

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 260**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2006 PCT/US2006/012648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2006 WO06108035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2006 E 06749324 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 1868635**

54 Título: **Métodos para tratar trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos con moléculas de CTLA4 mutantes solubles**

30 Prioridad:

06.04.2005 US 668774 P

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

27.09.2017

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD
PRINCETON NJ 08543-4000, US**

72 Inventor/es:

**HAGERTY, DAVID y
RUSNAK, JAMES**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 634 260 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

Métodos para tratar trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos con moléculas de CTLA4 mutantes solubles

5

Solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad según el Título 35 § 119(e) de la Solicitud provisional de Estados Unidos N.º 60/668.774, presentada el 6 de abril de 2005.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas solubles de CTLA4 mutante para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios asociados al trasplante de injertos.

15

Antecedentes de la invención

Dado el papel central de las células T en rechazo de trasplantes, un objetivo común entre las terapias inmunosupresoras actuales es bloquear la activación y función de células T (Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338(25): 1813-21). Las células T requieren una señal tanto específica de antígeno (Señal 1) como co-estimulante (Señal 2) para su activación completa (Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 233-58). Una de las rutas co-estimulantes mejor caracterizadas implica la interacción CD28-CD80/86 (B7-1/2) (Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 191-212). El antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4) se une con CD80/86 con mayor avididad que CD28, y se expresa de forma transitoria en células T después de su activación, donde interrumpe la interacción entre CD28 y CD80/86 (Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschbach RB, Sharpe AH. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(3): 294-300.). Esto crea una señal de retroalimentación negativa para la activación de células T.

20

25

30

Se ha buscado previamente la intervención en esta ruta con CTLA4Ig. CTLA4Ig se ha usado con éxito como una estrategia para tratar trastornos autoinmunitarios mediados por células T tales como artritis reumatoide (Kremer JM, Westhovens R, Leon M, *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 2003; 349(20): 1907-15) y psoriasis (Abrams JR, Lebowitz MG, Guzzo CA, *et al.* CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 1999; 103(9): 1243-52).

35

Se ha estudiado LEA29Y en modelos de trasplante de primates no humanos y en combinación con otros agentes inmunosupresores. Christian Larsen *et al.* (C. Larsen, T. Pearson, A. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naemura, J. Emswiler, J. Greene, L.A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerty, P. Linsley y R. Peach; Rational Development of LEA29Y (belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties; *American Journal of Transplantation*; Vol. 5, número 3, marzo 2005, p. 443) han mostrado la actividad inmunosupresora potenciada de LEA29Y en comparación con CTLA4-Ig en un modelo de primate no humano utilizado para estudiar el rechazo de aloinjerto renal. Se administró LEA29Y de forma intraoperatoria (10 mg/kg por vía intravenosa), el día 4 (15 mg/kg) y los días postoperatorios 14, 28, 42, 56 y 70 (20 mg/kg por vía intravenosa). Se administró CTLA4Ig (16 mg/kg) por vía intraoperatoria y en los días postoperatorios 4, 8, 11 y 16. El régimen de tratamiento también incluyó MMF (15 mg/kg bid s.c. los días 0-14, qd los días 15-180), metilprednisolona (inyección subcutánea de acuerdo con el siguiente programa, día 0: 20 mg, día 1: 16 mg, día 3: 8 mg, día 4: 4mg, día 5-14: 3 mg, día 15-180: 1 mg) y basiliximab (0,3 g/kg i.v. el día 0 y 4). La supervivencia de receptores de aloinjerto renales tratados con LEA29Y fue claramente superior a la de un grupo tratado con CTLA4-Ig a pesar de concentraciones en suero comparables. Los receptores de control tratados con albúmina mostraron una mediana del tiempo de supervivencia similar al grupo tratado con CTLA4-Ig. Sin embargo, a pesar del tratamiento continuado con LEA29Y, todos los receptores experimentaron una reducción significativa de la función renal (aumento de la creatinina en suero).

40

45

50

55

Andrew Adams *et al.* (A. Adams, N. Shirasugi, T. Jones, M. Durham, E. Strobert, S. Cowan, P. Rees, R. Hendrix, K. Price, N. Kenyon, D. Hagerty, R. Townsend, D. Hollenbaugh, T. Pearson y C. Larsen; Development of a Chimeric Anti-CD40 Monoclonal Antibody That Synergizes with LEA29Y to Prolong Islet Allograft Survival; *The Journal of Immunology*; enero de 2005; 174; p. 542) han mostrado que la combinación de LEA29Y y Chi220 (un mab anti-CD40 humano quimérico) actúa de forma sinérgica en un modelo de primate no humano del trasplante de islotes pancreáticos para prolongar la supervivencia de aloinjerto. LEA29Y se administró por vía intravenosa de forma intraoperatoria (20 mg/kg); los días postoperatorios 4, 7 y 14; después cada 2 semanas hasta el día 100. Se administraron dosis adicionales (20 mg/kg) mensualmente durante 6 meses. Se ensayaron cuatro protocolos: 1) LEA29Y solo, 2) Chi220 (anti-CD40), 3) LEA29Y combinado con Chi220 y 4) LEA29Y combinado con anti-CD20.

60

65

Andrew Adams *et al* (A. Adams, N. Shirasugi, M. Durham, E. Strobert, D. Anderson, P. Rees, S. Cowan, H. Xu, Y. Blinder, M. Cheung, D. Hollenbaugh, N. Kenyon, T. Pearson y C. Larsen; Calcineurin Inhibitor-Free CD28 Blockade-Based Protocol Protects Allogeneic Islets in Nonhuman Primates; *Diabetes*, Vol. 51(2), febrero de 2002, p. 265) han mostrado que la combinación de LEA29Y, rapamicina y mAb anti-IL-2R prolongó significativamente la supervivencia de aloinjerto de islotes en un modelo de primate no humano de trasplante de islotes pancreáticos. LEA29Y se administró por vía intravenosa de forma intraoperatoria (10 mg/kg) y el día postoperatorio 4 (15 mg/kg). Se proporcionaron dosis adicionales de 20 mg/kg el día postoperatorio 14 y cada 2 semanas hasta el día postoperatorio el 154.

Durante 2003 se trasplantaron más de 25.000 órganos en los Estados Unidos. El trasplante de riñón representó aproximadamente el 60 % de los trasplantes de órganos sólidos seguido de trasplantes de hígado a 21 %, corazón a 8 %, pulmón a 4 % y el 7 % restante representaba otros trasplantes de órganos tales como páncreas e intestino. (Informe Anual de OPTN/SRTR de 2004 en www.optn.org).

El trasplante renal es el tratamiento más eficaz para enfermedad renal de estadio terminal. Proporciona supervivencia y calidad de vida (QoL) mejoradas. El mantenimiento de un trasplante renal funcional obliga a terapia inmunosupresora durante toda la vida para evitar la destrucción inmunitaria del injerto. Los regímenes inmunosupresores actuales producen tasas de supervivencia a 1 año del 89 % para injertos cadavéricos y 94 % para injertos de donantes vivos. A lo largo del tiempo, sin embargo, ha habido una pérdida progresiva tanto de sujetos como de injertos. La supervivencia a los cinco años para trasplantes renales de donante cadavérico y pariente vivo es del 66 % y 79 %, respectivamente. (United Network for Organ Sharing Renal Transplant Registry 2003 en www.unos.org).

Las causas más comunes de pérdida de sujeto e injerto a largo plazo son enfermedad cardiovascular y nefropatía de aloinjerto crónica (NAC), respectivamente. (L.C. Paul, Chronic allograft nephropathy - A model of impaired repair from injury? *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 149-151) Paradójicamente, las terapias principales para trasplante renal, los inhibidores de calcineurina (ICN), CsA y tacrolimus, contribuyen directamente a la pérdida de aloinjerto a largo plazo y muerte del sujeto, ya que son inherentemente nefrotóxicas, y también provocan o agravan riesgos cardiovasculares, incluyendo hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes mellitus. No obstante, estos agentes forman la piedra angular de todos los regímenes inmunosupresores convencionales para trasplante renal.

En la actualidad, no hay ningún agente aprobado que puedan reemplazar los ICN como la piedra angular de la terapia inmunosupresora de mantenimiento en una amplia serie de sujetos. Un agente, sirolimus (rapamicina, Rapamune® de Wyeth/Ayerst), se ha aprobado para su uso en un régimen moderador de ICN. Los ICN, sin embargo, aún deben usarse con sirolimus durante al menos 3 meses después del trasplante. Lo que es más importante, el sirolimus se ha aprobado como un agente moderador de ICN en esta situación solamente para sujetos con riesgo bajo a moderado de pérdida de injerto. Por lo tanto, para los que tienen mayor riesgo de pérdida de injerto, en los que sería más beneficioso evitar los efectos nefrotóxicos de los ICN, no hay ninguna alternativa aprobada a los ICN.

Por lo tanto, existe una necesidad médica no satisfecha de agentes inmunosupresores que pueden proporcionar control aceptable de la respuesta aloinmunitaria comparable a terapias de la práctica convencional sin toxicidades que contribuyan a muerte del sujeto y pérdida de injerto a largo plazo. Idealmente, el agente sería útil no solamente en sujetos de bajo riesgo, sino también en sujetos con mayor riesgo de pérdida de injerto.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula de CTLA4 mutante para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos como se define en las reivindicaciones. La molécula de CTLA4 mutante comprende un dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en SEQ ID NO: 8 que comienza con alanina en la posición 26 o metionina en la posición 27 y termina con ácido aspártico en la posición 150, en la que en el dominio extracelular una alanina en la posición 55 se sustituye con una tirosina, y una leucina en la posición 130 se sustituye con un ácido glutámico. Las moléculas mutantes para el uso médico de la invención pueden incluir también una segunda secuencia de aminoácidos que aumenta la solubilidad de la molécula mutante.

Un ejemplo de una molécula de CTLA4 mutante para el uso médico de la invención es L104EA29YIg (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4), como se describe en el presente documento. Otra molécula de CTLA4 mutante descrita en el presente documento es L104EIg (Figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6). L104EA29YIg y L104EIg se unen con CD80 y CD86 con más avidéz que CTLA4Ig.

El tratamiento comprende un régimen de fase temprana y un régimen de fase de mantenimiento y en el que (i) el régimen de fase temprana varía de los primeros 3 a 6 meses después de trasplante y comprende administración de la molécula de CTLA4 mutante a un sujeto el día 1, visita de la semana 2, visita de la semana 4 y después mensualmente hasta la visita del mes 3 a una dosificación de 10 mg/kg del peso del sujeto, y (ii) el régimen de fase de mantenimiento comienza después de que termine el régimen de fase temprana e implica administración que no es más frecuente que mensualmente de una dosis eficaz de la molécula de CTLA4 mutante a un sujeto para

proporcionar concentración valle en suero de la molécula de CTLA4 mutante entre aproximadamente 0,2 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml durante el régimen de fase de mantenimiento. Por lo tanto, en la fase temprana, las dosis son normalmente mayores y la frecuencia de administración se aumenta durante el periodo de mayor riesgo inmunológico.

5

Breve descripción de las figuras

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

10 Las Figuras 2A y 2B ilustran datos de ensayos de FACS que muestran la unión de L104EA2.9YIg, L104EIg y CTLA4Ig a células CHO transfectadas con CD80 o CD86 humano como se describe en el Ejemplo 2, posteriormente.

