

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 852**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2001 E 04008908 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 1536234**

54 Título: **Moléculas mutantes CTLA4 solubles y usos de las mismas**

30 Prioridad:

26.05.2000 US 579927

26.06.2000 US 214065 P

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

27.05.2016

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**PEACH, ROBERT J.;
NAEMURA, JOSEPH R.;
LINSLEY, PETER S. y
BAJORATH, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 571 852 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

Moléculas mutantes CTLA4 solubles y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las moléculas CTLA4 solubles que son mutadas a partir del CTLA4 de tipo silvestre para retener la capacidad para unirse a CD80 y/o CD86.

10 **Antecedentes de la invención**

Las interacciones intercelulares no específicas del antígeno entre los linfocitos T y células que presentan antígenos (APC) generan señales coestimulantes de la célula T que generan respuestas de la célula T al antígeno (Jenkins y Johnson (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:361-367). Las señales coestimulantes determinan la magnitud de una respuesta de la célula T al antígeno, y si esta respuesta activa o inactiva las respuestas subsecuentes al antígeno (Mueller *et al.* (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:445-480).

La activación de la célula T en la ausencia de coestimulación resulta en una respuesta abortada o anérgica de la célula T (Schwartz, R.H. (1992) *Cell* 71:1065-1068). Una señal coestimulante clave se proporciona por la interacción del receptor CD28 de la superficie de la célula T con moléculas relacionadas B7 en células que presentan antígenos (por ejemplo, conocido también como B7-1 y B7-2, o CD80 y CD86, respectivamente) (P. Linsley y J. Ledbetter (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11:191-212).

La molécula conocida ahora como CD80 (B7-1) se describió originalmente como un antígeno de activación asociado con la célula B humana (Yokochi, T. *et al.* (1981) *J. Immunol.* 128:823-827; Freeman, G.J. *et al.* (1989) *J. Immunol.* 143:2714-2722), y subsecuentemente identificado como un contrarceptor para las moléculas CD28 y CTLA4 de la célula T relacionada (Linsley, P., *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5031-5035; Linsley, P.S. *et al.* (1991a) *J. Exp. Med.* 173:721-730; Linsley, P.S. *et al.* (1991b) *J. Exp. Med.* 174:561-570).

Más recientemente, otro contrarceptor para CTLA4 se identificó en células que presentan antígenos (Azuma, N. *et al.* (1993) *Nature* 366:76-79; Freeman (1993a) *Science* 262:909-911; Freeman, G. J. *et al.* (1993b) *J. Exp. Med.* 178:2185-2192; Hathcock, K.L.S., *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 180:631-640; Lenschow, D.J. *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11054-11058; Ravi-Wolf, Z., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11182-11186; Wu, Y. *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178:1789-1793. Esta molécula, conocida ahora como CD86 (Caux, C., *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 180:1841-1848), pero llamada también B7-0 (Azuma *et al.*, (1993), mencionado anteriormente) o B7-2 (Freeman *et al.*, (1993a), mencionado anteriormente), comparte cerca del 25 % de la identidad de secuencia con CD80 en su región extracelular (Azuma *et al.*, (1993), mencionado anteriormente; Freeman *et al.*, (1993a), mencionado anteriormente, (1993b), mencionado anteriormente). Las células transfectadas CD86 provocan las respuestas de la célula T mediadas por CD28 (Azuma *et al.*, (1993), mencionado anteriormente; Freeman *et al.*, (1993a), (1993b), mencionado anteriormente).

Las comparaciones de expresión de CD80 y CD86 han sido el objeto de estudios diversos (Azuma *et al.*, (1993), mencionado anteriormente; Hathcock *et al.*, (1994), mencionado anteriormente; Larsen, C.P. *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:5208-5219; Stack, R.M., *et al.*, (1994) *J. Immunol* 152:5723-5733). Datos actuales indican que la expresión de CD80 y CD86 se regula de manera diferente, y sugieren que la expresión de CD86 tiende a preceder la expresión de CD80 durante una respuesta inmune.

Formas solubles de CD28 y CTLA4 se han construido fusionando dominios extracelulares similares de tipo variable (v) de CD28 y CTLA4 a dominios constantes de inmunoglobulina (Ig) resultando en CD28Ig y CTLA4Ig. El CTLA4Ig se une a tanto células CD80 positivas como CD86 positivas de manera más fuerte que CD28Ig (Linsley, P. *et al.* (1994) *Immunity* 1:793-80). Muchas respuestas inmunes dependientes de la célula T se bloquean por CTLA4Ig *in vitro* e *in vivo*. (Linsley, *et al.* (1991b), mencionado anteriormente; Linsley, P.S. *et al.*, (1992a) *Science* 257:792-795; Linsley, P.S. *et al.*, (1992b) *J. Exp. Med.* 176:1595-1604; Lenschow, D.J. *et al.* (1992), *Science* 257:789-792; Tan, P. *et al.*, (1992) *J. Exp. Med.* 177; 165-173; Turka, L.A., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102-11105).

Peach *et al.*, (*J. Exp. Med.* (1994) 180:2049-2058) identificó regiones en el dominio extracelular de CTLA4 las cuales son importantes para una unión fuerte a CD80. De manera específica, una porción hexapéptida (MYPPPY) en la región de tipo (CDR3) región determinante de complementariedad 3, se identificó completamente conservada en todos los miembros de la familia de CD28 y CTLA4. La mutagénesis de exploración de alanina a través de la porción MYPPPY en CTLA4 y en residuos seleccionados en CD28Ig, reduce o anula la unión a CD80.

Se construyeron también regiones homólogas que intercambian moléculas quiméricas de CTLA4 y CD28. Se construyeron las moléculas HS4, HS4-A y HS4-B injertando regiones similares a CDR3 de CTLA4, las cuales incluyen también una porción carboxi de manera terminal, que se extiende para incluir ciertos residuos no conservados de aminoácidos sobre CD28Ig. Estos mutantes homólogos mostraron una avidéz de unión superior a CD80 que CD28Ig.

En otro grupo de mutantes homólogos quiméricos, la región similar a CDR1 de CTLA4, la cual no es conservada en CD28 y se predice que es adyacente espacialmente a la región similar a CDR3, se injertó en HS4 y HS4-A. Estas moléculas mutantes homólogas quiméricas (designadas HS7 y HS8) demostraron aún mayor afinidad de unión para CD80 que CD28Ig.

Moléculas mutantes homólogas quiméricas también se hicieron injertando en HS7 y HS8 la región similar a CDR2 de CTLA4, pero esta combinación no hizo mejora adicional a la avidéz de unión para CD80. De este modo, se determinó que la porción MYPPPY de CTLA4 y CD28 era crítica para la unión a CD80, pero ciertos residuos de aminoácidos no conservados en las regiones similares a CDR1 y CDR3 de CTLA4 fueron también responsables de incrementar la afinidad de unión de CTLA4 con CD80.

Se mostró que CTLA4Ig bloqueaba efectivamente la coestimulación de la célula T asociada a CD80, pero no fue tan efectiva en el bloqueo de las respuestas asociadas a CD86. Se construyeron moléculas mutantes CTLA4 solubles, especialmente aquellas que tienen una avidéz superior para CD80 que la del CTLA4 de tipo silvestre, como más capaces de bloquear el cebador de las células activadas específicas del antígeno que CTLA4Ig.

El documento WO 98/33513 describe moléculas mutantes CTLA4. En la secuencia de aminoácidos como se muestra en la figura 7 del documento WO 98/33513, el aminoácido en la posición 29 designado Xaa es preferentemente tirosina o alanina y el aminoácido en la posición 106 designado Yaa es preferentemente ácido glutámico.

Morton, *et al.* Journal of Immunology (1996) 156, 1047-1054 describe 10 mutantes CTLA4 discretos en los que uno o más restos de aminoácidos en el dominio extracelular de CTLA4 humano se han sustituido por alanina.

Sigue existiendo una necesidad de mejorar las moléculas CTLA4 para proveer mejores composiciones farmacéuticas para la supresión inmune y el tratamiento de cáncer que las formas solubles de CTLA4 previamente conocidas.

Sumario de la invención

De conformidad, la invención proporciona moléculas mutantes CTLA4 solubles que comprenden una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 y termina con ácido aspártico en la posición +124 como se muestra en la Figura 8, o que comienza con alanina en la posición -1 y termina con ácido aspártico en la posición +124 como se muestra en la Figura 8. Las moléculas mutantes de la invención incluyen aquellas que pueden reconocer y unirse a CD80, CD86, o ambas. En algunas realizaciones, las moléculas mutantes se unen a CD80 y/o CD86 con una afinidad mayor que CTLA4.

Un ejemplo de una molécula mutante CTLA4 es L104EIg (Figura 8), como se describe en este documento. L104EIg se une a CD80 y CD86 más fuertemente que CTLA4Ig.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el análisis de unión de equilibrio de L104EA29YIg, L104EIg y CTLA4Ig de tipo silvestre a CD86Ig.

Las Figuras 2A y 2B ilustran datos de los ensayos FACS que muestran la unión de L104EA29YIg, L104EIg y CTLA4Ig a las células CHO transfectadas con CD80 o CD86 humanas como se describe en el Ejemplo 2, posteriormente.

Las Figuras 3A y 3B describen la inhibición de la proliferación de las células CHO CD80 positivas y CD86 positivas como se describe en el Ejemplo 2, posteriormente.

Las Figuras 4A y 4B muestran que L104EA29YIg es más efectiva que CTLA4Ig en la inhibición de la proliferación de las células T aloestimuladas primarias y secundarias como se describe en el ejemplo 2, posteriormente.

Las Figuras 5A-C ilustran que L104EA29YIg es más efectiva que CTLA4Ig en la inhibición de la producción de citocina IL-2 (Fig. 5A), IL-4 (Fig. 5B), y γ -interferón (Fig. 5C) de células T humanas aloestimuladas como se describe en el Ejemplo 2, posteriormente.

La Figura 6 demuestra que L104EA29YIg es más efectiva que CTLA4Ig en la inhibición de la proliferación de células T de mono estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) como se describe en el Ejemplo 2, posteriormente.

La Figura 7 describe una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una molécula mutante CTLA4 (L104EA29YIg) que comprende un péptido de señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que inicia en metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o inicia en alanina en la posición -1 y termina en ácido aspártico en la posición +124; y una región Ig como se describe en el Ejemplo 1, posteriormente.

La Figura 8 describe una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una molécula mutante CTLA4 (L104EIg) que comprende un péptido de señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que inicia en metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o inicia en alanina en la posición -1 y termina en ácido aspártico en la posición +124; y una región Ig como se describe en el Ejemplo 1, posteriormente.

La Figura 9 describe una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una CTLA4 que tiene un péptido de señal; una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4 que inicia en metionina en la posición +1 a ácido aspártico en la posición +124, o que inicia en alanina en la posición -1 hacia el ácido aspártico en la posición +124; y en una región Ig.

Las Figuras 10A-C son un gel de SDS (Fig. 10A) para CTLA4Ig (línea 1), L104EIg (línea 2), y L104EA29YIg (línea 3A); y los cromatogramas de exclusión de tamaño de CTLA4Ig (Fig. 10B) y L104EA29YIg (Fig. 10C).

Las Figuras 11A y 11B ilustran un diagrama de banda del pliegue similar a V de Ig extracelular de CTLA4, generado a partir de la estructura de solución determinada por espectroscopía de RMN. La Figura 11B muestra una vista expandida de la región S25-R33 y la región MYPPPY indicando la localización y la orientación de la cadena lateral de las mutaciones de avidez mejorada, L104 y A29.

La Figura 12 describe un diagrama esquemático de un vector, pILN-LEA29Y, que tiene el inserto L104EA29YIg.

Descripción detallada de la invención

DEFINICIONES

Como se usa en esta solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

Como se usa en este documento "CTLA4 de tipo silvestre" tiene la secuencia de aminoácidos de CTLA4 de longitud completa, que se origina de manera natural (Patentes Estadounidenses N.º 5.434.131, 5.844.095, 5.851.795), o el dominio extracelular de las mismas, el cual se une a CD80 y/o CD86, y/o interfiere con CD80 y/o CD86 a partir de la unión de sus ligandos. En realizaciones particulares, el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre comienza con metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre comienza con alanina en la posición -1 y termina en ácido aspártico en la posición +124. La CTLA4 de tipo silvestre es una proteína de superficie celular, que tiene un dominio extracelular N-terminal, un dominio de la membrana, y un dominio citoplásmico C-terminal. El dominio extracelular se une a los antígenos objetivo, tales como CD80 y CD86. En una célula, la proteína CTLA4 de tipo nativa, que se origina de manera natural, se traduce como un polipéptido inmaduro, el cual incluye un péptido de señal en el extremo N-terminal. El polipéptido inmaduro se somete a un procesamiento post-traducciona, el cual incluye escisión y retirada del péptido señal para generar un producto escindido de CTLA4 que tiene un extremo N-terminal generado nuevamente que difiere del extremo N-terminal en la forma inmadura. Un experto en la técnica apreciará que puede ocurrir el procesamiento post-traducciona adicional, el cual retira uno o más de los aminoácidos a partir del extremo N-terminal generado nuevamente del producto escindido de CTLA4. La forma madura de la molécula CTLA4 incluye el dominio extracelular de CTLA4, o cualquier porción de esta, la cual se une a CD80 y/o CD86.

"CTLA4Ig" es una proteína de fusión soluble que comprende un dominio extracelular de CTLA4 de tipo nativo, o una porción de la misma que se une a CD80 y/o CD86, unida a un extremo Ig. Una realización particular comprende el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre que comienza con metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124; o comienza en alanina en la posición -1 a ácido aspártico en la posición +124; un resto de aminoácido de unión glutamina en la posición +125; y una porción de inmunoglobulina que abarca ácido glutámico en la posición +126 hasta lisina en la posición +357 (Figura 9).

Como se usa en este documento, una "proteína de fusión" se define como una o más secuencias de aminoácidos juntas unidas usando métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en la Patente Estadounidense No. 5.434.131 o 5.637.481. Las secuencias de aminoácidos unidas forman con ello una proteína de fusión.

Como se usa en este documento una "molécula mutante CTLA4" es una molécula que puede ser de CTLA4 de longitud completa o porciones de esta (derivados o fragmentos) que tienen una mutación o múltiples mutaciones en CTLA4 (de manera preferible en el dominio extracelular de CTLA4) así que esta es similar pero no idéntica en su longitud a la molécula CTLA4 de tipo nativo. Las moléculas mutantes CTLA4 se unen ya sea a CD80 o CD86, o ambas. Las moléculas CTLA4 mutantes pueden incluir una molécula no CTLA4 activa químicamente o biológicamente aquí o unida a esta. Las moléculas mutantes pueden ser solubles (por ejemplo, circulantes) o ligadas a una superficie. Las moléculas CTLA4 mutantes pueden incluir el dominio extracelular completo de CTLA4 o porciones de esta, es decir, fragmentos o derivados. Las moléculas CTLA4 mutantes pueden ser elaboradas sintéticamente o de manera recombinante.

