..... : 124
D3-63 : ..... : 124
D3-64 : ..... : 124
D3-65 : .....E..... : 124
D3-66 : .....E..... : 124
D3-68 : .....A..... : 124
D3-69 : .....E..... : 124
D3-70 : .....E..... : 124
D3-71 : .....E..... : 124
D3-72 : .....E..... : 124
D3-73 : .....E..... : 124
D3-74 : .....E..... : 124
D3-75 : ..... : 124
D3-76 : ..... : 124

```

Figura 12E

```

*      80      *      100      *      120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPYPPYYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD : 124
LEA29YECD : .....A.....E..... : 124
D1 : .....A..... : 124
D1T : .....A..... : 124
D2 : .....A.....M..... : 124
D3 : .....A.....F..... : 124
D4 : .....V.....F..... : 124
D5 : .....F..... : 124
D6 : .....F..... : 124
D20 : .....F.....V..... : 124
D21 : .....F.....V.....F..... : 124
D23 : .....F.....A.....L..... : 124
D24 : .....F.....A.....L..... : 124
D26 : .....F.....A.....L..... : 124
D27 : .....F.....A.....L..... : 124
D28 : .....F.....A.....L..... : 124
D29 : .....F.....A.....L..... : 124
D31 : .....F..... : 124

```

Figura 12F