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

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

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

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

La Figura 7 (SEQ ID NO: 3 y 4) representa una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una molécula de CTLA4 mutante ("L104EA29YIg") que comprende un polipéptido señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en la metionina en la posición +1 y termina en el ácido aspártico en la posición +124, o comienza 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. SEQ ID NO: 3 y 4 representan una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de una molécula de CTLA4 mutante ("L104EA29YIg") que comprende un péptido señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +27 y termina en ácido aspártico en la posición +150, o que comienza en alanina en la posición +26 y termina en ácido aspártico en la posición +150; y una región Ig.

30 La Figura 8 (SEQ ID NO: 5 y 6) representa una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una molécula de CTLA4 mutante ("L104EIg") que comprende un péptido señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o que comienza 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. SEQ ID NO: 5 y 6 representan una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de una molécula de CTLA4 mutante ("L104EIg") que comprende un péptido señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +27 y termina en ácido aspártico en la posición +150, o que comienza en alanina en la posición +26 y termina en ácido aspártico en la posición +150; y una región Ig.

40 La Figura 9 (SEQ ID NO: 7 y 8) representa una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una CTLA4Ig que tiene un péptido señal; una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +1 a ácido aspártico en la posición +124, o que comienza en alanina en la posición -1 a ácido aspártico en la posición +124; y una región Ig. SEQ ID NO: 7 y 8 representan una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de un CTLA4Ig que comprende un péptido señal; una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4 que comienza en metionina en la posición +27 y termina en ácido aspártico en la posición +150, o que comienza en alanina en la posición +26 y termina en ácido aspártico en la posición +150; y una región Ig.

Las Figuras 10A-C con un gel de SDS (FIG. 10A) para CTLA4Ig (carril 1), L104EIg (carril 2) y L104EA29YIg (carril 3A); y cromatografías de exclusión por tamaño de CTLA4Ig (FIG. 10B) y L104EA29YIg (FIG. 10C).

50 Las Figuras 11A y 11B ilustran un diagrama de lazo del pliegue de tipo V de Ig extracelular de CTLA4 generado a partir de la estructura en solución determinada por espectroscopia de RMN. La FIG. 11B muestra una vista expandida de la región S25-R33 y la región MYPPPY que indica la localización y la orientación de cadena lateral de las mutaciones que potencian la avidéz, L104 y A29.

55 La Figura 12 representa un diagrama esquemático de un vector, pILN-L104EA29Y, que tiene el inserto de L104EA29YIg.

La Figura 13 representa la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del receptor CTLA4 (SEQ ID NO: 9 y 10).

Descripción detallada de la invención

60 Definiciones

Todos los términos científicos y técnicos usados en la presente solicitud tienen significados habitualmente usados en la técnica a no ser que se especifique de otro modo. Como se usa en la presente solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

65

Como se usa en el presente documento, "ligando" se refiere a una molécula que reconoce específicamente y se une con otra molécula, por ejemplo, un ligando para CTLA4 es una molécula de B7.

Como se usa en el presente documento "CTLA4 de tipo silvestre" o "CTLA4 no mutado" tiene la secuencia de aminoácidos de CTLA4 de longitud completa, de origen natural, como se muestra en la Figura 13 (SEQ ID NO: 9 y 10; también como se describe en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.434.131, 5.844.095, 5.851.795), o cualquier parte o derivado de la misma, que reconoce y se une con un B7 de modo que bloquea la unión con CD28 y/o CTLA4 (por ejemplo, CD28 y CTLA4 endógeno). En moléculas de CTLA4 de tipo silvestre 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. CTLA4 de tipo silvestre es una proteína de superficie celular, que tiene un dominio extracelular N terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C terminal. El dominio extracelular se une con moléculas diana, tales como una molécula de B7. En una célula, la proteína CTLA4 de tipo silvestre, de origen natural, se traduce como un polipéptido inmaduro, que incluye un péptido señal en el extremo N terminal. El polipéptido inmaduro experimenta procesamiento post-traducciona que incluye escisión y retirada del péptido señal para generar un producto de escisión de CTLA4 que tiene un extremo N terminal de nueva generación que difiere del extremo N terminal en la forma inmadura. Un experto en la materia apreciará que puede producirse procesamiento post-traducciona adicional, que retira uno o más de los aminoácidos del extremo N terminal de nueva generación del producto de escisión de CTLA4. Como alternativa, el péptido señal puede no retirarse completamente, generando moléculas que comienzan antes del aminoácido de inicio habitual metionina. Por lo tanto, la proteína CTLA4 madura puede iniciarse en metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1. La forma madura de la molécula de CTLA4 incluye el dominio extracelular o cualquier parte del mismo, que se une con B7.

"CTLA4Ig" es una proteína de fusión soluble que comprende un dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre unido a una cola de Ig, o a una parte del mismo que se une con B7. Un CTLA4Ig particular puede comprender el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre (como se muestra en la Figura 9, SEQ ID NO: 7 y 8) que comienza en metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124; o que 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 parte de inmunoglobulina que abarca ácido glutámico en la posición +126 hasta lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356 (el ADN que codifica CTLA4Ig se depositó el 31 de mayo de 1991 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 según las provisiones del Tratado de Budapest, y se le ha concedido el número de referencia de ATCC 68629; Linsley, P., *et al.*, 1994 Immunity 1: 793-80. CTLA4Ig-24, una línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresa CTLA4Ig se depositó el 31 de mayo de 1991 con el número de identificación de ATCC CRL-10762). Las moléculas de CTLA4Ig solubles pueden incluir o no una secuencia de péptido señal (líder).

Como se usa en el presente documento, una "proteína de fusión" se define como una o más secuencias de aminoácidos unidas entre sí usando métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en las Patentes de Estados N.º 5.434.131 o 5.637.481. Las secuencias de aminoácidos unidas forman de este modo una proteína de fusión.

Como se usa en el presente documento, "soluble" se refiere a cualquier molécula, o fragmentos y derivados de la misma, no unidos o enlazados a una célula, es decir, en circulación. Por ejemplo, CTLA4, B7 o CD28 puede hacerse soluble uniendo un resto de inmunoglobulina (Ig) al dominio extracelular de CTLA4, B7 o CD28, respectivamente. Como alternativa, una molécula tal como CTLA4 puede hacerse soluble retirando su dominio transmembrana.

Como se usa en el presente documento, "el dominio extracelular de CTLA4" es la parte de CTLA4 que reconoce y se une con ligandos de CTLA4, tales como moléculas B7. Por ejemplo, un dominio extracelular de CTLA4 comprende metionina en la posición +1 a ácido aspártico en la posición +124 (Figura 13, SEQ ID NO: 9 y 10). Como alternativa, un dominio extracelular de CTLA4 comprende alanina en la posición -1 a ácido aspártico en la posición +124 (Figura 13, SEQ ID NO: 9 y 10). El dominio extracelular incluye fragmentos o derivados de CTLA4 que se unen con una molécula de B7. El dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la Figura 13 (SEQ ID NO: 9 y 10) también puede incluir mutaciones que cambian la avidéz de unión de la molécula de CTLA4 por una molécula de B7.

Como se usa en el presente documento, una "molécula de CTLA4 mutante" significa CTLA4 de tipo silvestre como se muestra en (SEQ ID NO: 9 y 10) o cualquier parte o derivado de la misma, que tiene una mutación o múltiples mutaciones (preferentemente en el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre). Una molécula de CTLA4 mutante tiene una secuencia que es similar pero no idéntica a la secuencia de molécula de CTLA4 de tipo silvestre, pero aún se une con un B7. Las mutaciones pueden incluir uno o más restos de aminoácidos sustituidos con un aminoácido que tiene estructura o propiedades químicas conservativas (por ejemplo, sustituir una leucina con una isoleucina) o no conservativas (por ejemplo, sustituir una glicina con un triptófano), supresiones de aminoácidos, adiciones, cambios de fase o truncamientos. Las moléculas de CTLA4 mutantes pueden incluir una molécula no CTLA4 en las mismas o unidas a las mismas. Las moléculas mutantes pueden ser solubles (es decir, en circulación) o unidas a una superficie celular. Las moléculas de CTLA4 mutantes adicionales incluyen las descritas en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Números de Serie 09/865.321, 60/214.065 y 60/287.576; en las Patentes

de Estados Unidos Números 6.090.914 5.844.095 y 5.773.253; y como se describe en Peach, R. J., *et al.*, in J Exp Med 180: 2049-2058 (1994)). Pueden prepararse moléculas de CTLA4 mutantes de forma sintética o recombinante.

5 “L104EA29YIg” es una proteína de fusión que es una molécula soluble de CTLA4 mutante que comprende un dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre con cambios de aminoácidos A29Y (un resto de aminoácido tirosina que sustituye una alanina en la posición 29) y L104E (un resto de aminoácido de ácido glutámico que sustituye una leucina en la posición +104), o una parte del mismo que se une con una molécula de B7, unido con una cola Ig (incluida en la Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4; se depositó ADN que codifica L104EA29YIg el 20 de junio de 2000 con el número de ATCC PTA-2104; relacionado con las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Números de Serie 10 09/579.927, 60/287.576 y 60/214.065). Las moléculas de L104EA29YIg solubles usadas en el uso médico de la invención pueden incluir o no una secuencia peptídica señal (líder). Normalmente, en los métodos y/o kits de la invención, las moléculas no incluyen una secuencia de péptido señal.

15 Como se usa en el presente documento, el término “mutación” significa un cambio en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de una molécula de tipo silvestre, por ejemplo, un cambio en las secuencias de ADN y/o aminoácidos del dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre. Una mutación en ADN puede cambiar un codón que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos. Un cambio de ADN puede incluir sustituciones, supresiones, inserciones, corte y empalme alternativo o truncamientos. Un cambio de aminoácido puede incluir sustituciones, supresiones, inserciones, adicionales, truncamientos u errores de procesamiento o escisión de la proteína. Como 20 alternativa, las mutaciones en una secuencia de nucleótidos pueden dar como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos como se entiende bien en la técnica. A este respecto, 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 los codones GAU y GAC que codifican el aminoácido ácido aspártico (D). Por lo tanto, una proteína puede estar codificada por una o más moléculas de ácido nucleico que difieren en su 25 secuencia de nucleótidos específica, pero aún codifican moléculas proteicas que tienen secuencias idénticas. La secuencia codificante de aminoácidos es la siguiente:

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
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU, UAC

30 La molécula mutante puede tener una o más mutaciones.

Como se usa en el presente documento, una “secuencia proteica distinta de CTLA4” o “molécula distinta de CTLA4” significa cualquier molécula proteica que no se una con B7 y no interfiera con la unión de CTLA4 con su diana. Un ejemplo incluye, pero sin limitación, una región constante de inmunoglobulina (Ig) o parte de la misma. Preferentemente, la región constante de Ig es una región constante Ig humana o de mono, por ejemplo, C(gamma)1 35 humana, que incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3. La región constante de Ig puede mutarse para reducir sus funciones efectoras (Patentes de Estados Unidos 5.637.481, 5.844.095 y 5.434.131).