Como se usa en este documento, el término "mutación" es un cambio en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de un polipéptido de tipo silvestre. En este caso, es un cambio en el dominio extracelular CTLA4 de tipo silvestre. El

cambio puede ser un cambio de aminoácido, el cual incluye sustituciones, supresiones, adiciones, o truncamientos. Una molécula mutante puede tener una o más mutaciones. Las mutaciones en una secuencia de nucleótidos pueden o no resultar en una mutación en la secuencia de aminoácidos como es bien entendido en la técnica. En ese aspecto, ciertos codones de nucleótidos codifican el mismo aminoácido. Los ejemplos incluyen codones de nucleótidos CGU, CGG, CGC, y CGA que codifican el aminoácido arginina (R); o codones GAU, y GAC que codifican el aminoácido, ácido aspártico (D). De este modo, una proteína puede ser codificada por una o más moléculas de ácido nucleico que difieren en su secuencia de nucleótidos específica, pero todavía codifican moléculas de proteína que tienen secuencias idénticas. La secuencia de codificación del aminoácido es como sigue:

Aminoácido	Símbolo	Símbolo de una Letra	Codones
Alanina	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cisteína	Cys	C	UGU, UGC
Ácido Aspártico	Asp	D	GAU, GAC
Ácido Glutámico	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUU, UUC
Glicina	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidina	His	H	CAU, CAC
Isoleucina	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lisina	Lys	K	AAA, AAG
Leucina	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAU, AAC
Prolina	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Arginina	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serina	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Treonina	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valina	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Triptofano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU, UAC

10 Como se usa en este documento "el dominio extracelular de CTLA4" es una porción de CTLA4 que reconoce y se une a CD80 y/o CD86. Por ejemplo, un dominio extracelular de CTLA4 comprende metionina en la posición +1 a ácido aspártico en la posición +124 (Figura 9). Como alternativa, un dominio extracelular de CTLA4 comprende alanina en la posición -1 a ácido aspártico en la posición +124 (Figura 9). El dominio extracelular incluye fragmentos o derivados de CTLA4 que se unen a CD80 y/o CD86.

15 Como se usa en este documento una "secuencia de proteína no CTLA4" o "molécula no CTLA4" se define como cualquier molécula que no se une a CD80 y/o CD86 y no interfiere con la unión de CTLA4 a su objetivo. Un ejemplo incluye, pero no se limita a, una región constante de inmunoglobulina (Ig) o porción de la misma. De manera preferible, la región constante Ig es una región constante Ig humana o de mono, es decir, humana C(gamma)1, que incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3. La región constante Ig se puede mutar para reducir sus funciones efectoras (Patentes Estadounidenses N.º 5.637.481; y 6.132.992).

20 Como se usa en este documento un "fragmento de una molécula mutante CTLA4" es una parte de una molécula mutante CTLA4, de manera preferible, el dominio extracelular de CTLA4 o una parte del mismo, que reconoce y se une a su objetivo, es decir, CD80 y/o CD86.

25 Como se usa en este documento un "derivado de una molécula mutante CTLA4" es una molécula que comparte al menos 70 % de la similitud de secuencia con y funciona como el dominio extracelular de CTLA4, es decir, reconoce y se une a CD80 y/o CD86.

30 Como se usa en este documento, una "porción de una molécula de CTLA4" incluye fragmentos y derivados de una molécula CTLA4 que se une a CD80 y/o CD86.

35 De manera que la invención aquí descrita pueda ser comprendida más completamente, se expone la siguiente descripción.

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

40 La presente invención proporciona moléculas mutantes CTLA4 solubles que reconocen y se unen a CD80 y/o CD86. En algunas realizaciones, las mutantes CTLA4 solubles tienen una avidéz superior hacia CD80 y/o CD86 que a CTLA4Ig.

45 Ejemplos de moléculas mutantes CTLA4 incluyen L104EA29YIg (L104EA29YIg no es una molécula mutante CTLA4 como se reivindica en la presente solicitud; Figura 7). La secuencia de aminoácidos de L104EA29YIg puede

comenzar en la alanina en la posición de aminoácido -1 y terminar en lisina en la posición de aminoácido +357. De manera alternativa, la secuencia de aminoácidos de L104EA29YIg puede empezar en la metionina en la posición +1 del aminoácido y terminar en lisina en la posición de aminoácido +357. La porción CTLA4 de L104EA29YIg abarca la metionina en la posición de aminoácido +1 hasta el ácido aspártico en la posición de aminoácido +124. L104EA29YIg comprende un resto de aminoácido de unión glutamina de en la posición +125 y una porción de inmunoglobulina que abarca ácido glutámico en la posición +126 a través de la lisina en la posición +357 (figura 7). L104EA29YIg se une aproximadamente 2 veces más fuertemente que CTLA4Ig de tipo silvestre (de aquí en adelante referida CTLA4Ig) a CD80 y aproximadamente 4 veces más fuertemente a CD86. Este unión más fuerte resulta en L104EA29YIg que es más eficaz que CTLA4Ig en el bloqueo de las respuestas inmunes.

Las moléculas mutantes CTLA4 comprenden al menos el dominio extracelular de CTLA4, o porciones de las mismas que se unen a CD80 y/o CD86. La porción extracelular de una molécula mutante CTLA4 comprende una secuencia de aminoácidos que se inicia con metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124 (Figura 8). De manera alternativa, la porción extracelular de la CTLA4 puede comprender una secuencia de aminoácidos que se inicia con alanina en la posición -1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (Figura 8).

En otra realización, la molécula mutante CTLA4 soluble es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA4 en el que la leucina en la posición +104 de CTLA4 de tipo silvestre está sustituida con ácido glutámico (codones: GAA, GAG). Una molécula mutante CTLA4 que tiene esta sustitución se refiere aquí como L104EIg (Figura 8).

La invención proporciona además una molécula mutante CTLA4 soluble que comprende un dominio extracelular de un mutante CTLA4 como se muestra en la Figura 8, o porción(es) de la misma, y una porción que altera la solubilidad, afinidad y/o valencia de la molécula mutante CTLA4.

De conformidad con una práctica de la invención, la porción puede ser una región constante de inmunoglobulina o porción de la misma. Para uso *in vivo*, se prefiere que la región constante de inmunoglobulina no provoque una respuesta inmune perjudicial en el sujeto. Por ejemplo, en protocolos clínicos, se puede preferir que las moléculas mutantes incluyan regiones constantes de inmunoglobulina de ser humano o mono. Un ejemplo de una región constante de inmunoglobulina adecuada es la humana C(gamma)1, que comprende las regiones bisagra, CH2 y CH3. Otros isotipos son posibles. Además, son posibles otras regiones constantes de inmunoglobulina (de manera preferible otras regiones constantes de inmunoglobulina débilmente o no inmunogénicas).

Otras porciones incluyen etiquetas de polipéptidos. Ejemplos de etiquetas adecuadas incluyen pero no se limitan a la molécula p97, molécula env gp120, molécula E7, y la molécula ova (Dash, B., *et al.* (1994) *J. Gen. Virol.* 75:1389-97; Ikeda, T., *et al.* (1994) *Gene* 138:193-6; Falk, K., *et al.* (1993) *Cell Immunol.* 150:447; Fujisaka, K. *et al.* (1994) *Virology* 204:789-93). Otras moléculas para usarse como etiquetas son posibles (Gerard, C. *et al.* (1994) *Neuroscience* 62:721-739; Byrn, R. *et al.* *J. Virol.* (1989) 63:4370-4375; Smith, D. *et al.*, (1987) *Science* 238:1704-1707; Lasky, L. (1996) *Science* 233:209-212).

La invención proporciona además proteínas de fusión CTLA4Ig mutantes solubles de manera preferente más reactivas con el antígeno CD80 y/o CD86 comparada con la CTLA4 de tipo silvestre.

En otra realización, la molécula mutante CTLA4 soluble incluye un resto de aminoácido de unión, que se localiza entre la porción CTLA4 y la porción de inmunoglobulina. La unión de aminoácido puede ser cualquier aminoácido, incluyendo glutamina. La unión de aminoácido se puede introducir por métodos de síntesis molecular o química conocidos en la técnica.

En otra realización, la molécula mutante CTLA4 soluble incluye la porción de inmunoglobulina (es decir, dominios de región bisagra, CH2 y CH3), donde cualquiera o todos los restos de cisteína, dentro del dominio de región bisagra de la porción de inmunoglobulina están sustituidos con serina, por ejemplo, las cisteínas en las posiciones +130, +136, o +139 (Figura 7 u 8). La molécula mutante puede incluir también la prolina en la posición +148 sustituida con una serina, como se muestra en la Figura 7 u 8.

La molécula mutante CTLA4 soluble puede incluir una secuencia de péptido de señal ligada al extremo N-terminal del dominio extracelular de la porción CTLA4 de la molécula mutante. El péptido de señal puede ser cualquier secuencia que permitirá la secreción de la molécula mutante, incluyendo el péptido de señal a partir de la oncostatina M (Malik, *et al.*, (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9:2847-2853), o CD5 (Jones, N. H. *et al.*, (1986) *Nature* 323:346-349), o el péptido de señal a partir de cualquier proteína extracelular.

La molécula mutante puede incluir el péptido de señal de oncostatina M ligado al extremo N-terminal del dominio extracelular de CTLA4, y la molécula de inmunoglobulina humana (es decir, región bisagra, CH2 y CH3) ligada al extremo C-terminal del dominio extracelular de CTLA4. Esta molécula incluye el péptido de señal de oncostatina M que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124, un resto de aminoácido de unión glutamina en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene ácido glutámico en la posición +126 a través de lisina en la posición +357.

Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención se pueden obtener por métodos de síntesis molecular o química. Los métodos moleculares pueden incluir los siguientes pasos: introducir una célula hospedadora adecuada con una molécula de ácido nucleico que expresa y codifica la molécula mutante CTLA4 soluble; cultivar la célula hospedadora así producida bajo condiciones que permiten a la célula hospedadora expresar las moléculas mutantes; y aislar las moléculas mutantes expresadas. La porción del péptido de señal de la molécula mutante permite a las moléculas de proteína ser expresadas sobre la superficie de la célula y ser secretadas por la célula hospedadora. Las moléculas mutantes traducidas pueden someterse a modificación post-traduccional, que implica la escisión del péptido de señal para producir una proteína madura que tiene las porciones CTLA4 y la inmunoglobulina. La escisión puede suceder después de la alanina en la posición -1, resultando en una molécula madura mutante que tiene metionina en la posición +1 como el primer aminoácido (Figura 8). De manera alternativa, la escisión puede suceder después de la metionina en la posición -2, resultando en una molécula mutante madura que tiene alanina en la posición -1 como el primer aminoácido.

Una molécula mutante de la invención es una molécula mutante CTLA4 soluble que tiene el dominio extracelular de CTLA4 humano ligado a la molécula inmunoglobulina humana (por ejemplo, región bisagra, CH2 y CH3). Esta molécula incluye la porción de la secuencia de aminoácidos que codifica CTLA4 comenzando con metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124, un resto de aminoácido de unión glutamina en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene ácido glutámico en la posición +126 hasta lisina en la posición +357. La porción que tiene el dominio extracelular de CTLA4 es mutada de manera que la leucina en la posición +104 es sustituida con ácido glutámico. La porción de región bisagra de la molécula mutante se muta de manera que las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 están sustituidas con serina, y la prolina en la posición +148 está sustituida con serina. Esta molécula mutante se designa en este documento como L104EIg (Figura 8).

Como alternativa, una realización de L104EIg es una molécula mutante CTLA4 soluble que tiene un dominio extracelular de CTLA4 humano ligado a una molécula inmunoglobulina humana (es decir, región bisagra, CH2 y CH3). Esta molécula preferida incluye la porción de CTLA4 que abarca una secuencia de aminoácidos empezando con alanina en la posición -1 hasta ácido aspártico en la posición +124, un resto de aminoácido de unión glutamina en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca el ácido glutámico en la posición +126 a través de lisina en la posición +357. La porción que tiene el dominio extracelular de CTLA4 es mutada de manera que la leucina en la posición +104 es sustituida con ácido glutámico. La porción de región bisagra de la molécula mutante es mutada de manera que las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 son sustituidas con serina, y la prolina en la posición +148 es sustituida con serina. Esta molécula mutante se designa en este documento como L104EIg (Figura 8).

Además, la invención proporciona además moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos correspondientes a las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención. En una realización, la molécula de ácido nucleico es un ADN (es decir, ADNc) o un híbrido de la misma. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico son ARN o un híbrido de la misma.

Adicionalmente, la invención proporciona un vector, el cual comprende las secuencias de nucleótidos de la invención. Se proporciona también un sistema de vector hospedador. El sistema de vector hospedador comprende el vector de la invención en una célula hospedadora adecuada. Ejemplos de células hospedadoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células procarióticas y eucarióticas.

La invención incluye composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de enfermedades del sistema inmune que comprenden cantidades efectivas farmacéuticamente de las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención. En ciertas realizaciones, las enfermedades del sistema inmune son mediadas por interacciones de células CD28- y/o CTLA4-positivas con células positivas CD80 y/o CD86. En realizaciones preferidas, las moléculas mutantes CTLA4 solubles tienen la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la Figura 8 (L104E). Las composiciones pueden incluir adicionalmente otros agentes terapéuticos, incluyendo, pero no limitado a, toxinas de fármacos, enzimas, anticuerpos, o conjugados.

Las composiciones farmacéuticas también incluyen preferiblemente portadores adecuados y adyuvantes los cuales incluyen cualquier material, que cuando se combina con la molécula de la invención (por ejemplo, una molécula mutante CTLA4 soluble, tal como L104E) retiene la actividad de la molécula y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto. Ejemplos de portadores y adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero humano; intercambiadores iónicos; alúmina; lecitina; substancias tamponantes, tales como fosfatos; glicina; ácido sórbico; sorbato de potasio; y sales o electrolitos, tal como sulfato de protamina. Otros ejemplos incluyen cualquiera de los portadores farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato; agua; emulsiones, tal como emulsión agua/aceite; y varios tipos de agentes humectantes. Otros portadores pueden también incluir soluciones estériles; comprimidos, que incluyen comprimidos revestidos y cápsulas. De manera típica, algunos portadores contienen excipientes tal como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Tales portadores pueden también incluir aditivos de sabor y color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales portadores son formuladas por métodos convencionales

bien conocidos. Tales composiciones se pueden formular también dentro de varias composiciones de lípidos, tales como, por ejemplo, liposomas así como también en varias composiciones poliméricas, tales como, microesferas de polímero.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar usando modos convencionales de administración incluyendo, pero no limitado a, administración intravenosa (i.v.), administración intraperitoneal (i.p.) administración intramuscular (i.m.), administración subcutánea, administración oral, administración como un supositorio, o como un contacto tópico, o la implantación al sujeto de un dispositivo de liberación lenta tal como una bomba miniosmótica.