MATRIZ DE SUSTITUCIÓN BLOSUM62

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

Figura 13

ES 2 399 088 T3

A.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 40-54 de D3)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
A	G	S	Q	V	T	E	V	C	A	M	T	Y	M	K
-1	0	0	0	-2	0	-1	-2	-1	0	-1	0	-2	-1	-1

= -12

B.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 41-55 de D3)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
A	G	S	Q	V	T	E	V	C	A	M	T	Y	M	K
4	-1	4	5	4	5	5	4	9	4	-1	5	7	5	

= 59

C.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 41-55 de D3, con los aminoácidos 49-50 deletados)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
A	G	S	Q	V	T	E	V	C	T	Y	M	K		
4	-1	4	5	4	5	5	4	9	0	-2	-1	-2		

= 34

D.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 41-55 de D3, con los aminoácidos 49-50 deletados)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
A	G	S	Q	V	T	E	V	C	-	-	T	Y	M	K
4	-1	4	5	4	5	5	4	9	-12	-1	5	7	5	

= 43

Figura 14

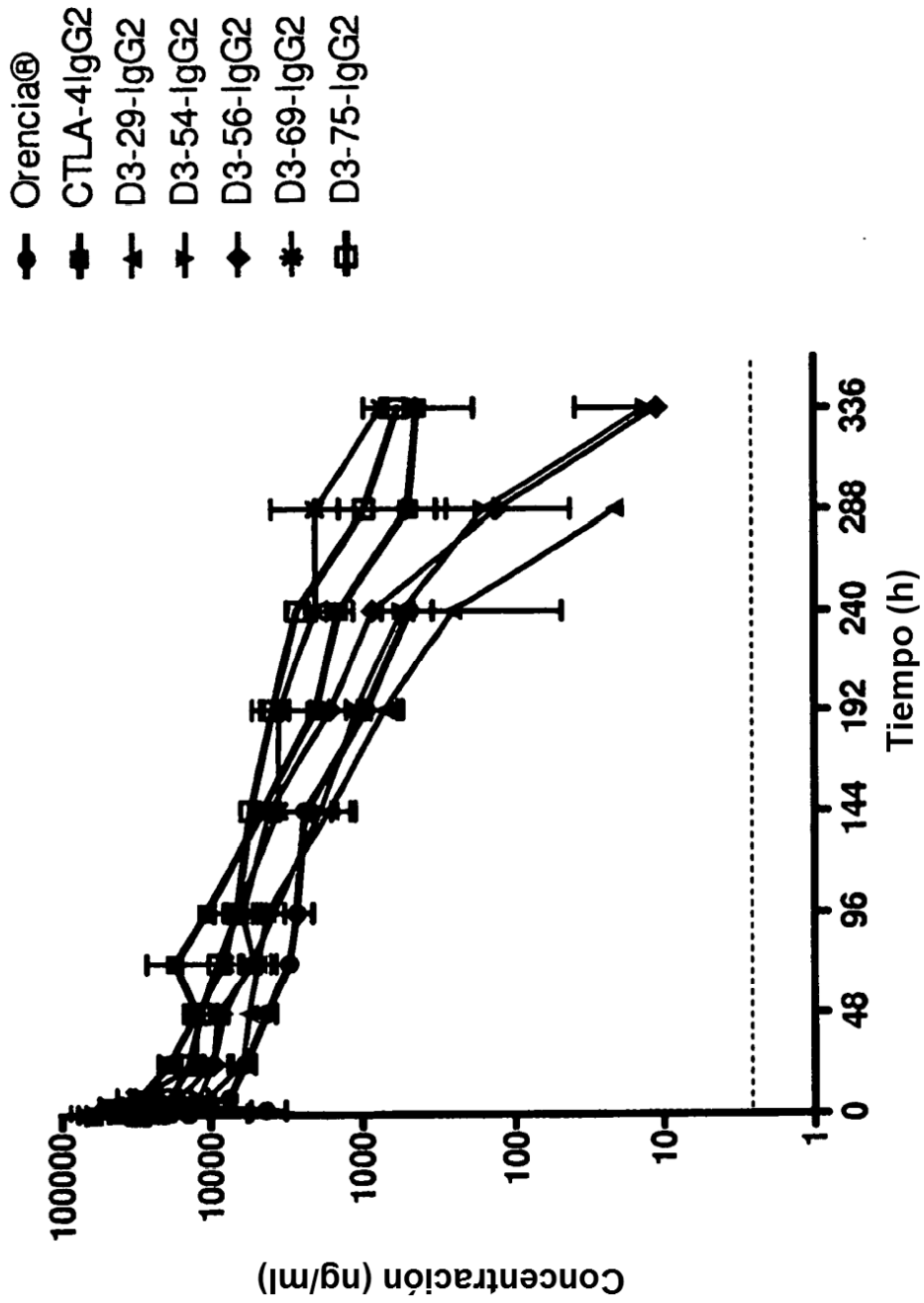


Figura 15A

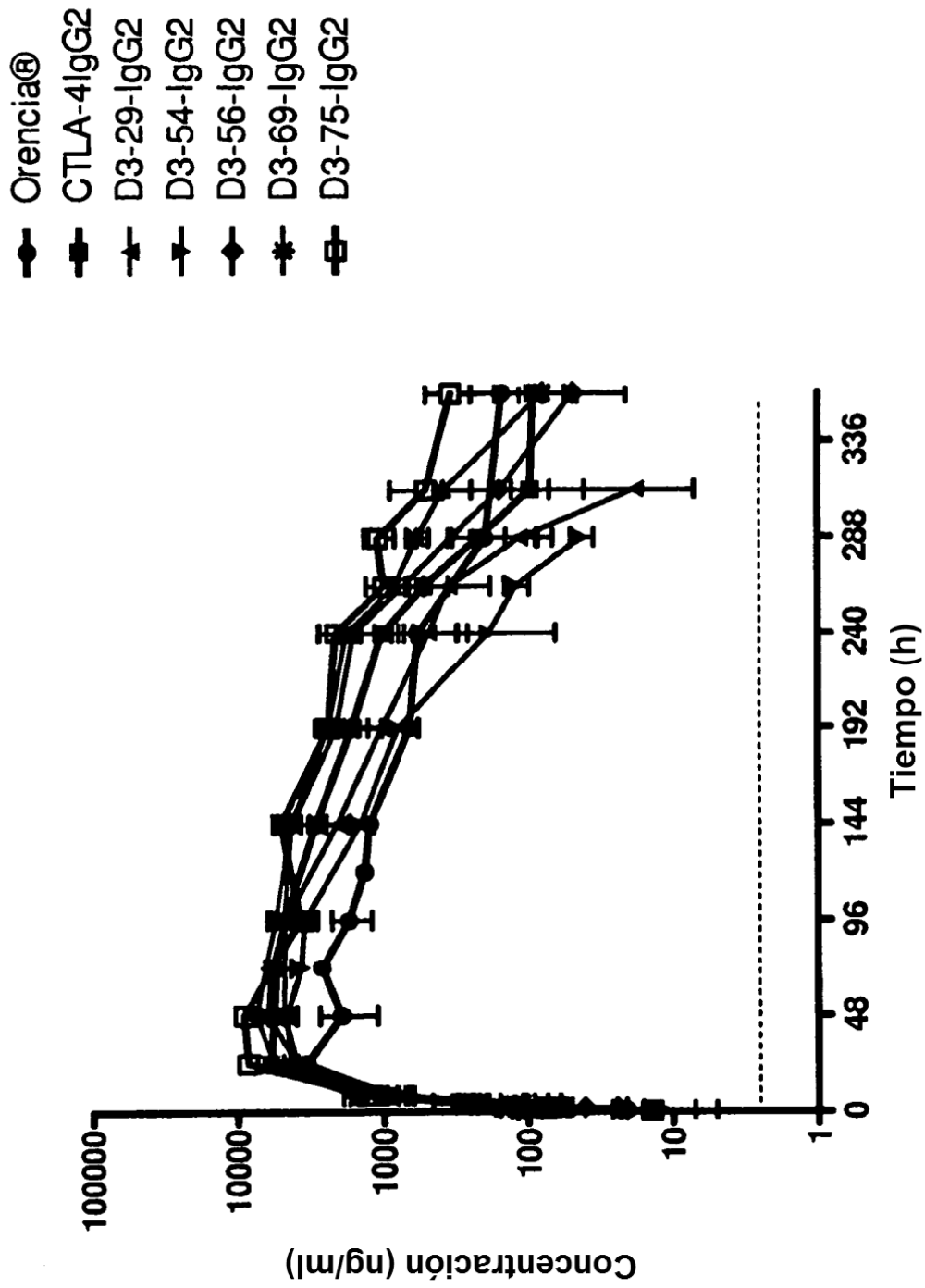


Figura 15B