Como se usa en el presente documento, un "fragmento" o una "parte" es cualquier parte o segmento de una molécula de CTLA4, preferentemente el dominio extracelular de CTLA4 o una parte o un segmento del mismo, que reconoce y se une con su diana, por ejemplo, una molécula de B7. El dominio extracelular de CTLA4 puede incluir mutaciones que cambian la avidéz de unión de la molécula de CTLA4 por una molécula de B7.

5 Como se usa en el presente documento "B7" se refiere a la familia B7 de moléculas incluyendo, pero sin limitación, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y B7-3 que puede reconocer y unirse con CTLA4 y/o CD28.

10 Como se usa en el presente documento, las "células B7 positivas" son cualquier célula con uno o más tipos de moléculas B7 expresadas en la superficie celular.

15 Como se usa en el presente documento, un "derivado" es una molécula que comparte homología de secuencia y actividad de su molécula parental. Por ejemplo, un derivado de CTLA4 incluye una molécula soluble de CTLA4 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70 % similar al dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre, y que reconoce y se une con B7, por ejemplo, CTLA4lg o molécula soluble de CTLA4 mutante L104EA29Ylg.

20 Como se usa en el presente documento, "regular" una respuesta inmunitaria es activar, estimular, regular positivamente, inhibir, bloquear, regular negativamente o modificar la respuesta inmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias descritas en el presente documento pueden tratarse regulando una respuesta inmunitaria, por ejemplo, regulando las interacciones de células CTLA4 y/o CD28 positivas funcionales con células B7 positivas. Por ejemplo, un método para regular una respuesta inmunitaria comprende poner en contacto las células B7 positivas con una molécula soluble de CTLA4 como se describe en el presente documento para formar complejos de CTLA4/B7 solubles, interfiriendo la molécula soluble de CTLA4 con la reacción de una molécula de CTLA4 y/o CD28 endógena con dicha molécula de B7.

25 Como se usa en el presente documento, "bloquear" o "inhibir" un receptor, una señal o una molécula significa interferir con la activación del receptor, la señal o la molécula, como se detecta por un ensayo reconocido en la técnica. El bloqueo o la inhibición pueden ser parcial o total. Por ejemplo, puede detectarse bloqueo de una respuesta inmunitaria mediada por células determinando la funcionalidad del trasplante, tal como la concentración de creatinina en suero después de trasplante renal.

30 Como se usa en el presente documento, la "interacción de B7 de bloqueo" significa interferir con la unión de B7 con sus ligandos, tales como CD28 y/o CTLA4, obstruyendo de este modo las interacciones de células B7 positivas y células T. Los ejemplos de agentes que bloquean interacciones de B7 incluyen, pero sin limitación, moléculas tales como un anticuerpo (o parte o derivado del mismo) que reconoce y se une con cualquiera de las moléculas de CTLA4, CD28 o B7 (por ejemplo, B7-1, B7-2); una forma soluble (o parte o derivado de la misma) de las moléculas tales como CTLA4 soluble; un fragmento peptídico u otra molécula pequeña diseñada para interferir con la señal celular a través de la interacción mediada por CTLA4/CD28/B7. En una realización preferida, el agente de bloqueo es una molécula soluble de CTLA4 mutante, tal como L104EA29Ylg (ATCC PTA-2104).

35 Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" de un trastorno o una enfermedad significa controlar una enfermedad o un trastorno por terapias medicinales u otras. El tratamiento de una enfermedad o un trastorno puede suprimir acontecimientos mediados por inmunidad asociados a una enfermedad, aliviar los síntomas de una enfermedad o un trastorno, reducir la gravedad de una enfermedad o un trastorno, alterar la evolución de progresión de enfermedad o trastorno y/o aliviar o curar el problema de enfermedad o trastorno básico. Por ejemplo, el tratamiento de un trastorno inmunitario asociado a trasplante de injertos puede conseguirse regulando una respuesta inmunitaria, por ejemplo, regulando las interacciones de células CTLA4 y/o CD28 positivas funcionales con células B7 positivas. Como alternativa, puede conseguirse tratamiento de una enfermedad o un trastorno inmunitario previniendo o inhibiendo que la enfermedad o trastorno se produzca o progrese mediante el uso de las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, el tratamiento de rechazo de trasplante renal incluye inhibición de rechazo de trasplante renal como se mide por velocidad de filtración glomerular (VFG). Por ejemplo el tratamiento de trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos incluye profilaxis de rechazo de órganos mediante la administración de L104EA29Ylg. Además, el tratamiento de trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos puede prolongar la supervivencia del hospedador y el órgano trasplantado.

45 Como se usa en el presente documento, "enfermedad del sistema inmunitario" incluye cualquier enfermedad mediada por interacciones de células T con células B7 positivas incluyendo, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunoproliferativas y trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos.

50 Como se usa en el presente documento, "trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos" significa cualquier enfermedad relacionada con trasplante mediada por interacciones de células T con células B7 positivas incluyendo, pero sin limitación, trastornos inmunitarios asociados a rechazo de trasplante de injertos, trastornos relacionados con injertos, enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) (por ejemplo, tal como puede resultar de trasplante de médula ósea, o en la inducción de tolerancia), rechazo del injerto o trasplante incluyendo rechazo agudo del injerto o trasplante y rechazo crónico del injerto o trasplante. El injerto puede ser aloinjertos o xenoinjertos de órganos sólidos, aloinjertos o xenoinjertos de tejidos o células o aloinjertos o xenoinjertos de anatomía externa,

incluyendo pero sin limitación, piel, células de islotes (también conocidas como islotes), músculos, hepatocitos, neuronas, corazón, hígado, riñón, pulmón, apéndices, extremidades, nariz, oído o cara.

5 Como se usa en el presente documento, las enfermedades inmunoproliferativas incluyen, pero sin limitación, linfoma de células T; leucemia linfoblástica aguda en células T; linfoma de células T angiocéntrico testicular; y angitis linfocítica benigna.

10 Como se usa en el presente documento las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedades tales como lupus (por ejemplo, lupus eritematoso, nefritis lúpica), psoriasis; tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus insulino dependiente, diabetes mellitus de tipo I, diabetes mellitus de tipo II), síndrome de good pasture, miastenia grave, péufigo, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), oftalmia simpática, uveítis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis de acción crónica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), polimiositis, esclerodermia y enfermedad del tejido conectivo mixto.

15 Para que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse más completamente, se expone la siguiente descripción.

20 **Composiciones y métodos**

25 La presente invención proporciona una nueva clase de terapia inmunosupresora para trasplante que se une con las moléculas B7 en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC) que inhiben la co-estimulación requerida para activación de células T. Las moléculas solubles de CTLA4 mutante para el uso médico de la invención difieren de inmunosupresores existentes en la distribución restringida de su diana molecular y la especificidad de su efecto. Las moléculas solubles de CTLA4 mutante reconocen y se unen con CD80 y/o CD86. En algunas realizaciones, las CTLA4 mutantes solubles tienen una avidéz mayor por CD80 y/o CD86 que CTLA4Ig. Por ejemplo, L104EA29YIg se une con aproximadamente 2 veces más avidéz que CTLA4Ig de tipo silvestre (en lo sucesivo denominado en el presente documento CTLA4Ig) con CD80 y con aproximadamente 4 veces más avidéz con CD86. Esta unión más fuerte da como resultado que L104EA29YIg sea más eficaz que CTLA4Ig en el bloqueo de respuestas inmunitarias.

35 Además, se describen en el presente documento métodos para tratar enfermedades del sistema inmunitario. Los métodos comprenden administrar una composición terapéutica, que comprende moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento, a un sujeto en una cantidad eficaz para aliviar al menos uno de los síntomas asociados a enfermedades del sistema inmunitario. Adicionalmente, las moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento pueden proporcionar terapia a largo plazo para enfermedades del sistema inmunitario bloqueando las interacciones de células T/células B7 positivas, bloqueando de este modo la activación/estimulación de células T por señales co-estimulantes tales como unión de B7 con CD28, lo que conduce a la inducción de anergia o tolerancia de células T. Las enfermedades del sistema inmunitario incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunoproliferativas, y trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos analizado anteriormente.

45 Se describen además en el presente documento métodos para inducir tolerancia en un sujeto que tiene trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos administrando una composición terapéutica que comprende moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento.

50 Las moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento muestran propiedades inhibitoras *in vivo*. En condiciones en las que se producen interacciones de células T/células B7 positivas, por ejemplo, interacciones de células T/células B, como resultado de contacto entre células T y células B7 positivas, la unión de moléculas de CTLA4 mutantes introducidas para reaccionar con células B7 positivas, por ejemplo células B, puede interferir con, es decir, inhibir, las interacciones de células T/células B7 positivas que dan como resultado regulación de respuestas inmunitarias.

55 Además, se describen en el presente documento métodos para regular respuestas inmunitarias. Las respuestas inmunitarias reguladas negativamente (reducidas) por las moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento pueden ser por medio de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria ya en progreso o pueden implicar la prevención de la inducción de una respuesta inmunitaria. Las moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento pueden inhibir las funciones de células T activadas, tales como proliferación de linfocitos T, secreción de citocinas y/o producción de citocinas, suprimiendo respuestas de células T o induciendo tolerancia específica en células T, o ambas. Además, las moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento, que interfieren con la ruta CTLA4/CD28/B7 pueden inhibir la proliferación de células T y/o secreción de citocinas, y de este modo dar como resultado destrucción tisular reducida e inducción de insensibilidad de células T o anergia.

65

Las moléculas de CTLA4 mutante descritas en el presente documento comprenden al menos el dominio extracelular de CTLA4, o partes del mismo que se unen con CD80 y/o CD86. La parte extracelular de una molécula de CTLA4 mutante comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4; o figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6). Como alternativa, la parte extracelular de la CTLA4 puede comprender una secuencia de aminoácidos que comienza con alanina en la posición -1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4; o figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6).

Además, se describen en el presente documento moléculas solubles de CTLA4 mutante que son proteínas de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA4 que tiene una o más mutaciones en una región de una secuencia de aminoácidos que comienza con serina en +25 y termina con arginina en +33 (S25-R33). Por ejemplo, la alanina en la posición +29 de CTLA4 de tipo silvestre puede sustituirse con tirosina (codones: UAU, UAC). Como alternativa, la alanina puede sustituirse con leucina (codones: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG), fenilalanina (codones: UUU, UUC), triptófano (codón: UGG), o treonina (codones: ACU, ACC, ACA, ACG). Como entenderán fácilmente los expertos en la materia, el nucleótido uracilo (U) de la secuencia de ARN corresponde al nucleótido timina (T) de la secuencia de ADN.

Además, se ha descrito en el presente documento que las moléculas solubles de CTLA4 mutante son proteínas de fusión que comprenden el dominio extracelular de CTLA4 que tiene una o más mutaciones en o cerca de una región de una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en +97 y termina con glicina en +107 (M97-G107). Por ejemplo, leucina en la posición +104 de CTLA4 de tipo silvestre puede sustituirse con ácido glutámico (codones: GAA, GAG). Una molécula de CTLA4 mutante que tiene esta sustitución se denomina en el presente documento L104EIg (Figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6).