10 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser de varias formas de dosificación, las cuales incluyen, pero no se limitan a, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusionables. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

15 El modo más eficaz de administración y el régimen de dosificación para las composiciones de esta invención depende de la gravedad y curso de la enfermedad, la salud del paciente y respuesta al tratamiento y el criterio del médico tratante. En consecuencia, las dosificaciones de las composiciones se deben valorar para el paciente individual.

20 Las moléculas mutantes CTLA4 solubles se pueden administrar a un sujeto en una cantidad y por un tiempo (por ejemplo, longitud del tiempo y/o tiempos múltiples) suficiente para bloquear la unión de moléculas B7 endógenas (por ejemplo, CD80 y/o CD86) a sus respectivos ligandos en el sujeto. El bloqueo de unión de ligando/B7 endógeno inhibe con ello, las interacciones entre las células B7 positivas (por ejemplo, células CD80 y/o CD86 positivas) con células CD28 y/o CTLA4 positivas. La dosificación de un agente terapéutico depende de muchos factores incluyendo, pero no limitado a, el tipo de tejido afectado, el tipo de enfermedad autoinmune que se trata, la gravedad de la enfermedad, la salud del sujeto, y una respuesta del sujeto al tratamiento con los agentes. En consecuencia, las dosificaciones de los agentes pueden variar dependiendo del sujeto y el modo de administración. Las moléculas mutantes CTLA4 solubles se pueden administrar en una cantidad entre 0,1 y 20,0 mg/kg de peso del paciente/día, de manera preferible, entre 0,5 y 10,0 mg/kg/día. La administración de las composiciones farmacéuticas de la invención se puede realizar sobre varias veces. En una realización, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar durante una o más horas. Además, la administración se puede repetir dependiendo de la gravedad de la enfermedad así como otros factores como se entiende en la técnica.

35 La invención proporciona además métodos para producir una molécula mutante CTLA4 de la invención que comprende el crecimiento del sistema de vector hospedador de la invención para así producir la proteína en el hospedador y recuperar la proteína así producida.

40 De manera adicional, la invención proporciona métodos para la regulación las interacciones de las células T positivas CTL4 y CD28 funcionales con células CD80 y/o CD86 positivas. Los métodos comprenden poner en contacto las células CD80 y/o CD86 positivas con una molécula mutante CTLA4 soluble de la invención para formar complejos CTLA4/CD80 mutantes y/o CTLA4/CD86 mutantes, interfiriendo los complejos con la reacción del antígeno CTLA4 endógeno con CD80 y/o CD86, y/o interfiriendo los complejos con la reacción del antígeno CD28 endógeno con CD80 y/o CD86. En una realización, la molécula mutante CTLA4 soluble comprende: una primer secuencia de aminoácidos que incluye el dominio extracelular de CTLA4 a partir de la secuencia de aminoácidos que tiene metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124, incluyendo al menos una mutación; y una segunda secuencia de aminoácidos que incluye las regiones de bisagra, CH2 y CH3 de la molécula inmunoglobulina humana gamma 1 (Figura 8).

50 Se espera que las moléculas mutantes CTLA4 solubles presenten propiedades inhibitoras *in vivo*. En condiciones en las que las interacciones de las células T/células APC, por ejemplo, interacciones de las células T/células B, ocurren como un resultado del contacto entre células T y células APC, la unión de moléculas mutantes CTLA4 introducidas para reaccionar a células CD80 y/o CD86 positivas, por ejemplo células B, puede interferir, es decir, inhibir, las interacciones de células T/células APC que resultan en la regulación de respuestas inmunes.

55 La invención proporciona métodos para la regulación negativa de las respuestas inmunes. La regulación negativa de una respuesta inmune por moléculas mutantes CTLA4 solubles puede ser por medio de la inhibición o el bloqueo de una respuesta inmune ya en progreso o puede involucrar prevenir la inducción de una respuesta inmune. Las moléculas CTLA4 solubles de la invención pueden inhibir las funciones de las células T activadas, tal como la proliferación de linfocitos T y secreción de citocina, suprimiendo las respuestas de las células T o induciendo la tolerancia específica en las células T, o ambas.

60 La presente invención proporciona métodos adicionales para tratar enfermedades del sistema inmune e inducción de tolerancia. En realizaciones particulares, las enfermedades del sistema inmune son mediadas por las interacciones de células positivas CTLA4 y/o CD28 con células positivas CD80/CD86. En una realización adicional, se inhiben las interacciones de células T. Las enfermedades del sistema inmune incluyen, pero no se limitan a, enfermedades

autoinmunes, enfermedades inmunoproliferativas, y trastornos relacionados con injertos. Estos métodos comprenden administrar a un sujeto las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención para regular las interacciones de las células T con las células CD80 y/o CD86 positivas. De manera alternativa, se puede administrar un híbrido mutante CTLA4 que tiene una glicoproteína de membrana unida a una molécula mutante CTLA4.

5 Ejemplos de enfermedades relacionadas con injertos incluyen enfermedad del hospedador contra injerto (GVHD) (por ejemplo, tal como puede resultar del trasplante de médula ósea, o en la inducción de tolerancia), trastornos inmunes asociados con el rechazo al trasplante de injerto, rechazo crónico, y alo o xenoinjertos de tejido o células, que incluyen órganos sólidos, piel, islotes, músculos, hepatocitos, neuronas. Ejemplos de enfermedades inmunoproliferativas incluyen, pero no se limitan a, psoriasis; linfoma de célula T; leucemia linfoblástica aguda de

10 célula T; linfoma de célula T angiocéntrico testicular; angitis linfocítica benigna; y enfermedades autoinmunes tales como lupus (por ejemplo, lupus eritematoso, nefritis lúpica), tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, enfermedad de Addison, diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus dependiente de la insulina, diabetes mellitus tipo I), síndrome de Goodpasture, miastenia grave, pénfigo, enfermedad de Crohn, oftalmía simpática, uveítis autoinmune, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis de acción crónica, colitis ulcerante, síndrome de Sjogren, enfermedades reumáticas (es decir, artritis reumatoide), polimiositis, escleroderma, y enfermedades mixtas del tejido conectivo.

La presente invención proporciona además un método para inhibir rechazos de trasplantes de un órgano y/o de tejido sólido por un sujeto, siendo el sujeto un receptor de trasplante de tejido. De manera típica, en trasplantes de tejido, el rechazo del injerto se inicia a través de su reconocimiento como ajeno a células T, seguido por una respuesta inmune que destruye el injerto. Las moléculas mutantes solubles CTLA4 de esta invención, inhibiendo la proliferación de linfocitos T y/o la secreción de citocinas, pueden resultar en la destrucción reducida de tejido e inducción de la insensibilidad de la célula T específica del antígeno puede resultar en una aceptación del injerto de

20 larga duración sin la necesidad de generalizar la inmunosupresión. Además, las moléculas mutantes solubles CTLA4 de la invención se pueden administrar con otros farmacéuticos que incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides, ciclosporina, rapamicina, mofetil micofenolato, azatioprina, tacrolimus, basiliximab y/u otros productos biológicos.

La presente invención proporciona también métodos para inhibir la enfermedad de injerto contra hospedador en un sujeto. Este método comprende la administración al sujeto de una molécula mutante CTLA4 soluble de la invención, sola o en conjunto con ligandos adicionales, reactiva con IL-2, IL4, o γ -interferón. Por ejemplo, una molécula mutante CTLA4 soluble de esta invención se puede administrar a un receptor de trasplante de médula ósea para inhibir la alorreactividad de las células T del donante. De manera alternativa, las células T del donante con un injerto de

30 médula ósea se pueden tolerar a los aloantígenos del receptor *ex vivo* previo al trasplante.

La inhibición de las respuestas de las células T por moléculas mutantes CTLA4 solubles, puede ser también útil para tratar alteraciones autoinmunes. Muchos de los trastornos autoinmunes resultan de la activación inapropiada de células T que son reactivas contra autoantígenos, y las cuales promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos que están involucrados en la patología de la enfermedad. La administración de una molécula mutante CTLA4 soluble en un sujeto que padece o es susceptible a un trastorno autoinmune puede prevenir la activación de células T autorreactivas y puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. Este método puede comprender también la administración al sujeto de una molécula mutante CTLA4 soluble de la invención, sola o en conjunto, con ligandos adicionales, reactiva con IL-2, IL-4, o γ -interferón.

40

La invención además abarca el uso de las moléculas mutantes CTLA4 solubles junto con otros inmunosupresores, por ejemplo, ciclosporina (véase Mathiesen, en: "Prolonged Survival and Vascularization of Xenografted Human Glioblastoma Cells in the Central Nervous System of Cyclosporin A-Treated Rats" (1989) *Cancer Lett* 44:151-156), prednisona, azatioprina, y metotrexato (R. Handschumacher "Chapter 53: Drugs Used for Immunosuppression" páginas 1264-1276). Son posibles otros inmunosupresores. Por ejemplo, para el tratamiento de la artritis reumatoide, las moléculas mutantes CTLA4 solubles se pueden administrar con productos farmacéuticos incluyendo, pero no limitado a, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos/inhibidores Cox-2, metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazoprina, sales de oro, etanercept, infliximab, anakinra, azatioprina, y/u otros productos biológicos como anti-TNF. Para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico, las moléculas mutantes CTLA4 solubles se pueden administrar con productos farmacéuticos incluyendo, pero no limitado a, corticosteroides, citoxano, azatioprina, hidroxicloroquina, mofetil micofenolato, y/u otros productos biológicos. Además, para el tratamiento de esclerosis múltiple, las moléculas mutantes CTLA4 solubles se pueden administrar con productos farmacéuticos incluyendo, pero no limitado a, corticosteroides, interferón beta-1a, interferón beta-1b, acetato de glatirámico, clorhidrato de mitoxantrona, y/u otros productos biológicos.

55

Las moléculas mutantes CTLA4 solubles se pueden usar también en combinación con uno o más de los siguientes agentes para regular una respuesta inmune: gp39 soluble (conocido también como ligando CD40 (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), CD29 soluble, CD40 soluble, CD80 soluble, CD86 soluble, CD28 soluble, CD56 soluble, Thy-1 soluble, CD3 soluble, TCR soluble, VLA-4 soluble, VCAM-1 soluble, LECAM-1 soluble, ELAM-1 soluble, CD44 soluble, anticuerpos reactivos con gp39, anticuerpos reactivos con CD40, anticuerpos reactivos con B7, anticuerpos reactivos con CD28, anticuerpos reactivos con LFA-1 anticuerpos reactivos con LFA-2, anticuerpos reactivos con IL-2, anticuerpos reactivos con IL-12, anticuerpos reactivos con IFN-gamma, anticuerpos reactivos con CD2,

65

anticuerpos reactivos con CD48, anticuerpos reactivos con cualquier ICAM (por ejemplo, ICAM-2), anticuerpos reactivos con CTLA4, anticuerpos reactivos con Thy-1, anticuerpos reactivos con CD56, anticuerpos reactivos con CD3, anticuerpos reactivos con CD29, anticuerpos reactivos con TCR, anticuerpos reactivos con VLA-4, anticuerpos reactivos con VCAM-1, anticuerpos reactivos con LECAM-1, anticuerpos reactivos con ELAM-1, anticuerpos reactivos con CD44. En ciertas realizaciones, se prefieren los anticuerpos monoclonales. En otras realizaciones, se prefieren los fragmentos de anticuerpos. Como personas expertas en la técnica fácilmente entenderán, la combinación puede incluir las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención y otro agente inmunosupresor, las moléculas mutantes CTLA4 solubles con otros dos agentes inmunosupresores, las moléculas mutantes CTLA4 solubles con otros tres agentes inmunosupresores, etc. La determinación de la combinación óptima y dosificaciones se puede determinar y optimizar usando métodos bien conocidos en la técnica.

Las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención se pueden administrar como el único principio activo o en conjunto con otros fármacos en regímenes inmunomodulantes u otros agentes anti-inflamatorios, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios o autoinmunes o de rechazo a alo- o xenoinjertos agudo o crónico, o para inducir la tolerancia. Por ejemplo, se puede usar en combinación con un inhibidor de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina A o FK506; un macrólido inmunosupresor, por ejemplo, rapamicina o derivado de la misma; es decir, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, un agente buscador del linfocito, por ejemplo, FTY720 o un análogo del mismo; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; leflunomida o un análogo de los mismos; mizoribina; ácido micofenólico; mofetil micofenolato; 15-desoxiespergualina o un análogo de los mismos; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales para receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD 11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB o sus ligandos; u otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo, CTLA4/CD28-Ig, u otros inhibidores de adhesión molecular, por ejemplo, mAbs o inhibidores de peso molecular bajo que incluyen antagonistas LFA-1, antagonistas de Selectina y antagonistas de VLA-4. El compuesto es particularmente útil en combinación con un compuesto que interfiere con CD40 y su ligando, por ejemplo, anticuerpos a CD40 y anticuerpos a CD40-L, por ejemplo, en las indicaciones descritas anteriormente, por ejemplo, la inducción de tolerancia.

Donde las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención se administran en conjunción con otras terapias inmunosupresoras/inmunomoduladoras o anti-inflamatorias, por ejemplo, como se especifica anteriormente, dosificaciones del compuesto inmunosupresor, inmunomodulador o anti-inflamatorio co-administrado variarán por supuesto dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, por ejemplo, si este es un esteroide o una ciclosporina, del fármaco específico empleado, de la condición para tratar y así sucesivamente.

MÉTODOS PARA PRODUCIR LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

La expresión de las moléculas mutantes CTLA4 puede ser en células procarióticas. Los procariotas más frecuentemente están representados por varias cepas de bacterias. La bacteria puede ser una gram positiva o una gram negativa. Normalmente, se prefieren bacterias gram-negativas tales como *E. coli*. Pueden usarse también otras cepas microbianas.

Las secuencias que codifican moléculas mutantes CTLA4 pueden ser insertadas en un vector designado para expresar secuencias ajenas en células procarióticas tales como *E. coli*. Estos vectores pueden incluir secuencias de control procarióticas comúnmente usadas, que se define aquí que incluyen promotores para inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de sitios de unión a ribosomas, incluyen tales promotores comúnmente usados como los sistemas promotores beta-lactamasa (penicilinas) y lactosa (*lac*) (Chang, *et al.*, (1977) *Nature* 198:1056), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, *et al.*, (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057) y el promotor P_L derivado de lambda y el sitio de unión del ribosoma del gen N. (Shimatake, *et al.*, (1981) *Nature* 292:128).

Tales vectores de expresión también incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables, tales como un gen de beta-lactamasa o neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a antibióticos, de manera que los vectores pueden replicarse en bacterias y células que llevan los plásmidos pueden seleccionarse cuando crecen en la presencia de antibióticos, tales como ampicilina o kanamicina.

El plásmido de expresión puede ser introducido en células procarióticas por varios métodos convencionales, incluyendo pero no limitado a choque de CaCl₂ (Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110, y Sambrook *et al.* (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press, (1989)) y electroporación.

De conformidad con la práctica de la invención, las células eucarióticas son también células hospedadoras adecuadas. Ejemplos de células eucarióticas incluyen cualquier célula animal, sea primaria o inmortalizada, de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*), y células de plantas. El mieloma, las células COS y CHO, son ejemplos de células animales que pueden usarse como hospedadores. Las células CHO particulares incluyen pero no se limitan a, DG44 (Chasin, *et al.*, 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909), CHO-K1 (ATCC N.º CCL-61), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designado ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), CHO clon 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clon B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designado ECACC 93061607 (CAMR,

Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), y RR-CHOK1 designado ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido). Células ejemplares de plantas incluyen células de tabaco (plantas completas, cultivo celular o callos), maíz, soja y arroz. Son también aceptables semillas de maíz, soja y arroz.

5 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas mutantes CTLA4 pueden también ser insertadas en un vector diseñado para expresar las secuencias ajenas en un hospedador eucariótico. Los elementos reguladores del vector pueden variar de conformidad con el hospedador eucariótico particular.

10 Las secuencias de control eucariótico comúnmente usadas para uso en los vectores de expresión incluyen secuencias promotoras y de control compatibles con células de mamífero tal como por ejemplo, promotor CMV (vector CDM8) y virus de sarcoma de ave (ASV) (vector π LN). Otros promotores comúnmente usados incluyen los promotores temprano y tardío de Virus de Simio 40 (SV40) (Fiers, *et al.*, (1973) Nature 273:113), o pueden también usarse otros promotores virales tales como aquellos derivados de polioma, Adenovirus 2, y virus de papiloma bovino. También puede usarse un promotor inducible, tal como hMTII (Karin, *et al.*, (1982) Nature 299:797-802).

15 Los vectores para expresar moléculas mutantes CTLA4 en eucariotas pueden también llevar secuencias llamadas regiones potenciadoras. Estas son importantes en la optimización de la expresión del gen y se encuentran ya sea corriente arriba o corriente abajo de la región promotora.

20 Ejemplos de vectores de expresión para células hospedadoras eucarióticas incluyen, pero no se limitan a, vectores para células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); Vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene)), vectores retrovirales (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), formas pCADN-3 (Invitrogen) o modificadas de los mismos, vectores adenovirales; vectores de virus adeno-asociados, vectores de baculovirus, vectores de levaduras (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)).

25 Las secuencias de ácido nucleico que codifican moléculas mutantes CTLA4 pueden integrarse en el genoma de la célula hospedadora eucariótica y replicarse como se replica el genoma hospedador. Como alternativa, el vector que lleva las moléculas mutantes CTLA4 puede contener orígenes de replicación lo que permite la replicación extracromosómica.

30 Para expresar las secuencias de ácido nucleico en *Saccharomyces cerevisiae*, el origen de la replicación del plásmido de levadura endógeno, se puede usar el círculo 2 μ . (Broach, (1983) Meth. Enz. 101:307). Como alternativa, se pueden usar secuencias a partir del genoma de levadura capaz de promover la replicación autónoma (véase, por ejemplo, Stinchcomb *et al.*, (1979) Nature 282:39; Tschemper *et al.*, (1980) Gene 10:157; y Clarke *et al.*, (1983) Meth. Enz. 101:300).

35 Las secuencias de control transcripcional para los vectores de levadura incluyen promotores para la síntesis de enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149; Holland *et al.*, (1978) Biochemistry 17:4900). Los promotores adicionales conocidos en la técnica incluyen el promotor CMV proporcionado en el vector CDM8 (Toyama y Okayama, (1990) FEBS, 268:217-221); el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, (1980) J. Biol. Chem. 255:2073), y aquellos para otras enzimas glicolíticas.

40 Otros promotores son inducibles debido a que pueden ser regulados por el estímulo ambiental o el medio de crecimiento de las células. Estos promotores inducibles incluyen aquellos de los genes para proteínas de choque térmico, alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas asociadas con catabolismo de nitrógeno, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

45 Las secuencias reguladoras pueden también ser colocadas en el extremo 3' de las secuencias codificantes. Estas secuencias pueden actuar para estabilizar el ARN mensajero. Tales terminadores se encuentran en la región no traducida 3' después de las secuencias codificantes en varios genes de mamíferos y derivados de levaduras.

50 Vectores ejemplares para plantas y células de plantas incluyen, pero no se limitan a, plásmidos T_i de *Agrobacterium*, virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y virus del mosaico dorado del tomate (TGMV).

55 Aspectos generales de las transformaciones del sistema hospedador de células de mamíferos se han descrito por Axel (Patente Estadounidense N.º 4.399.216 publicada el 16 de Agosto de 1983). Las células de mamífero pueden ser transformadas por métodos que incluyen pero no se limitan a, la transfección en la presencia de fosfato de calcio, microinyección, electroporación, o mediante transducción con vectores virales.

60 Los métodos para introducir secuencias de ADN ajenas en genomas de levadura y plantas incluyen (1) métodos mecánicos, tales como microinyección de ADN en células únicas o protoplastos, agitación vorticial de células con perillas de cristal en la presencia de ADN, o disparo de tungsteno revestido con ADN o esferas doradas en células o protoplastos; (2) introducir el ADN haciendo a las membranas celulares permeables a las macromoléculas a través del tratamiento de polietilenglicol o sujeción a pulsos eléctricos de alta tensión (electroporación); o (3) el uso de liposomas (que contienen ADNc) los cuales se fusionan a las membranas celulares.

65

La expresión de las moléculas mutantes CTLA4 puede ser detectada por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las moléculas mutantes pueden ser detectadas por geles SDS-PAGE teñidos con Commassie e inmunotransferencia usando anticuerpos que se unen a CTLA4. La recuperación de la proteína se puede realizar usando medios de purificación de proteína convencional, por ejemplo, cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico, para proporcionar el producto substancialmente puro (R. Scopes in: "Protein Purification, Principles and Practice", Tercera Edición, Springer-Verlag (1994)).

La invención además proporciona moléculas mutantes CTLA4 solubles producidas anteriormente en el presente documento.

MUTAGÉNESIS A BASE DE CODONES CTLA4Ig

En una realización, la mutagénesis dirigida al sitio y un nuevo procedimiento de selección se usaron para identificar varias mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4 que mejoran la avidéz de unión para CD86. En esta realización, las mutaciones se llevaron a cabo en residuos en las regiones del dominio extracelular de CTLA4 a partir de serina 25 a arginina 33, la hebra C' (alanina 49 y treonina 51), la hebra F (lisina 93, ácido glutámico 95 y leucina 96), y en la región de la metionina 97 a través de la tirosina 102, tirosina 103 hasta glicina 107 y en la hebra G en las posiciones de glutamina 111, tirosina 113 e isoleucina 115. Estos sitios se seleccionaron basados en estudios de proteínas de fusión CTLA4/CD28 quiméricas (Peach *et al.*, J. Exp. Med., 1994, 180:2049-2058), y en un modelo que predice qué cadenas laterales de restos de aminoácidos se expondrían a disolvente, y una carencia de identidad de resto de aminoácido u homología en ciertas posiciones entre CD28 y CTLA4. También, cualquier residuo que está espacialmente en proximidad cercana (5 a 20 Unidades Angstrom), a los residuos identificados es considerado parte de la presente invención.

Para sintetizar y seleccionar moléculas mutantes CTLA4 solubles con afinidades alteradas para CD80 y/o CD86, se adoptó una estrategia de dos pasos. Los experimentos traen consigo primero la generación de una biblioteca de mutaciones a un codón específico de una porción extracelular de CTLA4 y después seleccionar estos por análisis BIAcore para identificar mutantes con reactividad alterada a CD80 o CD86. El sistema de ensayo Biacore (Pharmacia, Piscataway, N.J.), usa un sistema detector de resonancia de plasmón superficial que involucra esencialmente unión covalente de ya sea CD801g o CD861g a un chip sensor revestido de dextrano, que está localizado en un detector. La molécula de prueba puede entonces ser inyectada en la cámara que contiene el chip sensor y la cantidad de proteína complementaria que se une puede ser valorada basada en el cambio en la masa molecular que está físicamente asociada con el lado revestido de dextrano del chip sensor; el cambio en la masa molecular puede ser medido por el sistema detector.

Ventajas de la invención

Debido a que CTLA4 que se une a CD80 y CD86 está caracterizado por velocidades rápidas "de asociación" y velocidades de disociación rápida, y debido a que los complejos CTLA4Ig-CD86 se disocian aproximadamente 5 a 8 veces más rápidamente que los complejos CTLA4Ig-CD80, se razona que disminuyendo la velocidad de disociación de CTLA4Ig a partir de CD80 y/o CD86, podría resultar en moléculas con propiedades inmunosupresoras más potentes. De este modo, se espera que las moléculas mutantes CTLA4 solubles que tienen una avidéz superior para células CD80 o CD86 positivas comparadas con la CTLA4 de tipo silvestre, o formas no mutadas de CTLA4Ig, bloqueen el cebado de las células activadas específicas del antígeno con eficiencia superior que CTLA4 de tipo silvestre o formas no mutadas de CTLA4Ig.

Además, los costes de producción para CTLA4Ig son muy altos. Las moléculas CTLA4Ig mutantes de alta avidéz que tienen propiedades inmunosupresoras potentes superiores pueden ser usadas en la clínica, a dosis considerablemente más bajas que las CTLA4Ig no mutadas, para lograr niveles similares de inmunosupresión. De este modo, las moléculas mutantes CTLA4 solubles pueden ser muy rentables.

Los siguientes ejemplos están presentados para ilustrar la presente invención y para asistir a un experto habitual en la elaboración y uso de la misma. No se pretende que los ejemplos en forma alguna limiten otro modo el ámbito de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Este ejemplo proporciona una descripción de los métodos usados para generar las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas mutantes CTLA4 solubles de la invención. Se generó un mutante L104EIg de sitio único y se sometió a prueba para cinética de unión para CD80 y/o CD86. La secuencia de nucleótidos L104EIg se usó como una plantilla para generar la secuencia CTLA4 mutante de doble sitio, L104EA29YIg, la cual se sometió a prueba para cinética de unión para CD80 y/o CD86.

Mutagénesis Basada en el Codón CTLA4Ig:

Se desarrolló una estrategia de mutagénesis y selección para identificar moléculas CTLA4Ig mutantes que tenían velocidades más lentas de disociación de moléculas CD80 y/o CD86. Se generaron secuencias de nucleótidos mutantes de un solo sitio usando CTLA4Ig (Patentes Estadounidenses N.º: 5.844.095; 5.851.795; y 5.885.796; ATCC N.º de Referencia 68629) como una plantilla. Los cebadores de PCR de oligonucleótido mutagénico se diseñaron para mutagénesis aleatoria de un codón de ADNc específico permitiendo cualquier base en las posiciones 1 y 2 del codón, pero solamente guanina o timina en la posición 3 (XXG/T; también conocida como NNG/T). De esta manera, un codón específico que codifica un aminoácido podría ser aleatoriamente mutado para codificar cada uno de los 20 aminoácidos. En tal sentido, la mutagénesis XXG/T proporciona 32 codones potenciales que codifican cada uno de los 20 aminoácidos. Los productos de PCR que codifican mutaciones en proximidad cercana a -M97-G107 de CTLA4Ig (véase Figura 7 u 8), se digirieron con SacI/XbaI y se subclonaron en vectores de expresión CTLA4Ig π LN de corte similar. Este método se usó para generar la molécula mutante CTLA4 de un solo sitio L104EIg (Figura 8).

Para mutagénesis en proximidad a S25-R33 de CTLA4Ig, se introdujo primero un sitio de restricción NheI silente, 5' de este bucle, por mutagénesis dirigida al cebador de PCR. Los productos de PCR se digirieron con NheI/XbaI y se subclonaron en vectores de expresión L104EIg o CTLA4Ig de corte similar. Este método se usó para generar la molécula mutante CTLA4 de doble sitio L104EA29YIg (Figura 7). En particular, la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula mutante CTLA4 de un solo sitio, L104EIg, se usó como una plantilla para generar la molécula mutante CTLA4 de doble sitio, L104EA29YIg. El vector pILN que tiene el L104EA29YIg se muestra en la Figura 12.

EJEMPLO 2

Lo siguiente proporciona una descripción de los métodos de selección usados para identificar los polipéptidos CTLA4 mutantes de un solo y doble sitio, expresados a partir de las construcciones descritas en el Ejemplo 1, que presentaron una avidéz de unión superior para los antígenos CD80 y CD86, comparados con las moléculas CTLA4Ig no mutadas.

Los estudios actuales *in vitro* e *in vivo*, indican que el CTLA4Ig por sí mismo, es incapaz de bloquear completamente el cebado de las células T activadas específicas del antígeno. Los estudios *in vitro* con CTLA4Ig y ya sea anticuerpo monoclonal específico para CD80 o CD86 que mide la inhibición de la proliferación de las células T, indican que el anticuerpo monoclonal anti-CD80 no aumentó la inhibición de CTLA4Ig. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal anti-CD86 aumentó la inhibición, indicando que el CTLA4Ig no fue tan eficaz al bloquear las interacciones CD86. Estos datos apoyan hallazgos recientes por Linsley *et al.* (Immunity, (1994), 1:793-801) que muestran que la inhibición de las respuestas celulares mediadas por CD80 requiere aproximadamente 100 veces menores concentraciones de CTLA4Ig que para las respuestas mediadas por CD-86. Basados en estos hallazgos, se deduce que las moléculas mutantes CTLA4 solubles que tienen una avidéz superior para CD86 que para CTLA4 de tipo silvestre, deben ser mejor capaces de bloquear el cebado de las células activadas específicas del antígeno que CTLA4Ig.