Además, se describen en el presente documento moléculas solubles de CTLA4 mutante que son proteínas de fusión que comprenden el dominio extracelular de CTLA4 que tiene una o más mutaciones en las regiones S25-R33 y M97-G107. Por ejemplo, una molécula de CTLA4 mutante puede comprender tirosina en la posición +29 en lugar de alanina; y ácido glutámico en la posición +104 en lugar de leucina. Una molécula de CTLA4 mutante que tiene estas sustituciones se denomina en el presente documento L104EA29YIg (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4). La molécula de ácido nucleico que codifica L104EA29YIg está contenida en pD16 L104EA29YIg y se depositó el 19 de junio de 2000 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (ATCC N.º PTA-2104). El vector pD16 L104EA29YIg es un derivado del vector pcDNA3 (INVITROGEN).

La molécula soluble de CTLA4 mutante para el uso médico de la invención puede comprender un dominio extracelular de un mutante de CTLA4 como se muestra en la Figura 7 (SEQ ID NO: 3 y 4), y un resto que altera la solubilidad, afinidad y/o valencia de la molécula de CTLA4 mutante.

De acuerdo con una práctica de la invención, el resto puede ser una región constante de inmunoglobulina o parte de la misma, por ejemplo, uno o más de un dominio CH1, bisagra, dominio CH2 o dominio CH3. Para uso *in vivo*, se prefiere que la región constante de inmunoglobulina no induzca una respuesta inmunitaria perjudicial en el sujeto. Por ejemplo, en protocolos clínicos, puede preferirse que las moléculas mutantes incluyan regiones constantes de inmunoglobulina humana o de mono o parte de las mismas. Los ejemplos de dominios de inmunoglobulina adecuados incluyen, pero sin limitación, IgC γ 1 (IgCgamma1), IgC γ 2 (IgCgamma2), IgC γ 3 (IgCgamma3), IgC γ 4 (IgCgamma4), IgC μ (IgCmu), IgC α 1 (IgCalfa1), IgC α 2 (IgCalfa2), IgC δ (IgCdelta) o IgC ϵ (IgCépsilon). Son posibles otros isotipos. Además, otras regiones constantes de inmunoglobulina o partes de la misma son posibles (preferentemente otras regiones constantes de inmunoglobulina débilmente o no inmunogénicas o parte de las mismas).

Para protocolos clínicos, se prefiere que el resto de inmunoglobulina no induzca una respuesta inmunitaria perjudicial en un sujeto. El resto preferido es la región constante de inmunoglobulina o parte de la misma, incluyendo las regiones constantes de inmunoglobulina humanas o de mono o partes de las mismas. Un ejemplo de una región de inmunoglobulina adecuada es C γ 1 humana, que incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, que pueden mediar en funciones efectoras tales como unión con receptores de Fc, mediar en citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o mediar en citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). El resto de inmunoglobulina puede tener una o más mutaciones en el mismo (por ejemplo, en el dominio CH2, para reducir las funciones efectoras tales como CDC o ADCC) donde la mutación modula la capacidad de unión de la inmunoglobulina con su ligando, aumentando o reduciendo la capacidad de unión de la inmunoglobulina con receptores de Fc. Por ejemplo, las mutaciones en el resto de inmunoglobulina pueden incluir cambios en cualquiera de o todos sus restos de cisteína dentro del dominio bisagra, por ejemplo, las cisteínas en las posiciones +130, +136 y +139 se sustituyen con serina (Figura 9, SEQ ID NO: 8). El resto de inmunoglobulina también puede incluir la prolina en la posición +148 sustituida con una serina, como se muestra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 8). Además, las mutaciones en el resto de inmunoglobulina pueden incluir las que tienen la leucina en la posición +144 sustituida con fenilalanina, leucina en la posición +145 sustituida con ácido glutámico, o glicina en la posición +147 sustituida con alanina. Los ejemplos de restos de inmunoglobulina incluyen los descritos y desvelados en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N.º 2002/0114814 A1 y 2004/0151725 A1, Patentes de Estados Unidos N.º 6.444.792 y 6.750.334 y documento WO 97/28267.

Otros restos incluyen marcadores polipeptídicos. Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen pero sin limitación la molécula p97, molécula env gp120, molécula E7 y 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: 447-52; Fujisaka, K., *et al.* (1994) *Virology* 204: 789-93). Otras moléculas para uso como marcadores 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: 203-212).

Las proteínas de fusión CTLA4Ig mutantes solubles para uso en el uso médico de la invención son preferentemente más reactivas con el antígeno CD80 y/o CD86 en comparación con CTLA4 de tipo silvestre. Un ejemplo es L104EA29YIg como se muestra en la Figura 7 (SEQ ID NO: 3 y 4).

En otra realización, la molécula soluble de CTLA4 mutante incluye un resto de aminoácido de unión, que está localizado entre la parte de CTLA4 y la parte de inmunoglobulina. El aminoácido de unión puede ser cualquier aminoácido, incluyendo glutamina. El aminoácido de unión puede introducirse por métodos de síntesis molecular o química conocidos en este campo.

En otra realización, la molécula soluble de CTLA4 mutante incluye la parte de inmunoglobulina (por ejemplo, dominios bisagra, CH2 y CH3), donde cualquiera de o todos los restos de cisteína, dentro del dominio bisagra de la parte de inmunoglobulina se sustituyen con serina, por ejemplo, las cisteínas en las posiciones +130, +136 o +139 (figura 7, SEQ ID NOS: 3 y 4). La molécula mutante también puede incluir la prolina en la posición +148 sustituida con una serina, como se muestra en la Figura 7 (SEQ ID NOS: 3 y 4).

La molécula soluble de CTLA4 mutante puede incluir una secuencia peptídica señal unida al extremo N terminal del dominio extracelular de la parte CTLA4 de la molécula mutante. El péptido señal puede ser cualquier secuencia que permita la secreción de la molécula mutante, incluyendo el péptido señal de 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 señal de cualquier proteína extracelular.

La molécula mutante puede incluir el péptido señal de oncostatina M unido al extremo N terminal del dominio extracelular de CTLA4, y la molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, bisagra, CH2 y CH3) unida con el extremo C terminal del dominio extracelular de CTLA4. Esta molécula incluye el péptido señal de oncostatina M que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene metionina en la posición -26 hasta alanina en las posiciones -1, la parte de CTLA4 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 parte de inmunoglobulina que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene ácido glutámico en la posición +126 hasta lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356.

Las moléculas solubles de CTLA4 mutante para el uso médico de la invención pueden obtenerse por métodos de síntesis molecular o química. Los métodos moleculares pueden incluir las siguientes etapas: introducir una célula hospedadora adecuada con una molécula de ácido nucleico que expresa y codifica la molécula soluble de CTLA4 mutante; cultivar la célula hospedadora introducida de este modo en condiciones que permiten que la célula hospedadora exprese las moléculas mutantes; y aislar las moléculas mutantes expresadas. La parte de péptido señal de la molécula mutante permite que las moléculas proteicas se expresen en la superficie celular y se secreten por la célula hospedadora. Las moléculas mutantes traducidas pueden experimentar modificación postraduccional, que implica escisión del péptido señal para producir una proteína madura que tiene la CTLA4 y las partes de inmunoglobulina. La escisión puede producirse después de la alanina en la posición -1, dando como resultado una molécula mutante madura que tiene metionina en la posición +1 como el primer aminoácido (Figura 7, (SEQ ID NO: 3 y 4). Como alternativa, la escisión puede producirse después de la metionina en la posición -2, dando como resultado una molécula mutante madura que tiene alanina en la posición -1 como el primer aminoácido.

Un experto en la materia sería consciente de que la expresión de L104EA29YIg en células de mamífero puede dar como resultado la producción de variantes N y C terminales, de modo que las proteínas producidas puedan tener la secuencia de aminoácidos de los restos: (i) +1 a +357, (ii) -1 a +357; (iii) +1 a +356 o (iv) -1 a 356 (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4).

Una realización preferida es el uso médico de una molécula soluble de CTLA4 mutante que tiene el dominio extracelular de CTLA4 humana unido con toda o una parte de una molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, bisagra, CH2 y CH3). Esta molécula preferida incluye la parte CTLA4 de la molécula soluble 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 parte de inmunoglobulina que abarca ácido glutámico en la posición +126 hasta lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356. La parte que tiene el dominio extracelular de CTLA4 está mutada de modo que la alanina en la posición +29 se sustituye con tirosina y leucina en la posición +104 se sustituya con ácido glutámico. La parte de inmunoglobulina de la molécula mutante puede mutarse, de modo que se sustituyan las cisteínas en las posiciones +130, +136 y +139 con serina, y la prolina en la posición +148 se sustituye con serina. Esta molécula mutante se designa en el presente documento L104EA29YIg (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4).

En otra realización, el L104EA29YIg es una molécula mutante que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 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 parte de inmunoglobulina que abarca ácido glutámico en la posición +126 (por ejemplo, +126 hasta lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356). La parte que tiene el dominio extracelular de CTLA4 se muta de modo que se reemplace alanina en la posición +29 con tirosina; y leucina en la posición +104 se reemplace con ácido glutámico. La parte de inmunoglobulina de la molécula mutante se muta de modo que las cisteínas en las posiciones +130, +136 y +139 se reemplacen con serina, y la prolina en la posición +148 se reemplaza con serina. Esta molécula mutante se designa en el presente documento L104EA29YIg (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4). Después de haberse escindido la secuencia señal, L104EA29YIg puede comenzar con una metionina en la posición +1 o comenzar con alanina en la posición -1.

Otra molécula mutante descrita en el presente documento es una molécula soluble de CTLA4 mutante que tiene el dominio extracelular de CTLA4 humana unido con la molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, bisagra, CH2 y CH3). Esta molécula incluye la parte de la secuencia de aminoácidos que codifica CTLA4 que comienza 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 parte de inmunoglobulina que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene ácido glutámico en la posición +126 hasta lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356. La parte que tiene el dominio extracelular de CTLA4 se muta de modo que se sustituya leucemia en la posición +104 con ácido glutámico. La parte de bisagra de la molécula mutante se muta de modo que las cisteínas en las posiciones +130, +136 y +139 se sustituyan con serina, y la prolina en la posición +148 se sustituya con serina. Esta molécula mutante se designa en el presente documento L104Elg (Figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6).

Como alternativa, una L104Elg puede ser una molécula de CTLA4 soluble que tiene un dominio extracelular de CTLA4 humana unido con una molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, bisagra, CH2 y CH3). Esta molécula incluye la parte de CTLA4 que abarca una secuencia de aminoácidos que comienza 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 parte de inmunoglobulina que abarca ácido glutámico en la posición +126 hasta lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356. La parte que tiene el dominio extracelular de CTLA4 se muta de modo que se sustituya leucina en la posición +104 con ácido glutámico. La parte bisagra de la molécula mutante se muta de modo que las cisteínas en las posiciones +130, +136 y +139 se sustituyan con serina, y la prolina en la posición +148 se sustituya con serina. Esta molécula mutante se designa en el presente documento L104Elg (Figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6).