Para este fin, las moléculas mutantes CTLA4 solubles descritas en el Ejemplo 1 anterior, se seleccionaron usando un procedimiento de selección nuevo para identificar varias mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4 que mejoran la avidéz de unión para CD80 y CD86. Esta estrategia de selección proporcionó un método eficaz para identificar mutantes directamente con velocidades "de disociación" aparentemente más lentas sin la necesidad para la purificación o cuantificación de la proteína, puesto que la determinación de la velocidad "de disociación" es independiente de la concentración (O'Shannessy *et al.*, (1993) Anal. Biochem., 212:457-468).

Las células COS se transfectaron con ADN de plásmido purificado de minipreparación individual y se propagaron durante varios días. Se aplicó medio de cultivo acondicionado tres días a los chips biosensores BIAcore (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) revestido con CD801g o CD861g soluble. La unión específica y disociación de proteínas mutantes se midió por la resonancia de plasmón superficial (O'Shannessy, D. J., *et al.*, (1993) Anal. Biochem. 212:457-468). Todos los experimentos se procesaron en biosensores BIAcore™ o BIAcore™ 2000 a 25 °C. Los ligandos se inmovilizaron en chips sensores NCM5 de grado de investigación (Pharmacia) usando acoplamiento N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimidN-hidroxisuccinimida (Johnsson, B., *et al.* (1991) Anal. Biochem. 198:268-277; Khilko, S.N., *et al.* (1993) J. Biol. Chem 268:5425-15434).

Método de Selección

Células COS que crecen en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos se transfectaron temporalmente con ADN que codifica CTLA4Ig mutante. El medio de cultivo que contiene el CTLA4Ig mutante soluble secretado se recogió 3 días después.

El medio de cultivo de células COS acondicionadas se dejó fluir sobre chips biosensores BIAcore derivados con CD861g o CD801g (como se describe en Greene *et al.*, 1996 J. Biol. Chem. 271:26762-26771), y moléculas mutantes se identificaron con velocidades "de asociación" más lentas que las observadas para el CTLA4Ig de tipo silvestre. El ADNc que corresponde a las muestras del medio seleccionado fue secuenciado y el ADN se preparó para realizar la

transfección temporal de células COS de gran escala, de la cual la proteína CTLA4Ig mutante se preparó siguiendo la purificación de la proteína A del medio de cultivo.

5 Las condiciones de análisis BIAcore y análisis de datos de unión de equilibrio se realizaron como se describe en J. Greene *et al.* 1996 J. Biol. Chem. 271:26762-26771, y como se describe en el presente documento.

Análisis de Datos BIAcore

10 Las líneas basales del Senosograma se normalizaron a unidades de respuesta cero (UR) previo al análisis. Las muestras se procesaron sobre celdas de flujo derivadas simuladas, para determinar los valores de unidad de respuesta antecedente (UR) debido a las diferencias de índice refractario de volumen entre soluciones. Las constantes de disociación de equilibrio (K_d) se calcularon de trazos de R_{eq} contra C, en donde R_{eq} es la respuesta de estado estacionario menos la respuesta en un chip derivado simulado, y C es la concentración molar del analito. Las curvas de unión se analizaron usando un software de ajuste de curva no lineal comercial. (Prim, GraphPAD Software).

15 Los datos experimentales se ajustaron primero a un modelo para una unión de ligando único a un receptor único (modelo sitio 1, es decir, un sistema langmuir simple, $A+B \leftrightarrow B$), y constantes de asociación de equilibrio ($K_d=[A] \cdot [B]/[AB]$) se calcularon a partir de la ecuación $R=R_{max} \cdot C/(K_d+C)$. Subsecuentemente, los datos se ajustaron al modelo de dos sitios más simples de la unión a ligando (es decir, a un receptor que tiene dos sitios de unión independientes no interactuantes como se describe por la ecuación $R=R_{max1} \cdot C/(K_{d1}+C)+R_{max2} \cdot C/(K_{d2}+C)$).

20 La bondad de ajuste de estos dos modelos se analizó visualmente por comparación con los datos experimentales y estadísticamente por una prueba F de las sumas de cuadrados. El modelo de un sitio más simple se seleccionó como el mejor ajuste, a menos que el modelo de dos sitios se ajuste significativamente mejor ($p < 0,1$).

25 Se realizaron análisis de asociación y disociación usando un Software de evaluación 2.1 BIA (Pharmacia). Las constantes de velocidad de asociación k_{on} se calcularon en dos vías, asumiendo tanto interacciones homogéneas de un sitio como interacciones paralelas de dos sitios. Para interacciones de un solo sitio, se calcularon valores k_{on} de conformidad con la ecuación $R_t=R_{eq}(1-\exp^{-k_s(t-t_0)})$, en donde R_t es una respuesta a un tiempo dado, t; R_{eq} es la respuesta de estado estacionario; t_0 es el tiempo al inicio de la inyección; y $k_s=dR/dt/k_{on} \cdot Ck_{off}$, y donde C es una concentración del analito, calculada en términos de sitios de unión monoméricos. Para interacciones de dos sitios, se calcularon los valores k_{on} de conformidad con la ecuación $R_t=R_{eq1}(1-\exp^{-k_s(t-t_0)})+R_{eq2}(1-\exp^{-k_s2(t-t_0)})$. Para cada modelo, se determinaron los valores de k_{on} a partir de la inclinación calculada (alrededor de 70 % de asociación máxima) de trazos de k_s contra C.

30 Los datos de disociación se analizaron de conformidad con modelos de un sitio ($AB=A+B$) o dos sitios ($AiBj=Ai+Bj$), y las constantes de velocidad (k_{off}) se calcularon a partir de las curvas de mejor ajuste. El modelo de sitio de unión se usó excepto cuando los residuales fueron mayores que el antecedente de la máquina (2-10 UR, de conformidad con la máquina), en tal caso, se empleó el modelo de dos sitios de uniones. Los medios tiempos de la ocupación de receptor se calcularon usando la relación $t_{1/2}=0,693/k_{off}$.

Citometría de flujo:

35 Se adquirió mAb L307.4 (anti-CD80) murina de Becton Dickinson (San José, California) y IT2.2 (anti-B7-0 [también conocido como CD86]), de Pharmingen (San Diego, California). Para inmunotinción, células CHO CD80 positivas y/o CD86-positivas, se retiraron de sus recipientes de cultivo por incubación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene EDTA 10 mM. Células CHO ($1-10 \times 10^5$) se incubaron primero con mAb o proteínas de fusión de inmunoglobulina en DMEM que contiene 10 % de suero bovino fetal (FBS); después se lavaron e incubaron con anti-ratón de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína o reactivos de segundo paso de inmunoglobulina anti-humana (Tago, Burlingame, California). A las células se les dio un lavado final y se analizaron en un FACScan (Beckon Dickinson).

Cromatografía de Exclusión de Tamaño y SDS-PAGE

40 Se realizó SDS-PAGE en geles de acrilamida al 4-20 % de Tris-glicina (Novex, San Diego, CA). Los geles analíticos se tiñeron con Azul de Comassie, y las imágenes de los geles húmedos se obtuvieron por exploración digital. Se analizó CTLA4Ig (25 μ g) y L104EA29YIg (25 μ g), por cromatografía de exclusión de tamaño usando una columna SW_{XL} G300 de TSK-GEL (7,8 x 300 mm Tosohaas, Montgomeryville, PA), equilibrada en solución salina tamponada con fosfato que contiene NAN_3 a 0,02 % a un caudal de 1,0 ml/min.

CTLA4X_{C120S} y L104EA29YX_{C120S}.

45 Se preparó CTLA4X_{C120S} de cadena sencilla como se describe previamente (Linsley *et al.*, (1995) J. Biol. Chem. 270:15417-15424). Brevemente, se usó un plásmido de expresión M CTLA4 (OMCTLA4) de oncostatina, como una

plantilla, el cebador directo,

GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG
se seleccionó para igualar las secuencias en el vector; y el cebador inverso,

5 GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC
que corresponde a los últimos siete aminoácidos (es decir, aminoácidos 118-124) en el dominio extracelular de CTLA4, y contienen un sitio de enzima de restricción, y un codón de detección (TGA). El cebador inverso especificó una mutación C120S (cisteína a serina en la posición 120). En particular, la secuencia de nucleótidos GCA (nucleótidos 34-36) del cebador inverso mostrado anteriormente es reemplazada con una de las siguientes secuencias de nucleótidos: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT o GCT. Como personas expertas en la técnica entenderán, la secuencia de nucleótidos GCA es una secuencia complementaria inversa del codón TGC para cisteína. De manera similar, las secuencias de nucleótidos AGA, GGA, TGA, CGA, ACT o GCT son las secuencias complementarias inversas de los codones para cisteína. Los productos de reacción en cadena de la polimerasa se digirieron con *HindIII/XbaI* y se subclonaron direccionalmente en el vector de expresión μ LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). Se preparó L104EA29Y_{C120S} de una manera idéntica. Cada construcción se verificó por secuenciación de ADN.

Identificación y Caracterización Bioquímica de Mutantes de Alta Avidéz

20 Se seleccionaron veinticuatro aminoácidos para la mutagénesis y las ~2300 proteínas mutantes resultantes sometidas a ensayo para la unión de CD86Ig por la resonancia de plasmón superficial (SPR; como se describe, mencionado anteriormente). Los efectos predominantes de mutagénesis en cada sitio se resumen en la Tabla II. La mutagénesis aleatoria de algunos aminoácidos en el S25-R33 aparentemente no alteró la unión a ligando. La mutagénesis de E31 y R33 y residuos M97-Y102 aparentemente resultó en la unión a ligando reducido. La mutagénesis de residuos, S25, A29 y T30, K93, L96, Y103, L104, y G105, resultó en proteínas con velocidades lentas “de asociación” y/o lentas “de disociación”. Estos resultados confirman los hallazgos previos que los residuos en la región S25-R33, y los residuos en o cerca de M97-Y102 influyen en la unión a ligando (Peach *et al.*, (1994) J. Exp. Med., 180:2049-2058).

30 La mutagénesis de sitios S25, T30, K93, L96, Y103 y G105, resultó en la identificación de algunas proteínas mutantes que tienen velocidades “de disociación” más lentas de CD86Ig. Sin embargo, en estos ejemplos, la velocidad “de disociación” lenta se comprometió por una velocidad “de asociación” lenta la cual resulta en proteínas mutantes con una afinidad total por CD86Ig que fue aparentemente similar a aquella vista con el CTLA4Ig de tipo silvestre. Además, la mutagénesis de K93 resultó en agregación significativa la cual ha sido responsable de los cambios cinéticos observados.

35 La mutagénesis aleatoria de L104 seguida por la transfección de las células COS y selección por SPR de muestras de medio de cultivo sobre CD86Ig inmovilizado, proporciona seis muestras de medios que contienen proteínas mutantes con velocidades “de disociación” aproximadamente 2 veces más lentas que el CTLA4Ig de tipo silvestre. Cuando el ADNc correspondiente de estos mutantes se secuenció, se descubrió que cada uno codificaba una mutación de leucina a ácido glutámico (L104E). Aparentemente, la sustitución de leucina 104 a ácido aspártico (L104D) no afectó la unión de CD86Ig.

45 La mutagénesis entonces se repitió en cada sitio listado en la Tabla II, esta vez usando L104E como la plantilla de PCR en lugar del CTLA4Ig de tipo silvestre, como se ha descrito anteriormente. El análisis SPR, nuevamente usando CD86Ig inmovilizado, identificó seis muestras de medio de cultivo de mutagénesis de alanina 29 con proteínas que tienen velocidades “de disociación” aproximadamente 4 veces más lentas que las de CTLA4Ig de tipo silvestre. Las dos más lentas fueron sustituciones de tirosina (L104EA29Y), dos fueron leucina (L104EA29L), una fue triptofano (L104EA29W), y una fue treonina (L104EA29T). Aparentemente, no se identificaron velocidades “de disociación” lentas cuando alanina 29 fue mutada aleatoriamente, sola, en el CTLA4Ig de tipo silvestre.

50 La masa molecular relativa y el estado de agregación de L104E purificado y L104EA29YIg se evaluaron por SDS-PAGE y cromatografía de exclusión de tamaño. L104EA29YIg (~1 μ g; carril 3) y L104EIg (~ μ g; carril 2) aparentemente tienen la misma movilidad electroforética que CTLA4Ig (~1 μ g; carril 1) en condiciones de reducción (~50 kDa; + β ME; más 2-mercaptoetanol) y sin reducción (~100 kDa; - β ME) (FIG. 10A). La cromatografía de exclusión de tamaño demostró que L104EA29YIg (FIG. 10C), aparentemente tiene la misma movilidad que el CTLA4Ig dímérico (Fig. 10B). Los picos principales representan el dímero de proteína mientras el pico menor que eluye más rápido en la FIG. 10B, representa agregados de peso molecular superior. Aproximadamente 5,0 % de CTLA4Ig estuvo presente como agregado de peso molecular superior, pero no hubo pruebas de agregación de L104EA29YIg o L104EIg. Por lo tanto, la unión más fuerte a DC86Ig vista con L104EIg y L104EA29YIg podría no atribuirse a la agregación inducida por mutagénesis.

Análisis de Unión Cinético y de Equilibrio

Se realizó análisis de unión cinético y de equilibrio en la proteína A purificada CTLA4Ig, L104EIg, y L104EA29YIg, usando resonancia de plasmón superficial (SPR). Los resultados se muestran en la Tabla I. Las constantes de disociación en equilibrio observadas (K_d ; Tabla I), se calcularon a partir de las curvas de unión generadas sobre una serie de concentraciones (5,0-200 nM). L104EA29YIg se une más fuertemente a CD86Ig que a L104EIg o CTLA4Ig. El K_d más bajo de L104EA29YIg (3,21 nM) que L104EIg (6,06 nM) o CTLA4Ig (13,9 nM), indica afinidad de unión superior de L104EA29YIg a CD86Ig. El K_d más bajo de L104EA29YIg (3,66 nM) que L104EIg (4,47 nM) o CTLA4Ig (6,51 nM), indica afinidad de unión superior de L104EA29YIg a CD80Ig.

El análisis de unión cinético revela que las velocidades “de asociación” comparativas para CTLA4Ig, L104EIg, y L104EA29YIg de unión a CD80 fueron similares, como fueron las velocidades “de asociación” para CD86Ig (Tabla 1). Sin embargo, las velocidades “de disociación” para estas moléculas no fueron equivalentes (Tabla I). Comparado con CTLA4Ig, L104EA29YIg tiene velocidades “de disociación” aproximadamente 2 veces más lentas de CD80Ig, y velocidades “de disociación” aproximadamente 4 veces más lentas de CD86Ig. El L104E tiene velocidades “de disociación” intermedias entre L104EA29YIg y CTLA4Ig. Ya que la introducción de estas mutaciones no afecta significativamente en las velocidades “de asociación”, el incremento en avidéz para CD80Ig y CD86Ig observado con L104EA29YIg fue de forma similar principalmente debido a una disminución de velocidades “de disociación”.