En realizaciones adicionales de la invención, la molécula soluble de CTLA4 mutante tiene: (a) una primera secuencia de aminoácidos de una glucoproteína de membrana, por ejemplo, CD28, CD86, CD80, CD40 y gp39, que bloquea la proliferación de células T, fusionada con una segunda secuencia de aminoácidos; (b) siendo la segunda secuencia de aminoácidos un fragmento del dominio extracelular de CTLA4 mutante que bloquea la proliferación de células T, tal como, por ejemplo, una molécula de aminoácidos que comprende metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4); y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que actúa como un marcador de identificación o potencia la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la tercera secuencia de aminoácidos puede consistir esencialmente en restos de aminoácidos de las regiones bisagra, CH2 y CH3 de una molécula de inmunoglobulina no inmunogénica. Los ejemplos de moléculas de inmunoglobulina adecuadas incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulina humana o de mono, por ejemplo, IgC γ 1. También son posibles otros isotipos,

También se describe en el presente documento un método para tratar un trastorno inmunitario asociado a trasplante de injertos administrando a un sujeto una dosis eficaz de una molécula mutante de CTLA4 con un dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en SEQ ID NO: 8 que comienza con alanina en la posición 26 o metionina en la posición 27 y termina con ácido aspártico en la posición 150, o un parte del mismo. Adicionalmente, en el dominio extracelular o parte del mismo una alanina en la posición 55 se sustituye con una tirosina, y una leucina en la posición 130 se sustituye con un ácido glutámico. Además el régimen de administración comprende un régimen de fase temprana, en el que el régimen de fase temprana puede variar de los primeros 3 a 6 meses después del trasplante e implica una administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

Adicionalmente se describe en el presente documento un método para tratar un trastorno inmunitario asociado a trasplante de injertos administrando a un sujeto una dosis eficaz de una molécula de CTLA4 mutante con una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición 27 y termina con ácido aspártico en la posición 150 de SEQ ID NO: 4, o con una secuencia de aminoácidos que comienza con alanina en la posición 26 y termina con ácido aspártico en la posición 150 de SEQ ID NO: 4. Además el régimen de administración de molécula de CTLA4 mutante comprende un régimen de fase temprana, en el que el régimen de fase temprana puede variar de los primeros 3 a 6 meses después del trasplante e implica administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

Se describen moléculas de ácido nucleico adicionales que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos correspondientes a las moléculas solubles de CTLA4 mutante descritas en el presente documento. La molécula de ácido nucleico puede ser un ADN (por ejemplo, ADNc) o un híbrido del mismo. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico pueden ser ARN o un híbrido del mismo.

Las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento pueden estar comprendidas en un vector. Además, un sistema de vector hospedador se describe en el presente documento. El sistema de vector hospedador comprende el vector en una célula hospedadora adecuada. Los ejemplos de células hospedadoras adecuadas incluyen, pero sin limitación, células procariotas y eucariotas.

5 Además, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos que comprende dosis farmacéuticamente eficaces de moléculas solubles de CTLA4 mutante. Los trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos pueden estar mediados por interacciones de células CD28 y/o CLTA4 positivas con células CD80 y/o CD86 positivas. Las moléculas solubles de CTLA4 mutante son preferentemente moléculas de CTLA4 que tienen una o más mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4. La composición farmacéutica puede incluir moléculas proteicas solubles de CTLA4 mutante y/o moléculas de ácido nucleico y/o vectores que codifican las moléculas. En realizaciones preferidas, las moléculas solubles de CTLA4 mutante tienen la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la Figura 7 (SEQ ID NO: 3 y 4), L104EA29Y como se desvela en el presente documento. Las composiciones pueden incluir adicionalmente otros agentes terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, toxinas farmacológicas, enzimas, anticuerpos o conjugados.

20 Las composiciones farmacéuticas también incluyen preferentemente vehículos y adyuvantes adecuados que incluyen cualquier material que cuando se combina con la molécula de CTLA4 mutante para el uso médico de la invención (por ejemplo, una molécula soluble de CTLA4 mutante, tal como L104EA29Y) conserva la actividad de la molécula y no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos de vehículos y adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, albúmina de suero humano; agentes de intercambio iónico; alúmina; lecitina; sustancias tamponantes, tales como fosfatos; glicina; ácido sórbico; sorbato potásico; y sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina. Otros ejemplos incluyen cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato; agua; emulsiones, tales como emulsión de aceite/agua; y diversos tipos de agentes humectantes. Otros vehículos también pueden incluir soluciones estériles; comprimidos, incluyendo comprimidos y cápsulas recubiertos. Normalmente dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, magnesio o estearato de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas, glicoles u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos también pueden incluir aditivos saporíferos y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan por métodos convencionales bien conocidos. Dichas composiciones también pueden formularse dentro de diversas composiciones lipídicas, tales como, por ejemplo, liposomas así como en diversas composiciones poliméricas, tales como microesferas poliméricas.

35 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse usando modos convencionales de administración incluyendo, pero sin limitación, administración intravenosa (i.v.), administración intraperitoneal (i.p.), administración intramuscular (i.m.), administración subcutánea, administración oral, administración como supositorio o como un contacto tópico, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta tal como una bomba miniosmótica, al sujeto.

40 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden estar en diversas formas de dosificación que incluyen, pero sin limitación, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

45 Una composición farmacéutica típica para administración intravenosa (i.v.) se enumera a continuación.

Composición de producto farmacológico 100 mg/vial de L104EA29YIg liofilizado

Componente	Cantidad/Vial (mg) ^a
L104EA29YIg	110 ^a
Sacarosa	220
Fosfato sódico monobásico monohidratado	15,18
Cloruro sódico	2,55
Hidróxido sódico 1N	Ajustar a pH 7,5
Ácido clorhídrico 1N	Ajustar a pH 7,5
^a Cada vial contiene 10 % de sobrellenado para mantenimiento en vial, aguja y jeringa de la solución reconstituida	

50 El producto farmacológico liofilizado puede constituirse con un vehículo acuoso. El vehículo acuoso de interés en el presente documento es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, después de liofilización. Normalmente, el producto farmacológico liofilizado se constituye hasta aproximadamente 25 mg/ml con 10 ml de Agua Estéril para inyección, USP (SWFI) o Inyección de Cloruro Sódico 0,9 %, USP. La solución constituida se diluye adicionalmente hasta concentraciones de producto farmacológico entre 1 y 10 mg/ml con Inyección de Cloruro Sódico 0,9 %, USP. El

producto farmacológico diluido para inyección es isotónico y adecuado para administración por infusión intravenosa.

Puede añadirse un tensioactivo a la formulación en una cantidad suficiente para reducir o prevenir la interacción del producto farmacológico constituido con una jeringa con silicona.

El modo más eficaz de administración y régimen de dosificación para las composiciones descritas en el presente documento depende de la gravedad y la evolución de la enfermedad, la salud del paciente y la respuesta al tratamiento y el criterio del médico tratante. En consecuencia, las dosificaciones (también conocidas como dosis) de las composiciones deberían valorarse según el paciente individual.

Las moléculas solubles de CTLA4 mutante pueden administrarse a un sujeto en una cantidad, a una frecuencia durante un periodo de tiempo (por ejemplo, longitud de tiempo y/o múltiples tiempos) suficientes para bloquear la unión de moléculas B7 endógenas (por ejemplo, CD80 y/o CD86) con sus respectivos ligandos, en el sujeto. El bloqueo de unión de B7 endógeno/ligando inhibe por lo tanto las interacciones entre 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 sin limitación, el tipo de tejido afectado, el tipo de trastorno inmunitario asociado a el trasplante de injerto que se trata, la gravedad de la enfermedad, la salud de un sujeto y la respuesta de un sujeto al tratamiento con los agentes.

Las dosis de las moléculas de CTLA4 mutantes o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se basan en el peso corporal, y los regímenes de administración pueden dictarse por los perfiles de valle de suero diana. Normalmente, la concentración valle en suero diana de las moléculas de CTLA4 mutantes entre aproximadamente de 3 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml durante los primeros 3 a 6 meses después del trasplante serán suficientes para mantener la función del aloinjerto, preferentemente entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. La concentración valle de suero diana de moléculas de CTLA4 mutantes para el uso médico de la invención durante la fase de mantenimiento está entre aproximadamente 0,2 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml, preferentemente entre aproximadamente 0,25 µg/ml y aproximadamente 2,5 µg/ml.

Las moléculas de CTLA4 mutante descritas en el presente documento pueden administrarse en una cantidad entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20,0 mg/kg de peso del paciente, normalmente entra aproximadamente 1,0 y aproximadamente 15,0 mg/kg. Por ejemplo, L104EA29Y pueden administrarse a 10 mg/kg de peso del paciente durante la fase temprana, periodo de alto riesgo que sigue al trasplante y reducirse hasta 5 mg/kg de peso del paciente para una dosificación de mantenimiento.

La administración de las moléculas o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede realizarse en varias veces. Normalmente, los regímenes de administración incluyen una fase temprana, en la que las dosis son mayores y la frecuencia de administración aumenta durante el periodo de mayor riesgo inmunológico, seguido de una fase de mantenimiento. El régimen de fase temprana puede variar de los primeros 3 a 6 meses después del trasplante e implica la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente, preferentemente tan frecuente como diariamente, semanalmente o cada dos semanas dependiendo del riesgo inmunológico y/o la concentración valle en suero diana. La fase de mantenimiento comienza cuando termina la fase temprana e implica administración que no es más frecuente que mensualmente, y dura tanto como sea necesario, normalmente tanto como el paciente conserve el trasplante. Como se usa en el presente documento, el día 1 se define como el día del trasplante o el primer día de tratamiento con las moléculas de CTLA4 mutantes o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

La dosificación de moléculas de CTLA4 mutantes en la fase temprana es de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 mg/kg de peso del paciente, preferentemente de aproximadamente 10 mg/kg. La dosificación de moléculas de CTLA4 mutante en la fase de mantenimiento es de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 mg/kg de peso del paciente, preferentemente aproximadamente 5 mg/kg.

La fase temprana puede variar de los primeros 3 a 6 meses después del trasplante. El régimen de administración durante la fase temprana puede variar dependiendo del estado del receptor y/o del injerto. Por ejemplo, un régimen de fase temprana más intensivo se administraría a una dosis mayor de las moléculas de CTLA4 mutante o las composiciones farmacéuticas en la visita del día 1, día 5, semana 2 (por ejemplo, día 13-17), después cada dos semanas durante los primeros 3 meses (por ejemplo, en la visita de la semana 4, la visita de la semana 6, la visita de la semana 8, la visita de la semana 10 y la visita de la semana 12), seguido de administración mensual hasta la visita del mes 6 (por ejemplo, en la visita del mes 4, visita del mes 5 y visita del mes 6). Un ejemplo de un régimen de fase temprana más intensivo típico es la administración de 10 mg/kg de peso del paciente de L104EA29YIg en los días 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 y 160. Un régimen menos intensivo, por ejemplo, administraría las moléculas de CTLA4 mutantes o las composiciones farmacéuticas el día 1, en la visita de la semana 2, la visita de la semana 4, después mensualmente hasta la visita del mes 3. Un ejemplo de un régimen de fase temprana menos intensivo típico es la administración de 10 mg/kg de peso del paciente de L104EA29YIg los días 1, 15, 29, 57 y 85.