Para determinar si el incremento en la afinidad de L104EA29YIg para CD86Ig y CD80Ig fue debido a las mutaciones que afectan a la forma en que cada monómero se asociaba como un dímero, o si hubo cambios estructurales potenciadores de la avidéz introducidos en cada monómero, se prepararon construcciones de cadena sencilla de dominios extracelulares de CTLA4 y L104EA29Y después de la mutagénesis de cisteína 120 a serina como se ha descrito anteriormente, y por Linsley *et al.*, (1995) J. Biol. Chem. 270:15417-15424. Las proteínas purificadas CTLA4X_{C120S} y L104EA29YX_{C120S} mostraron ser monoméricas por cromatografía de permeación en gel (Linsley *et al.*, (1995), mencionado anteriormente), antes de que sus propiedades de unión al ligando se analizaran por SPR. Los resultados muestran que la afinidad de unión de ambas proteínas monoméricas para CD86Ig fue aproximadamente 35-80 veces menor que la vista para sus dímeros respectivos (Tabla I). Esto confirma datos publicados previamente, que establecen que se requería la dimerización de CTLA4 para unión de ligando de alta avidéz (Greene *et al.*, (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771).

L104EA29YX_{C120S} se unió con afinidad aproximadamente 2 veces superior que CTLA4X_{C120S} a tanto CD80Ig como CD86Ig. La afinidad incrementada fue debida a la velocidad aproximadamente 3 veces más lenta de disociación de ambos ligandos. Por lo tanto, la unión a ligando más fuerte por L104EA29Y fue más probablemente debido a los cambios estructurales que mejoran la avidéz que se habían introducido en cada cadena monomérica mejor que alteraciones en las cuales la molécula es dimerizada.

Análisis de Ubicación y Estructural de Mutaciones que Mejoran la Avidéz

La estructura de solución del dominio similar a IgV extracelular de CTLA4 ha sido determinada recientemente por espectroscopía de RMN (Metzler *et al.*, (1997) Nature Struct. Biol. 4:527-531. Esto permite la ubicación exacta de leucina 104 y alanina 29 en el pliegue tridimensional (Fig. 11A-B). Leucina 104 está situada cerca de la secuencia de aminoácidos MYPPPY altamente conservada. La alanina 29 está situada cerca del extremo C-terminal de la región S25-R33, la cual es espacialmente adyacente a la región MYPPPY. Aunque hay interacción significativa entre los residuos en la base de estas dos regiones, no hay aparentemente interacción directa entre L104 y A29 aunque ambas comprenden parte de un centro hidrofóbico contiguo en la proteína. Las consecuencias estructurales de los dos mutantes que mejoran la avidéz se valoraron por modelación. La mutación A29Y puede ser fácilmente acomodada en la hendidura entre la región S25-R33 y la región MYPPPY, y puede servir para estabilizar la conformación de la región MYPPPY. En el CTLA4 de tipo silvestre, el L104 forma interacciones hidrofóbicas extensivas con L96 y V94 cerca de la región MYPPPY. Es altamente improbable que las mutaciones de ácido glutámico adopten una conformación similar a aquella de L104 por dos razones. Primero, hay insuficiente espacio para acomodar la cadena lateral de ácido glutámico más larga en la estructura sin perturbación significativa a la región S25-R33. Segundo, los costos energéticos de internar la carga negativa de la cadena lateral de ácido glutámico en la región hidrofóbica serían grandes. En su lugar, los estudios de modelación predicen que la cadena lateral de ácido glutámico se suelta sobre la superficie donde su carga puede estabilizarse por solvatación. Tal cambio conformacional puede ser fácilmente acomodado por G105, con distorsión mínima a otros residuos en las regiones.

Unión de Mutantes de Alta Afinidad a Células CHO que Expresan CD80 o CD86

Se realizó análisis FACS (Fig. 2) de moléculas mutantes y CTLA4Ig para transfectar establemente células CD80+ y CD86+CHO como se describe en el presente documento. Las células CD80 positivas y CD86 positivas, se incubaron con concentraciones crecientes de CTLA4Ig, L104EA29YIg, o L104EIg y después se lavaron. Se detectó la proteína de fusión de inmunoglobulina unida usando inmunoglobulina anti-humana de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína.

Como se muestra en la Figura 2, las células CD80-positivas o CD86-positivas ($1,5 \times 10^5$) se incubaron con las concentraciones indicadas de CTLA4Ig (cuadrados cerrados); L104EA29YIg (círculos), o L104EIg (triángulos) durante 2 h a 23°C, se lavaron y se incubaron con anticuerpo de inmunoglobulina anti-humana de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Se analizó la unión en un total de 5,000 células viables (determinación única) en un FACScan, y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) a partir de los datos de histogramas usando PC-LYSYS. Los datos se corrigieron para la fluorescencia de fondo medida en células incubadas con solamente el reactivo de segundo paso (MFI=7). El control L6 mAb (80 µg/ml) dio MFI < 30. Estos resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

La unión de L104EA29YIg, L104EIg, y CTLA4Ig a células CHO transfectadas CD80 de humano, es aproximadamente equivalente (Fig. 2A). L104EA29YIg y L104EIg se unen más fuertemente a células CHO establemente transfectadas con CD86 humano que CTLA4Ig (Fig. 2B).

Ensayos Funcionales:

Se aislaron células T CD-4 positivas humanas por selección negativa inmunomagnética (Linsley *et al.*, (1992) J. Exp. Med. 176:1595-1604). Células T CD4 positivas aisladas se estimularon con acetato de miristato forbal (PMA) más células CHO CD80 positivas o CD86-positivas en la presencia de concentraciones de titulador del inhibidor. Las células T CD-4 positivas ($8-10 \times 10^4$ /pocillo) se cultivaron en la presencia de PMA 1 nM con o sin estimuladores de células CHO irradiadas. Las respuestas proliferativas se midieron por la adición de 1 µCi/pocillo de [3H]timidina durante las 7 horas finales de un cultivo de 72 horas. Se realizó la inhibición de PMA más CHO CD80-positiva, o CHO CD86-positiva, células T estimuladas por L104EA29YIg y CTLA4Ig. Los resultados se muestran en la FIG. 3. L104EA29YIg inhibe la proliferación de células CHO tratadas con PMA CD80 positivas más que CTLA4Ig (Fig. 3A). L104EA29YIg es también más eficaz que CTLA4Ig en la inhibición de la proliferación de células CHO tratadas con PMA CD86-positiva (FIG. 3B). Por lo tanto, L104EA29YIg es un inhibidor más potente de la coestimulación mediada de tanto CD80 como CD86 de las células T.

La Figura 4 muestra la inhibición por L104EA29YIg y CTLA4Ig de células T humanas aloestimuladas preparadas anteriormente, y después aloestimuladas con una línea celular linfoblastoide B humana (LCL) llamada PM que expresaba CD80 y CD86 (células T a $3,0 \times 10^4$ /pocillo y PM a $8,0 \times 10^3$ /pocillo). La aloestimulación primaria sucedió durante 6 días, después las células son pulsadas con ³H-timidina durante 7 horas, antes de determinarse la incorporación de radiomarcadores.

Se realizó la aloestimulación secundaria como sigue. Se cosecharon células T aloestimuladas primarias siete días sobre el medio de separación de linfocitos (LSM) (ICN, Aurora, OH) y dejaron reposar durante 24 horas. Las células T entonces se estimularon nuevamente (secundaria) en la presencia de cantidades de titulación de CTLA4Ig o L104EA29YIg, agregando PM en la misma relación como anteriormente. La estimulación sucedió durante 3 días, después las células se pulsaron con radiomarcadores y se cosecharon como anteriormente. El efecto de L104EA29YIg en las células T aloestimuladas primarias se muestra en la Fig. 4A. El efecto de L104EA29YIg en células T aloestimuladas secundarias se muestra en la FIG. 4B. El L104EA29YIg inhibe las respuestas proliferativas de las células T tanto primarias como secundarias mejor que CTLA4Ig.

Para medir la producción de citocina (Figura 5), se prepararon placas de aloestimulación secundaria por duplicado. Después de 3 días, el medio de cultivo se sometió a ensayo usando equipos ELISA (Biosource, Camarillo, CA), usando condiciones recomendadas por el fabricante. Se descubrió que L104EA29YIg era más potente que CTLA4Ig bloqueando la producción de citocinas IL-2, IL-4 y γ-IFN por células T, después de un estímulo alogénico secundario (Figs. 5A-C).

Los efectos de L104EA20YIg y CTLA4Ig en la respuesta de linfocito mezclada de ratón (MLR) se muestran en la Figura 6. Las células mononucleares de sangre periférica (PMBMC; $3,5 \times 10^4$ células/pocillo de cada mono) de 2 monos, se purificaron sobre el medio de separación de linfocitos (LSM) y se mezclaron con 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA). Las células se estimularon 3 días y después se sometieron a pulsos con radiomarcador 16 horas antes de cosecharla. L104EA29YIg inhibe la proliferación de las células T de mono mejor que CTLA4Ig.

Tabla I:

Se dan las constantes cinéticas aparentes y de equilibrio en la siguiente tabla (los valores son medias ± desviación típica a partir de tres diferentes experimentos):

Proteína Inmovilizada	Analito	$k_{on} (x 10^5) M^{-1} S^{-1}$	$k_{off} (x 10^{-3}) S^{-1}$	$K_d nM$
CD80Ig	CTLA4Ig	$3,44 \pm 0,29$	$2,21 \pm 0,18$	$6,51 \pm 1,08$
CD80Ig	L104EIg	$3,02 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,08$	$4,47 \pm 0,36$
CD80Ig	L104EA29YIg	$2,96 \pm 0,20$	$1,08 \pm 0,05$	$3,66 \pm 0,41$
CD80Ig	CTLA4XC120S	$12,0 \pm 1,0$	230 ± 10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YXC120S	$8,3 \pm 0,26$	71 ± 5	$85,0 \pm 2,5$
CD86Ig	CTLA4Ig	$5,95 \pm 0,57$	$8,16 \pm 0,52$	$13,9 \pm 2,27$

CD86lg	L104Elg	7,03 ± 0,22	4,26 ± 0,11	6,06 ± 0,05
CD86lg	L104EA29Ylg	6,42 ± 0,40	2,06 ± 0,03	3,21 ± 0,23
CD86lg	CTLA4XC120S	16,5 ± 0,5	840 ± 55	511 ± 17
CD86lg	L104EA29YXC120S	11,4 ± 1,6	300 ± 10	267 ± 29

Tabla II

El efecto en unión CD86lg por mutagénesis de CTLA4lg en los sitios enumerados se determinó por SPR, descrito anteriormente. El efecto predominante está indicado con un signo de "+".

Sitio de mutagénesis	Efectos de Mutagénesis		
	Sin Efecto aparente	Velocidad de "asociación" lenta/velocidad de disociación "lenta"	Unión a ligando reducida
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

5

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Peach, Robert J.
Naemura, Joseph R
Linsley, Peter S.
Bajorath, Jurgen
Bristol-Myers Squibb Company

15 <120> MOLÉCULAS MUTANTES CTLA4 SOLUBLES Y USOS DE LAS MISMAS

<130> D0028PCT/30436.57WOU1

20 <140> PCT/US01/17139
<141> 23-05-2001

<150> 09/579.927
<151> 26-05-2000

25 <150> 60/214.065
<151> 26-06-2000

<160> 7

30 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

ES 2 571 852 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Directo de Oncostatina M CTLA4 (OMCTLA4)

<400> 1

5 gagggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 2

<211> 42

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador Inverso de Oncostatina M CTLA4 (OMCTLA4)

<400> 2

15 gtgggtatt ggctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 3

<211> 1152

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: L109EA29Ylg

25

<400> 3

```

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180
acagtgcttc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
gggaatgagt tgaccttccat agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagttt cctcttcccc 540
ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 600
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
gtcctcaccg tctctgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
gaaccacag tgtagaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tgggtcaaag cttctatccc agcagatcgc cgtggagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctccttc 1020
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaat ga 1152
    
```

30 <210> 4

<211> 383

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: L104EA29Ylg

<400> 4

ES 2 571 852 T3

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

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 5
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: L104Elg

<400> 5

5

10

```

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
acagtgttc ggcaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
gggaatgagt tgaccttct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg 600
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 660
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagcccga 840
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtccttc 1020
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaat ga 1152

```

<210> 6
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: L104Elg

<400> 6

```

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

```

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 7
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CTLA4lg