Normalmente, una fase temprana se sigue de una fase de mantenimiento en la que se administran dosis menores

de las moléculas de CTLA4 mutante o composiciones farmacéuticas a intervalos de uno a dos meses tanto tiempo como sea necesario, normalmente tanto tiempo como el paciente conserve el trasplante. Un ejemplo de la fase de mantenimiento para el régimen más intensivo descrito anteriormente incluye administración mensual de 5 mg/kg de peso del paciente de L104EA29Ylg comenzando en la visita del mes 7. Aunque un ejemplo de la fase de mantenimiento para el régimen menos intensivo anterior incluiría administración mensual de 5 mg/kg de peso del paciente de L104EA29Ylg comenzando en la visita del mes 4.

Como alternativa, un experto en la materia será capaz de modificar el régimen de administración en respuesta al estado de riesgo de los pacientes y/o respuesta a la terapia después del trasplante. Por ejemplo, la fase temprana del régimen menos intensivo descrito anteriormente podría modificarse añadiendo administración el día 5 al régimen, aumentando de este modo la frecuencia de administración durante el periodo de mayor riesgo inmunológico.

Como se usa en el presente documento, “cuatro semanas”, “mes”, “meses” o “mensualmente” se refiere a un periodo de 28 ± 5 días. Como se usa en el presente documento, “dos semanas” se refiere a un periodo de 14 ± 3 días.

Se requiere flexibilidad de los regímenes de administración para facilitar el programa de administración en las vidas de los receptores de trasplantes, manteniendo al mismo tiempo el perfil de valle diana de las moléculas de CTLA4 mutante. Las ventanas permitidas para administración de las dosis pueden ser las siguientes:

Visita	Ventana de visita
Día 1 y día 5	Con 96 horas de diferencia ± 6 horas
Semana 2	Fecha diana ± 2 días
Semana 4 – Mes 6	Fecha diana ± 3 días
del mes 7 en adelante	Fecha diana ± 5 días

La fecha diana es un resultado de la adición de la duración deseada a la fecha de visita real previa. La duración deseada para la visita de la semana 2 es de 10 días. La duración deseada es de 14 días para una visita planeada para dos semanas después de la visita previa, por ejemplo, una visita en la semana 6 después de una visita en la semana 4. La duración deseada es de 28 días para una visita planeada durante un mes o cuatro semanas desde la visita previa, por ejemplo, una visita del mes 4 después de una visita del mes 3. La duración deseada es de 56 días para una visita planeada para dos meses después de la visita previa, por ejemplo, una visita en el mes 8 después de una visita en el mes 6. Por ejemplo, una fecha de visita real del día 15 más 14 días da como resultado una fecha diana de la semana 4 del día 29. Basándose en las ventanas de visita anteriores, la administración puede realizarse el día 29 ± 3 días. Si la administración sucediera el día 26, ese día se convierte en la fecha de visita real utilizada para el cálculo de la siguiente fecha diana.

Los receptores con bajo riesgo de rechazo agudo normalmente incluyen los que reciben trasplantes de donantes emparentados vivos y receptores/donantes bastante coincidentes. Los receptores de alto riesgo de rechazo agudo incluyen los que reciben trasplantes de donantes marginales o retrasplantes, tienen paneles de anticuerpos altamente reactivos o son afroamericanos.

Además del riesgo inmediato de rechazo de trasplante agudo, el uso de fármacos de mantenimiento tales como inhibidores de calcineurina y esteroides a largo plazo da como resultado toxicidades que influyen negativamente en los resultados a largo plazo y la calidad de vida de los pacientes. Por ejemplo, los efectos secundarios de fármacos de mantenimiento incluyen nefrotoxicidad (NAC) que da como resultado degradación de la función renal y/o pérdida de injertos, y enfermedades cardiovasculares y metabólicas tales como hipertensión, hiperlipidemia y diabetes que dan como resultado enfermedad cardiovascular y muerte. Los efectos secundarios adicionales incluyen hirsutismo, alopecia, hiperplasia de las encías, temblores, neurotoxicidad y pérdida de hueso que dan como resultado falta de observancia y reducción de la calidad de vida. Las moléculas de CTLA4 mutantes o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse para evitar estos resultados, para reducir la incidencia, el desarrollo y/o la progresión de estos resultados cuando se tratan trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos o para tratar trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos en sujetos que tengan riesgo de tener estos resultados. Las moléculas de CTLA4 mutantes o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse para mejorar la función renal tal como se mide por VFG.

La administración de las moléculas de CTLA4 mutantes o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede ser mediante una infusión intravenosa de 30 minutos a una o más horas. Como alternativa, inyecciones subcutáneas de individuales a múltiples pueden suministrar la dosificación requerida. Normalmente, una infusión intravenosa de 30 minutos es la vía de administración utilizada durante la fase temprana de tratamiento cuando el paciente está en el hospital y/o realizando visitas programadas al profesional de cuidados sanitarios para supervisión. La inyección subcutánea es el modo de administración típico utilizado durante la fase de mantenimiento, permitiendo de este modo que el paciente vuelva a su programa normal reduciendo las visitas a un profesional de los cuidados sanitarios para infusiones intravenosas.

Además, un método para tratar un trastorno inmunitario asociado a trasplante de injertos en sujetos que han recibido una terapia inmunosupresora alternativa después del trasplante se describe en el presente documento. Los sujetos con una terapia inmunosupresora farmacéutica alternativa pueden cambiar o pasarse o modificar a una terapia que incluye las moléculas de CTLA4 mutantes o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, eliminando de este modo el fármaco alternativo. Normalmente el producto farmacéutico que va a eliminarse se reduce durante un periodo de tiempo apropiado, basándose en las instrucciones prescritas de ese fármaco específico, mientras que se administra al mismo tiempo las moléculas de CTLA4 mutante o composición farmacéutica descrita en el presente documento más frecuentemente que mensualmente. Una vez que el sujeto ha abandonado completamente el fármaco alternativo, el sujeto puede volver a un régimen de mantenimiento convencional utilizando las moléculas de CTLA4 mutantes o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Por ejemplo, un sujeto que recibe un régimen de CsA/MMF ± corticosteroides puede cambiar CsA a L104EA29YIg para un régimen de L104EA29YIg/MMF ± corticosteroides. El programa de administración de conversión puede incluir una reducción de la dosis de CsA durante dos meses y la administración de 5 mg/kg de L104EA29YIg cada dos semanas durante dos meses. Una vez que se ha eliminado el CsA, el sujeto entraría después en la fase de mantenimiento y continuaría recibiendo 5 mg/kg cada 4 u 8 semanas durante el transcurso del tratamiento en ausencia de CsA.

Las dosificaciones adecuadas para una molécula soluble de CTLA4 mutante desvelada en el presente documento que sea eficaz para bloquear las interacciones de B7 con su ligando y/o tratar una enfermedad del sistema inmunitario pueden basarse en el peso corporal, y los regímenes de administración pueden dictarse por los perfiles de valle en suero diana. Por ejemplo, las concentraciones valle en suero diana eficaces de moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento para tratar una enfermedad del sistema inmunitario pueden estar entre aproximadamente 0,2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml. Como alternativa, las moléculas solubles de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento pueden administrarse en una cantidad entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20,0 mg/kg de peso del paciente para tratar enfermedades del sistema inmunitario.

Además, se describen en el presente documento métodos para tratar trastornos inmunitarios asociados al trasplante de injertos. En estos métodos, los trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos pueden estar mediados por interacciones de células CD28 y/o CTLA4 positivas con células CD80/CD86 positivas. Además, en estos métodos, las interacciones de células T pueden inhibirse. Estos métodos comprenden administrar a un sujeto las moléculas solubles de CTLA4 mutante descritas en el presente documento para regular interacciones de células T con las células CD80 y/o CD86 positivas. Los ejemplos de trastornos inmunitarios asociados al trasplante de injertos se han analizado anteriormente.

Además, se describe en el presente documento un método para profilaxis de o inhibición o prevención de rechazos de trasplantes de órganos sólidos, tejidos, células y/o anatomía externa por un sujeto, siendo el sujeto un receptor de trasplante de órgano sólido, tejido, célula y/o anatomía externa. Normalmente, en trasplantes, el rechazo del injerto se inicia mediante su reconocimiento como ajeno por células T, seguido de una respuesta inmunitaria que destruye el injerto. Las moléculas solubles de CTLA4 mutante descritas en el presente documento, inhibiendo la proliferación de linfocitos T y/o secreción de citocinas, puede dar como resultado reducción de la destrucción tisular e inducción de insensibilidad de células T específicas de antígeno que pueden dar como resultado aceptación del injerto a largo plazo.

El estudio descrito en el Ejemplo 3 comparó la eficacia y seguridad de L104EA29YIg como un inmunosupresor de mantenimiento con ciclosporina (CsA) durante 12 meses cuando se usó como parte de un régimen de combinación sin ICN que consistía en inducción de basiliximab (Simulect[®]; Novartis), mofetil micofenolato (MMF; CellCept[®]; Roche) y corticosteroides en receptores de trasplante renal. Los objetivos incluyeron la evaluación de la incidencia del rechazo agudo (confirmado por biopsia o supuesto) a los 6 meses y 1 año; velocidad de filtración glomerular medida (VFG) mediante eliminación de Iohexol en 1, 6 y 12 meses; parámetros de hipertensión incluyendo colesterol y triglicéridos en suero; y seguridad general. Otros análisis pre-especificados incluían la muerte del paciente o pérdida de injerto al cabo de 1 año; la gravedad del rechazo agudo; la incidencia de diabetes mellitus posttrasplante [definida como cualquier terapia requerida para hiperglucemia durante ≥4 semanas, o una A1C de hemoglobina (HbA1c) >7 %, en pacientes que no se ha sabido previamente que sean diabéticos]; VFG calculada, usando las fórmulas de Modificación de Dieta en Enfermedad Renal (MDER, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-470), Jelliffe (RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. *Ann Intern Med.* 1973; 79: 604-605), Cockcroft-Gault (Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31-41), y Nankivell (Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. *Transplantation.* 1995; 59(12): 1683-1689); farmacocinética e inmunogenicidad. El diagnóstico y tratamiento de rechazo agudo (RA) se basó en los criterios y grado de Banff97 (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2): 713-23.). Se realizó análisis post hoc de la incidencia de nefropatía de aloinjerto crónica (NAC).

Este estudio de 12 meses demostró que la terapia de mantenimiento basada en L104EA29YIg confería eficacia equivalente en la prevención de RA y supervivencia de injerto y paciente similar en comparación con CsA. Además, L104EA29YIg demostró mejoras significativas en la función renal y reducciones de NAC en comparación con inmunosupresión de mantenimiento basado en CsA. L104EA29YIg fue segura y estuvo bien tolerada y no se asoció con toxicidades relacionadas con ICN típicas.