<400> 7

5

10

```

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcaact cctgttcca 60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
acagtgcttc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttccc 540
ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 720
gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
aaciaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaagg gcagccccga 840
gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctcctc 1020
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaat ga 1152

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula mutante CTLA4 que comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 y termina con ácido aspártico en la posición +124 como se muestra en la Figura 8, o que comienza con alanina en la posición -1 y termina con ácido aspártico en la posición +124 como se muestra en la Figura 8.
2. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de aminoácidos que altera la solubilidad, la afinidad o la valencia del dominio extracelular de CTLA4.
- 10 3. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con la reivindicación 1, que es una proteína de fusión que comprende además un resto de inmunoglobulina.
4. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el resto de inmunoglobulina es una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma.
- 15 5. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la región constante de inmunoglobulina comprende una región bisagra y regiones CH2 y CH3 de una molécula de inmunoglobulina.
- 20 6. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en la que la región constante de inmunoglobulina o la parte del mismo es una región constante de inmunoglobulina humana o de mono o una parte de la misma.
7. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en la que el resto de inmunoglobulina comprende uno o más mutaciones para reducir la función efectora.
- 25 8. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en la que el resto de inmunoglobulina comprende una región bisagra y cualquiera o todos los restos de cisteína dentro de la región bisagra están sustituidos con serina.
- 30 9. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con la reivindicación 8, en la que una cisteína en la posición +130 está sustituida con una serina, una cisteína en la posición +136 está sustituida con una serina, y una cisteína en la posición +139 está sustituida con una serina, como se muestra en la Figura 8.
- 35 10. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en la que la región constante de inmunoglobulina humana está mutada para incluir una cisteína en la posición +130 sustituida con una serina, una cisteína en la posición +136 sustituida con una serina, una cisteína en la posición +139 sustituida con una serina y una prolina en la posición +148 sustituida con serina, como se muestra en la Figura 8.
- 40 11. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en la que el resto de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con ácido glutámico en la posición +126 y termina con lisina en la posición +357, como se muestra en la Figura 8.
- 45 12. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, que comprende además un resto de aminoácido de unión que está situado entre la secuencia de aminoácidos que termina con ácido aspártico en la posición +124 y el resto de inmunoglobulina.
13. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el resto de aminoácido de unión es glutamina.
- 50 14. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 y termina con lisina en la posición +357 como se muestra en la Figura 8, o que comienza con alanina en la posición -1 y termina con lisina en la posición +357 como se muestra en la Figura 8.
- 55 15. La molécula mutante CTLA4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 14 que es soluble.
16. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente a la molécula mutante CTLA4 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 60 17. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende la secuencia de nucleótidos que comienza con guanidina en la posición de nucleótido -3 y que termina con adenina en la posición de nucleótido +1071 como se muestra en la Figura 8, o que comprende la secuencia de nucleótidos que comienza con adenina en la posición de nucleótido +1 y que termina con adenina en la posición de nucleótido +1071 como se muestra en la Figura 8.
- 65

18. Un vector que comprende la secuencia de la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17.
- 5 19. Un sistema de vector hospedador que comprende un vector de la reivindicación 18 en una célula hospedadora adecuada.
20. Una célula hospedadora que tiene el vector de la reivindicación 18.
- 10 21. Un método para producir una molécula mutante CTLA4, que comprende cultivar el sistema de vector hospedador de la reivindicación 19 para producir la molécula mutante CTLA4 en una célula hospedadora y recuperar la proteína producida de este modo.
- 15 22. Una composición farmacéutica que comprende la molécula mutante CTLA4 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
23. El uso de la molécula mutante CTLA4 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para preparar una composición farmacéutica para tratar una enfermedad del sistema inmunitario.
- 20 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la enfermedad del sistema inmunitario es una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inmunoproliferativa o un trastorno relacionado con el injerto.

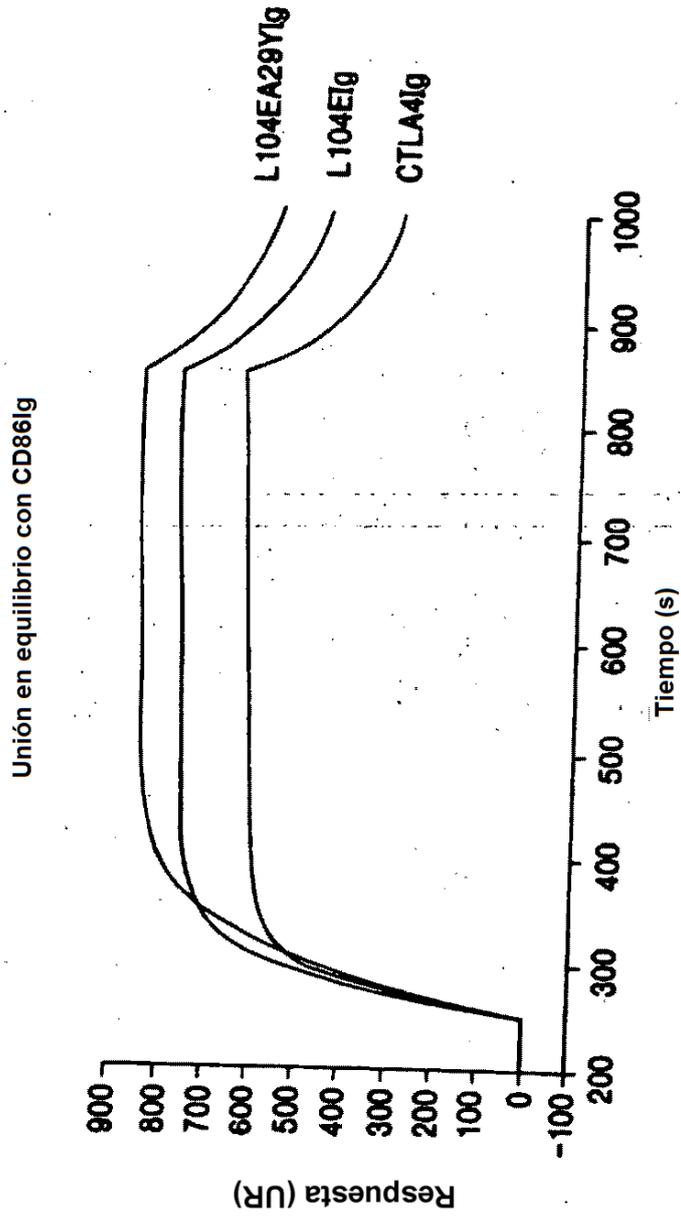


FIG. 1

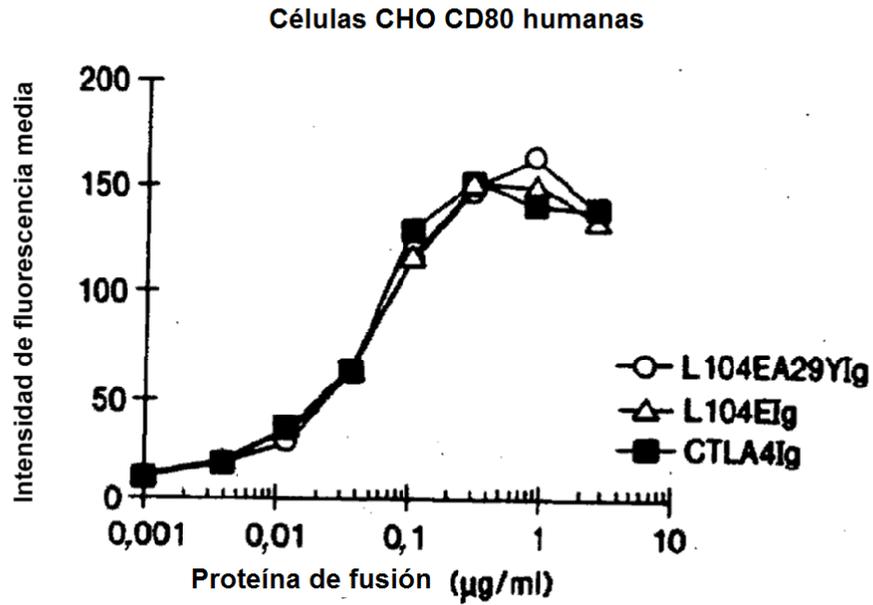


FIG. 2A

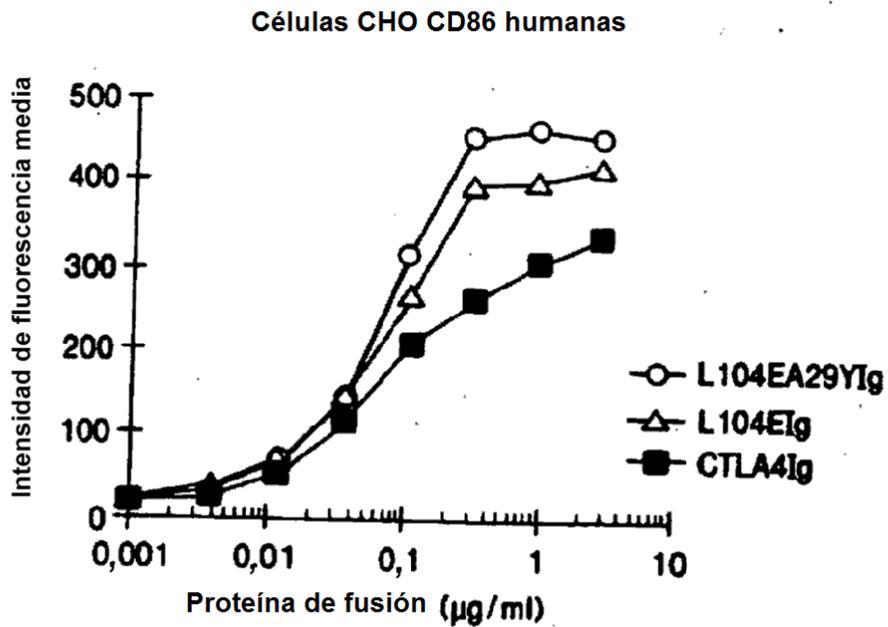


FIG. 2B

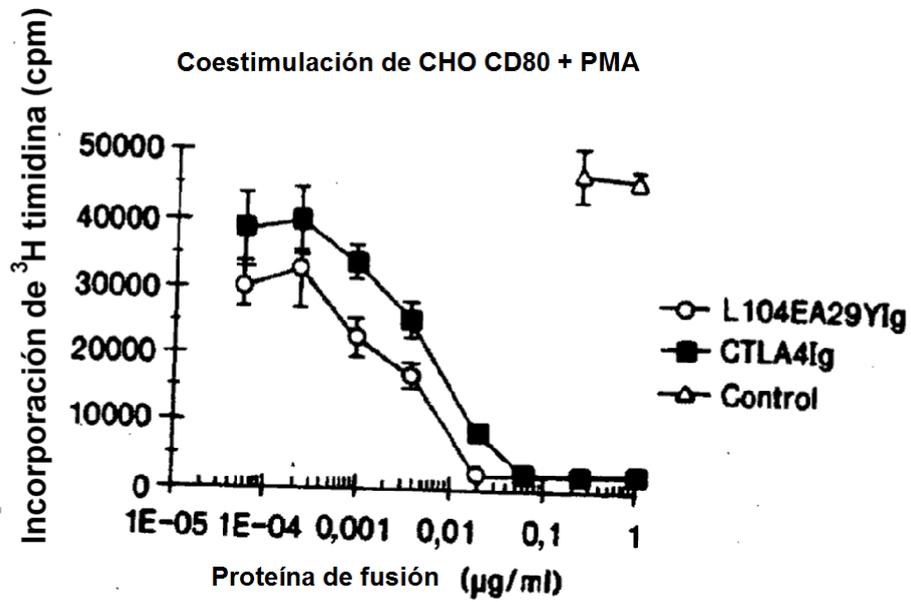


FIG. 3A

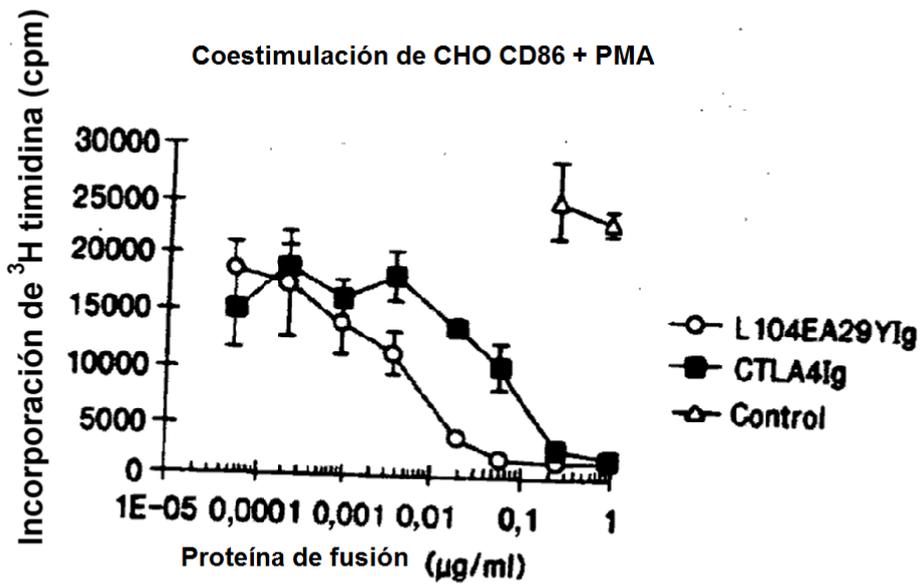


FIG. 3B

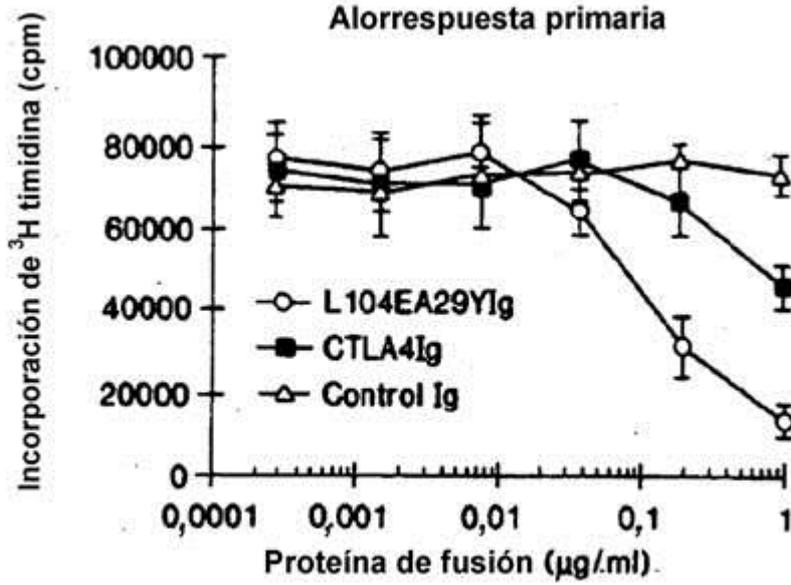


FIG. 4A

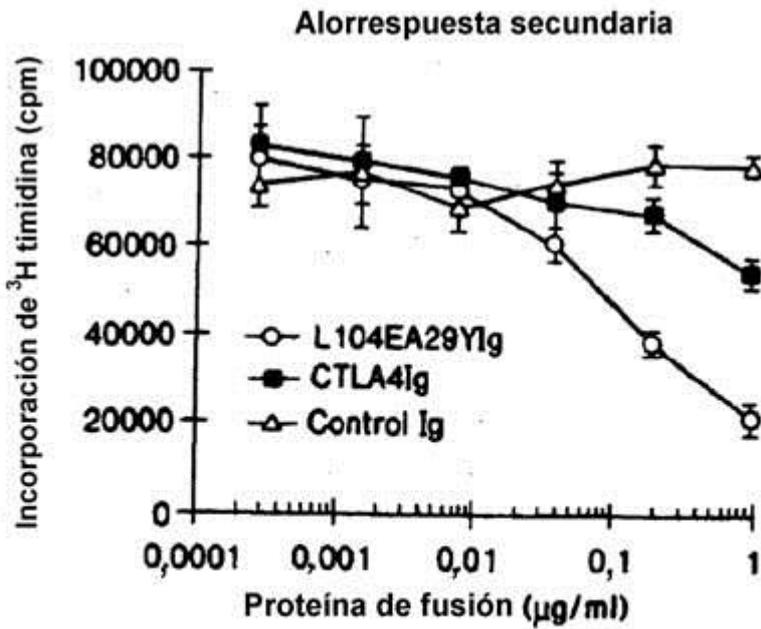


FIG. 4B

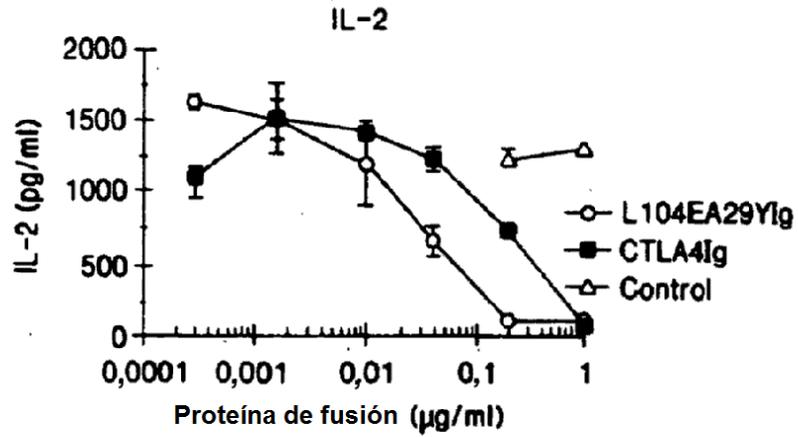


FIG. 5A

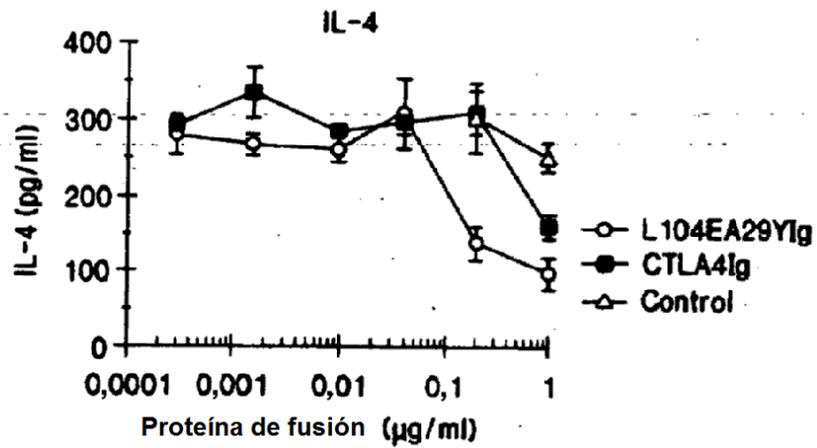
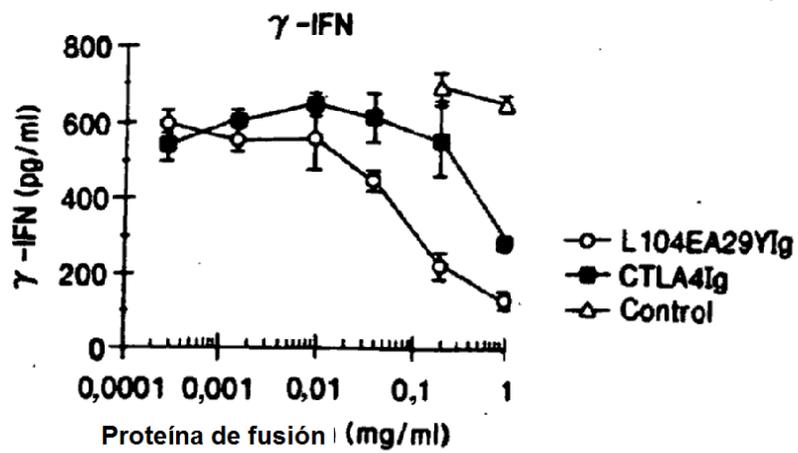


FIG. 5B



Inhibición de proliferación de células T de mono inducida por PHA

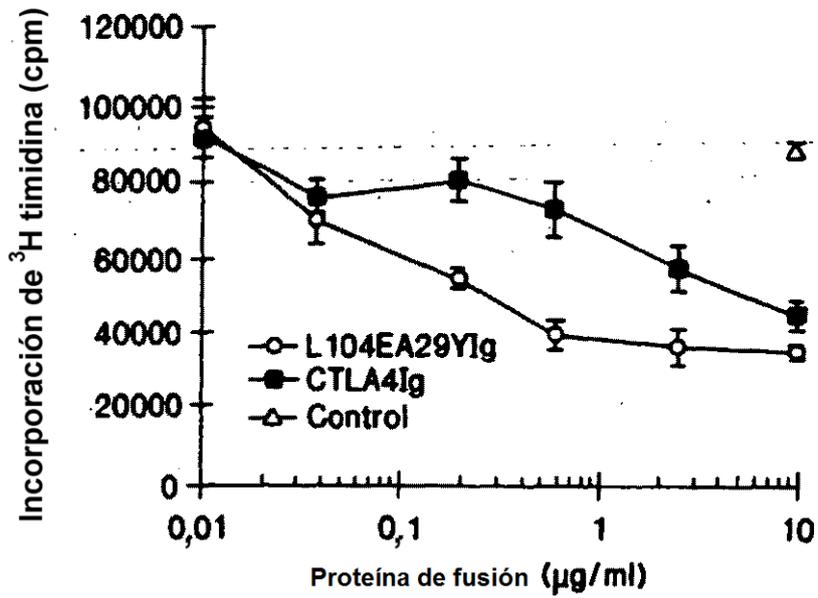


FIG. 6

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA -19
 M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7

 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
 S--M--A--S--M--A--N--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
 +1

 GGCATGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG +102
 G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V-- +34

 ACAGTGTCTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAACTCTGTGOGGCAACCTACATGATG +162
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54

 GGGAATGAGTTGACCTTCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACTCCAGTGGAAATCAA +222
 G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--C--N--Q-- +74

 GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACTCTGCAAGGTG +282
 V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94

 GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGGCATAGGCAACGGAAOCCAGATTTATGTA +342
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--E--G--T--Q--I--Y--V-- +114

 ATTGATCCAGAACCGTGCOCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC +402
 I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134

 ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTTCAGTCTTCCCTCTCCCC +462
 T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154

 CCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG +522
 P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174

 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
 D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194

 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAOCTACCGTGTGGTGCAGC +642
 H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214

 GTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC +702
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234

 AACAAAGCCCTCCAGCCOCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGA +762
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254

 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC +822
 E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274

 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
 L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--N--E--S--N-- +294

 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314

 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGACGTCTTCTCA +1002
 F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334

 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
 C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354

 CCGGGTAAATGA
 P--G--K--*

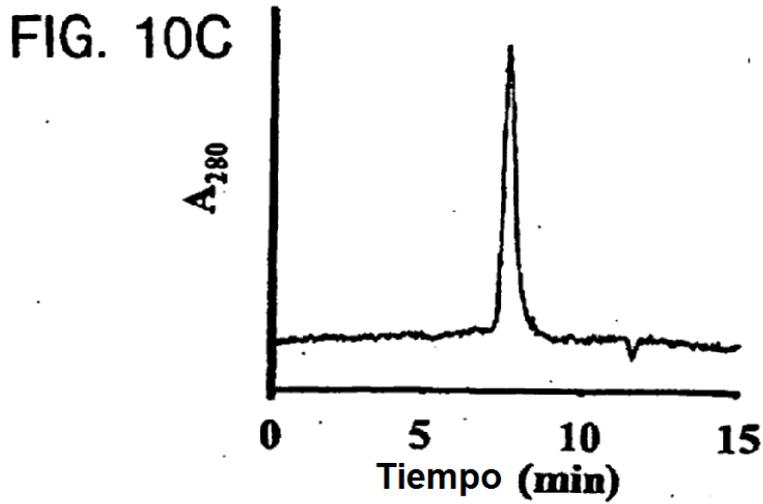
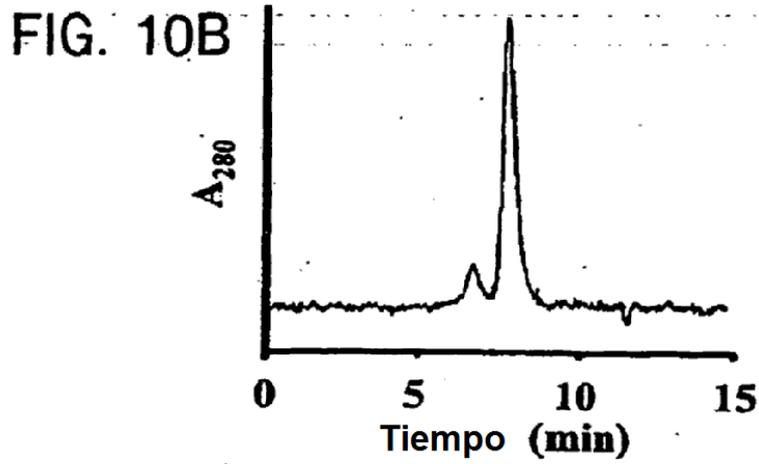
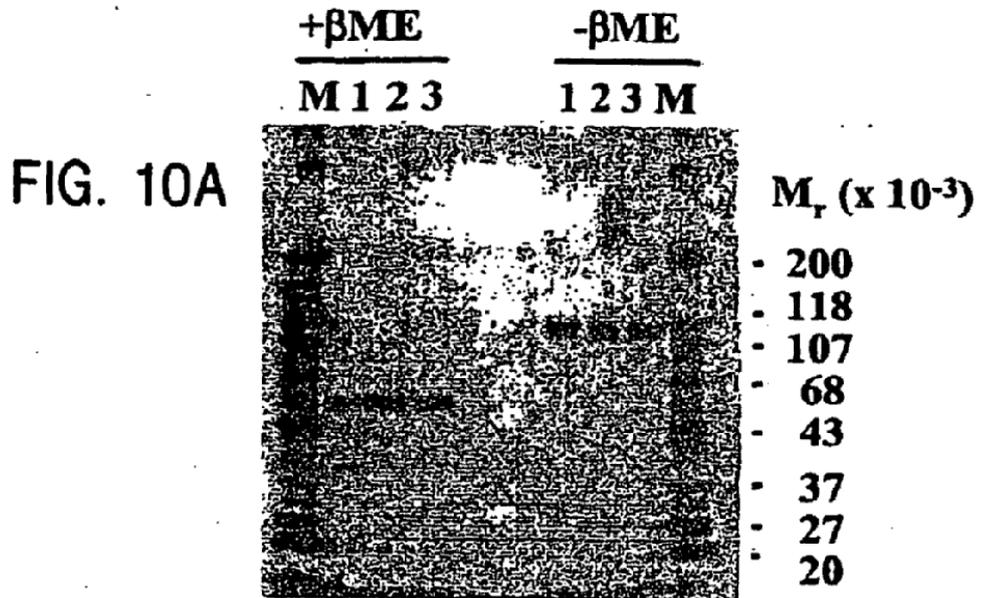
FIG. 7

ATGGGTGTA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--P--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCGAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCOGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGATATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAACTCTGTGCGGCAOCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCTAGATGATTCCA TCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--P--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCA TGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCCCATACTACGAGGGCATAGGCAACCGAAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCA CGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGACTACAAGTCCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--H--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGAGCCGGAGAACTACAAGACCCAGCCTCCCGTGTGCTGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--P--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACRACCACTACCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
COGGTAAATGA	
P--G--K--*	

FIG. 8

ATGGGTGTA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCOGA	+42
S--N--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCTAGATGATCCATCTGCAOGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCCTGGACA OGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAAACCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCACTTCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--N--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--X--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCAACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAACATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--H--H--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--P--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--X--S--L--S--L--S--	+354
CCGGTAAATGA	
P--G--K--*	

FIG. 9



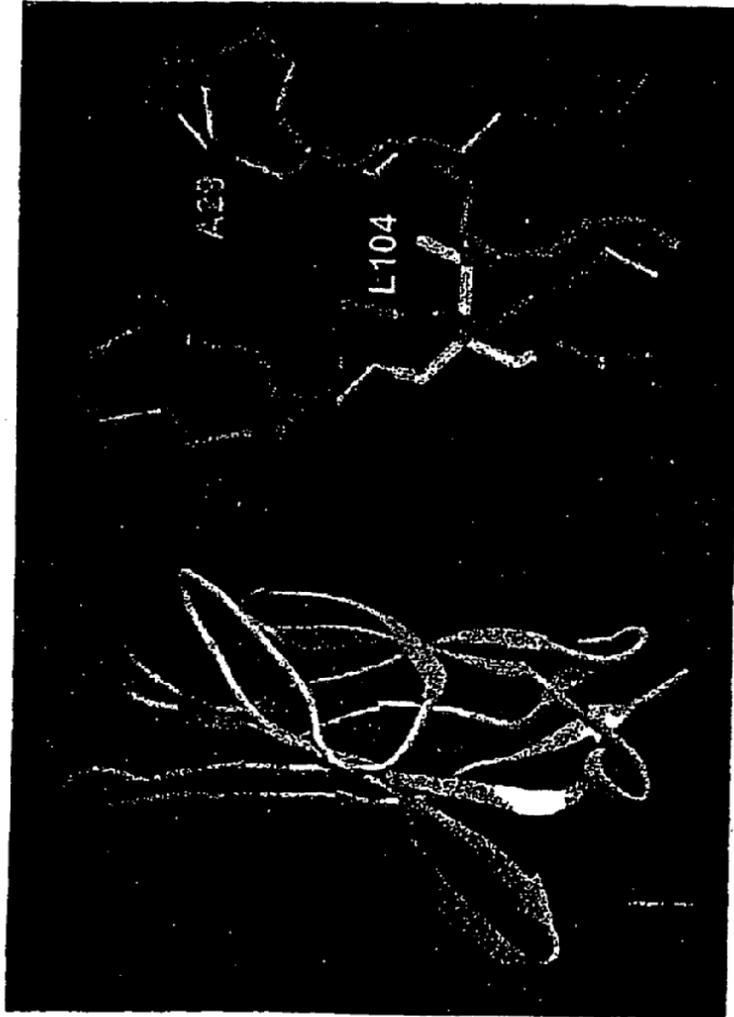


FIG. 11

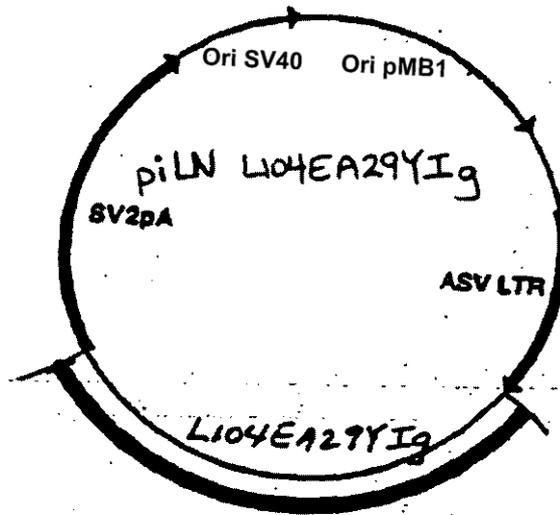


Fig. 12