Se ha mostrado que la función renal mejorada durante el primer año después del trasplante se correlaciona con mejores resultados a largo plazo (Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney Int* 2002; 62(1): 311-8) ya que el uso a largo plazo de ICN está limitado por su nefrotoxicidad (Danovitch GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: a multiple choice question. *Kidney Int* 2001; 59(1): 388-402), lo que conduce a reducción de la función del injerto e insuficiencia renal con todos los problemas que lo acompañan. Por lo tanto, quizás los hallazgos más notables vistos con el tratamiento con L104EA29YIg son las VFG superiores acompañadas de la histología renal de 12 meses que muestra reducciones en el desarrollo y/o la progresión de NAC en comparación con CsA. Este fue un resultado sorprendente y la primera vez que se ha mostrado un hallazgo de este tipo en un ensayo de Fase II aleatorio de una terapia inmunosupresora. Ya que la conservación de la masa de nefronas, por prevención de lesiones inmunológicas, cardiovasculares y/o metabólicas contribuye a efectos beneficiosos tanto en la supervivencia del paciente como la del injerto es posible que L104EA29YIg pueda estar asociado a mejores resultados a largo plazo.

Estos problemas son particularmente importantes con el uso creciente de órganos de donantes o receptores de criterios ampliados ya que estos son particularmente susceptibles a toxicidad relacionada con ICN. La reducción de la incidencia de CV y acontecimientos metabólicos en pacientes que se han sometido a trasplante renal también es importante para mejorar los resultados a largo plazo.

Las moléculas de CTLA4 mutantes o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse para tratar trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos en sujetos que son receptores de criterios ampliados y/o que reciben injertos de donantes de criterios ampliados. Estos criterios, que se basan en parte en criterios presentados por la United Network of Organ Sharing (UNOS), pueden incluir uno o más de los siguientes: edad del donante menor de 10 o mayor de o igual a 60 años; donante después de muerte cardíaca; tiempo isquémico frío anticipado del órgano donante mayor de o igual a 24 horas; sujetos que se someten a trasplante por primera vez con una ARP \geq 50 %, o que se someten a retrasplante con ARP \geq 30 %; sujetos con pérdida de injerto previa debido a rechazo agudo durante los primeros 6 meses después del trasplante; sujetos con compatibilidad cruzada linfocitotóxica de células T positiva usando linfocitos donantes y suero de receptor; sujetos con infección por VIH; sujetos con tuberculosis activa que ha requerido tratamiento en los 3 años anteriores; u otros criterios presentados por la United Network of Organ Sharing (UNOS). Un ejemplo de posibles criterios ampliados para un donante y/o el riñón de un donante incluye al menos 1 de los siguientes criterios ampliados para donación de órganos a) edad del donante \geq 60 años b) edad del donante 50-59 años y uno de los siguientes: (i) accidente cerebrovascular (ACV) + hipertensión + SCr $>$ 1,5 mg/dl (ii) ACV + hipertensión (iii) ACV + SCr $>$ 1,5 mg/dl (iv) Hipertensión + SCr $>$ 1,5 mg/dl c) TIC \geq 24 horas, edad del donante $>$ 10 años d) Donante con muerte cardíaca (donante sin pulso cardíaco).

Los métodos para inhibir la enfermedad de injerto contra hospedador en un sujeto descrito en el presente documento pueden comprender administrar al sujeto una molécula soluble de CTLA4 mutante descrita en el presente documento, sola o junto, simultáneamente o secuencialmente con más ligandos adicionales, reactivos con IL-2, IL-2R, IL-4 o interferón γ . Por ejemplo, la molécula soluble de CTLA puede administrarse a un receptor de trasplante de médula ósea para inhibir la alorreactividad de células T donantes. Como alternativa, las células T donantes dentro de un injerto de médula ósea pueden hacerse tolerantes a aloantígenos de un receptor *ex vivo* antes del trasplante.

Las moléculas solubles de CTLA4 mutante para el uso médico de la invención, por ejemplo L104EA29Y, pueden administrarse como el único principio activo o junto, simultáneamente o secuencialmente con uno o más fármacos adicionales en regímenes inmunomoduladores, agentes inmunosupresores y/u otros agentes antiinflamatorios por ejemplo, para el tratamiento, la prevención o la inhibición o profilaxis de rechazo agudo o crónico de aloinjerto o xenoinjerto o para inducir tolerancia. Por ejemplo, puede usarse en combinación con un inhibidor de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A o FK506); un macrólido inmunosupresor (por ejemplo, tacrolimus, rapamicina, sirolimus) o un derivado del mismo (por ejemplo, 40-O-(2-hidoxi)etil-rapamicina, sirolimus, centicano); un agente de dirección a linfocitos (por ejemplo, FTY720) o un análogo del mismo (FK778, Jak-3), corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; leflunomida o un análogo de la misma; mizoribina; ácido micofenólico; mofetil micofenolato; 15-desoxispergualina o un análogo de la misma; anticuerpos monoclonales inmunosupresores (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), ligandos, anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo de los mismos 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 inmunomodulares (por ejemplo, CTLA4/CD28-Ig) u otros inhibidores de moléculas de adhesión (por ejemplo, mAb) o inhibidores de bajo peso molecular incluyendo antagonistas de 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 para CD40 y anticuerpos para CD40-L), tales como Chi220 (Patente de Estados Unidos 6.051.228) por ejemplo, en las indicaciones descritas anteriormente, por ejemplo la inducción de tolerancia.

5 Cuando las moléculas solubles de CTLA4 mutante se administran simultáneamente o secuencialmente junto con otra terapia inmunosupresora/inmunomoduladora, por ejemplo, como se especifica en el presente documento, las dosificaciones del inmunosupresor co-administrado o compuesto inmunomodulador, por supuesto variará dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, por ejemplo, si es un esteroide o una ciclosporina, del fármaco específico empleado, de la afección que se trate y así sucesivamente.

10 De acuerdo con lo anterior, se describen en el presente documento combinaciones terapéuticas, por ejemplo, un kit, por ejemplo, para uso en cualquier método como se ha definido anteriormente, que comprende una L104EA29YIg, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, para usar simultáneamente o en secuencia con al menos una composición farmacéutica que comprende un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador o antiinflamatorio. El kit puede comprender instrucciones para su administración.

15 De acuerdo con lo anterior, los métodos como se han definido anteriormente pueden comprender co-administración, por ejemplo, simultáneamente o en secuencia, de una dosis terapéuticamente eficaz de una molécula soluble de CTLA4 mutante descrita en el presente documento con agentes inmunosupresores. Los agentes inmunosupresores incluyen gp39 soluble (también conocido como ligando de CD40 (CD40L), CD 154, T-BAM, TRAP), CD29 soluble, 20 CD40 soluble, CD80 soluble (por ejemplo, ATCC 68627), CD86 soluble, CD28 soluble (por ejemplo, 68628), CD56 soluble, Thy-1 soluble, CD3 soluble, TCR soluble, VLA-4 soluble, VCAM-1 soluble, LECAM-1 soluble, ELAM-1 soluble, CD44 soluble, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con gp39 (por ejemplo, ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 y ATCC HB-12056), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD40 (por ejemplo, ATCC HB-9110), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con B7 (por 25 ejemplo, ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341, etc.), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD28 (por ejemplo, ATCC HB-11944 o mAb 9.3 como se describe en Martin *et al* (J. Clin. Immun. 4(1): 18-22, 1980), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con LFA-1 (por ejemplo, ATCC HB-9579 y ATCC TIB-213), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con LFA-2, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con IL-2 o IL-2R, 30 ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con IL-12, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con IFN-gamma, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD2, ligandos de anticuerpos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD48, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con cualquier ICAM (por ejemplo, ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 e ICAM-3), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CTLA4 (por ejemplo, ATCC HB-304), ligandos, anticuerpos o 35 fragmentos de anticuerpo reactivos con Thy-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD56, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD3, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD29, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con TCR, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con VLA-4, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con VCAM-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con LECAM-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con ELAM-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo reactivos con CD44. En ciertas realizaciones, se prefieren anticuerpos monoclonales. En otras realizaciones se prefieren fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen pero sin limitación Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv y anticuerpos de dominio (dAb) incluyendo pero sin limitación los descritos en el documento WO2006/030220. Como entenderán fácilmente los expertos en la materia, la combinación puede incluir las moléculas solubles de 45 CTLA4 mutante descritas en el presente documento y otro agente inmunosupresor, las moléculas solubles de CTLA4 mutante con otros dos agentes inmunosupresores, las moléculas de CTLA4 solubles con otros tres agentes inmunosupresores, etc. La determinación de la combinación y las dosificaciones óptimas pueden determinarse y optimizarse usando métodos bien conocidos en este campo.

50 Una combinación particularmente útil es L104EA29YIg o composición farmacéutica de la misma con un compuesto que interfiere con IL-2 y su ligando, específicamente un antagonista dirigido contra IL-2R (alfa) que se expresa selectivamente en la superficie de linfocitos T activados. Un compuesto que se une con IL-2R (alfa) inhibe de forma competitiva la activación mediada por IL-2 de linfocitos, que es una ruta crítica en la respuesta inmunitaria celular implicada en el rechazo de aloinjertos.

55 Algunas combinaciones específicas incluyen lo siguiente: L104EA29YIg y anticuerpos monoclonales CD80 (mAb); L104EA29YIg y mAb CD86; L104EA29YIg, mAb CD80, y mAb CD86; L104EA29YIg y mAb gp39; L104EA29YIg y mAb CD40; L104EA29YIg y mAb CD28; L104EA29YIg, mAb CD80 y CD86, y mAb gp39; L104EA29YIg, mAb CD80 y CD86 y mAb CD40; y L104EA29YIg, mAb anti-LFA1, y mAb anti-gp39. Un ejemplo específico de un mAb gp39 es MR1. Los expertos en la materia apreciarán y entenderán fácilmente otras combinaciones.

60 De acuerdo con lo anterior, los métodos como se han definido anteriormente pueden comprender co-administración, por ejemplo, simultáneamente o en secuencia, de una dosis terapéuticamente eficaz de molécula soluble de CTLA4 mutante descrita en el presente documento con un agente adyuvante y/o un corticosteroide. El objetivo es reemplazar los inhibidores de calcineurina tóxicos con las moléculas de CTLA4 mutantes. Sin embargo, las moléculas de CTLA4 mutantes también pueden co-administrarse simultáneamente o secuencialmente con ICN tales

como ciclosporina (Neoral[®], Sandimmune[®] de Novartis) y tacrolimus (FK506, Prograf[®] de Fujisawa).

Los ejemplos de agentes adyuvantes incluyen pero sin limitación inhibidores de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), por ejemplo, mofetil micofenolato (MMF, Cellcept[®] de Roche Laboratories) y ácido micofenólico (Myfortic[®] de Novartis); rapamicina (sirolimus, Rapamune[®] de Wyeth/Ayerst); azatioprina (Azarsan[®] de Salix, Imuran[®], genérico); un agente de dirección a linfocitos, por ejemplo, FTY720 (de Novartis); FK778 (de Fujisawa); Jak-3 (de Pfizer); y Certican[®] (everolimus de Novartis).

Los ejemplos de corticosteroides incluyen pero sin limitación betametasona, budesonida, cortisol, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

Las combinaciones de co-administración típicas incluyen pero sin limitación L104EA29Ylg y al menos un agente adyuvante seleccionado del grupo enumerado anteriormente: L104EA29Ylg y al menos un corticosteroide seleccionado del grupo enumerado anteriormente; L104EA29Ylg MMF (Cellcept de Roche) y un corticosteroide seleccionado del grupo enumerado anteriormente; L104EA29Ylg rapamicina (sirolimus, Rapamune[®] de Wyeth/Ayerst) con o sin un corticosteroide seleccionado del grupo enumerado anteriormente.

Las combinaciones de co-administración descritas anteriormente pueden utilizarse con un agente inductor tal como anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, basiliximab (Simulect[®] de Novartis), muromonab (Orthoclone OKT3[®] de Ortho Biotech), rituximab (Rituxan[®] de Genentech) y daclizumab (Zenapax[®] de Roche Labs); o globulina anti-timocitos (Thymoglobulin[®] de SangStat). Por ejemplo, las combinaciones adecuadas incluyen pero sin limitación basiliximab (Simulect[®] de Novartis) con L104EA29Ylg, MMF (Cellcept de Roche) y prednisolona; o daclizumab (Zenapax[®] de Roche), L104EA29Ylg y rapamicina (sirolimus, Rapamune[®] de Wyeth/Ayerst).

Normalmente, las dosificaciones convencionales y el régimen de administración de los fármacos co-administrados descritos anteriormente no se ven influidos por la adición de las moléculas de CTLA4 mutante al régimen de tratamiento. Sin embargo, un experto en la materia puede recetar dosis menores de los fármacos co-administrados, por ejemplo, agentes adyuvantes y/o corticosteroides, debido a la incorporación de las moléculas de CTLA4 mutante menos tóxicas descritas en el presente documento al régimen de tratamiento.

La información de prescripción puede basarse en el prospecto para cada fármaco o administrado. Un corticosteroide puede co-administrarse con las moléculas de CTLA4 mutantes o la composición farmacéutica descrita en el presente documento. Por ejemplo, los sujetos pueden tratarse diariamente con corticosteroides. Una estrategia de mantenimiento y reducción progresiva de esteroides puede incluir 500 mg i.v. de metilprednisolona al llegar al quirófano (OR) 250 mg i.v. de metilprednisolona el día 2, seguido de prednisona (o prednisolona) 100 mg por vía oral el día 3, seguido de una reducción progresiva de prednisona (o prednisolona) hasta 20-30 mg/día para el final de la semana 2, seguido de una reducción progresiva de prednisona (o prednisolona) hasta no menos de 2,5 mg/día hasta el mes 6. Los sujetos pueden seguir tomando al menos 2,5 mg/día durante el transcurso de su tratamiento.

Los fármacos co-administrados adicionales pueden incluir mofetil micofenolato (MMF). Normalmente MMF se administra en 2 dosis divididas en un programa uniforme en relación con el momento del día y las comidas. Un ejemplo de un régimen de administración para MMF incluye 2 g al día. La primera dosis puede administrarse de forma preoperatoria. Pueden administrarse dosis posteriores p.o. tan pronto como el sujeto sea capaz de tolerar medicaciones por la boca. La dosis y el programa pueden ajustarse basándose en los valores de laboratorio (por ejemplo, WBC reducidos) y la tolerabilidad del sujeto. El prospecto proporciona información de prescripción completa.

Otro fármaco co-administrado puede incluir basiliximab. Basiliximab reconstituido (20 mg en 5 ml) puede diluirse hasta un volumen de 50 ml con solución salina normal o dextrosa al 5 % y administrarse como una infusión i.v. durante 20-30 minutos. La primera dosis de 20 mg puede administrarse el Día 1 (el día del trasplante). La segunda dosis de 20 mg puede proporcionarse el Día 5. El prospecto proporciona información de prescripción completa.

Se describen además combinaciones terapéuticas, por ejemplo, un kit, por ejemplo, para uso en cualquier método como se ha definido anteriormente, que comprende una L104EA29Ylg, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, para usar simultáneamente una secuencia con al menos una composición farmacéutica que comprende un agente adyuvante y corticosteroides. El kit puede comprender instrucciones para su administración.

La etiqueta y/o las instrucciones pueden indicar que la composición farmacéutica puede usarse sola, o en combinación, simultáneamente o secuencialmente con un segundo agente para tratar una afección elegida, por ejemplo, enfermedades del sistema inmunitario, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunoproliferativas, trastornos inmunitarios asociados a trasplante de injertos como se ha descrito anteriormente.

La etiqueta puede indicar las dosificaciones apropiadas para las moléculas desveladas en el presente documento. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que las dosificaciones para una molécula que es eficaz para bloquear las

interacciones de B7 con su ligando y/o tratar una enfermedad del sistema inmunitario puede basarse en el peso corporal y los regímenes de administración pueden dictarse por los perfiles de valle en suero diana. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que las concentraciones de valle en suero diana eficaces de moléculas de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento para tratar una enfermedad del sistema inmunitario pueden estar entre aproximadamente 0,2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml. Como alternativa, la etiqueta puede indicar que las moléculas de CTLA4 mutante desveladas en el presente documento pueden administrarse en una cantidad entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20,0 mg/kg de peso del paciente para tratar enfermedades del sistema inmunitario.

10 Métodos para producir las moléculas de CTLA4 mutantes

Puede haber expresión de moléculas de CTLA4 mutantes en células procariotas. Los procariotas se representan más frecuentemente por diversas cepas de bacterias. Las bacterias pueden ser gram positivas o gram negativas. Normalmente, se prefieren bacterias gram negativas tales como *E. coli*. También pueden usarse otras cepas microbianas.

Pueden insertarse secuencias que codifican moléculas de CTLA4 mutante en un vector diseñado para expresar secuencias ajenas en células procariotas tales como *E. coli*. Estos vectores pueden incluir secuencias de control procariotas usadas habitualmente que se define en el presente documento que incluyen promotores para inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de sitios de unión a ribosomas, incluir promotores usados habitualmente tales como los sistemas promotores de 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 de P_L derivado de lambda y sitio de unión a ribosoma del gen N (Shimatake, *et al.*, (1981) *Nature* 292: 128).

Dichos 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 modo que los vectores puedan replicarse en bacterias y las células que portan los plásmidos pueden seleccionarse para cuando se cultivan en presencia de antibióticos, tales como ampicilina o kanamicina.

El plásmido de expresión puede introducirse en células procariotas mediante diversos métodos convencionales, incluyendo pero sin limitación 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.

Las células eucariotas también son células hospedadoras adecuadas. Los ejemplos de células eucariotas incluyen cualquier célula animal, bien primaria o bien inmortalizada, células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*), y células vegetales. Las células de mieloma, COS y CHO son ejemplos de células animales que pueden usarse como hospedadores. Las células CHO particulares incluyen, pero sin limitación, 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 Tet-On CHO-K1 (Clontech), CHO designadas ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), clon 13 de CHO (GEIMG, Génova, IT), clon B de CHO (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido) y RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido). Las células vegetales a modo de ejemplo incluyen células de tabaco (plantas completas, cultivo celular o callo), maíz, soja y arroz. También son aceptables semillas de maíz, soja y arroz.

También pueden insertarse secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas de CTLA4 mutante en un vector diseñado para expresar secuencias ajenas en un hospedador eucariota. Los elementos reguladores del vector pueden variar según el hospedador eucariota particular.

Las secuencias de control eucariotas habitualmente usadas para uso en vectores de expresión incluyen promotores y secuencias de control compatibles con células de mamífero tales como, por ejemplo, promotor de CMV (vector CM8) y virus de sarcoma aviar (VSA) (vector π LN). Otros promotores habitualmente usados incluyen los promotores temprano y tardío de Virus de Simio 40 (SV40) (Fiers, *et al.*, (1973) *Nature* 273: 113), u otros promotores víricos tales como los derivados de polioma, Adenovirus 2, y virus del papiloma bovino. También puede usarse un promotor inducible, tal como hMTII (Karin, *et al.*, (1982) *Nature* 299: 797-802).

Los vectores para expresar moléculas de CTLA4 mutante en eucariotas también pueden portar secuencias denominadas regiones potenciadoras. Estas son importantes para optimizar la expresión génica y se encuentran bien cadena arriba o bien cadena abajo de la región promotora.

Los ejemplos de vectores de expresión para células hospedadoras eucariotas incluyen, pero sin limitación, 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 retrovíricos (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) o formas modificadas de los mismos, vectores adenovíricos; vectores de virus adeno-asociados, vectores de baculovirus,

vectores de levadura (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican moléculas de CTLA4 mutantes pueden integrarse en el genoma de la célula hospedadora eucariota y replicar a medida que replica el genoma hospedador. Como alternativa, el vector que porta moléculas de CTLA4 mutantes puede contener orígenes de replicación que permiten la replicación extracromosómica.

Para expresar las secuencias de ácido nucleico en *Saccharomyces cerevisiae*, el origen de replicación del plásmido de levadura endógeno, puede usarse el círculo 2 μ . (Broach, (1983) Meth. Enz. 101: 307). Como alternativa, pueden usarse secuencias del genoma de levadura capaces 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).

Las secuencias de control de la transcripción para vectores de levadura incluyen promotores para la síntesis de enzimas glucolíticas (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 de CMV proporcionado en el vector CDM8 (Toyama y Okayama, (1990) FEBS 268: 217-221); el promotor para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, (1980) J. Biol. Chem. 255: 2073), y los de otras enzimas glucolíticas.

Otros promotores son inducibles porque pueden regularse por estímulos ambientales o el medio de cultivo de las células. Estos promotores inducibles incluyen los de los genes para proteínas de choque térmico, alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas asociadas a catabolismo del nitrógeno y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

También pueden colocarse secuencias reguladoras en el extremo 3' de las secuencias codificantes. Estas secuencias pueden actuar para estabilizar ARN mensajero. Dichos terminadores se encuentran en la región no traducida 3' después de las secuencias codificantes en varios genes derivados de levadura y mamífero.

Los vectores a modo de ejemplo para plantas y células vegetales incluyen, pero sin limitación, plásmidos de *Agrobacterium Ti*, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico dorado del tomate (TGMV).

Se han descrito aspectos generales de las transformaciones del sistema hospedador de células de mamífero en Axel (Patente de Estados Unidos N.º 4.399.216 expedida el 16 de agosto de 1983). Las células de mamífero pueden transformarse por métodos que incluyen pero sin limitación, transfección en presencia de fosfato cálcico, microinyección, electroporación o mediante transducción con vectores víricos.

Los métodos para introducir secuencias de ADN ajeno en genomas vegetales y de levadura incluyen (1) métodos mecánicos, tales como microinyección de ADN en células individuales o protoplastos, agitación vorticial de células con perlas de vidrio en presencia de ADN, o disparo de esferas de wolframio u oro recubiertas de ADN a células o protoplastos; (2) introducción de ADN haciendo las membranas celulares permeables a macromoléculas mediante tratamiento con polietilenglicol o sometimiento a pulsos eléctricos de alta tensión (electroporación); o (3) el uso de liposomas (que contienen ADNc) que se fusionan con membranas celulares.

La expresión de moléculas de CTLA4 mutantes puede detectarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las moléculas mutantes pueden detectarse por tinción de Coomassie de geles de SDS-PAGE e inmunotransferencia usando anticuerpos que se unen a CTLA4. Puede realizarse recuperación de proteínas usando medios de purificación de proteínas convencionales, por ejemplo, cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico, para producir producto sustancialmente puro (R. Scopes en: "Protein Purification, Principles and Practice", Tercera Edición, Springer-Verlag (1994)).

Las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Número de Publicación de Estados Unidos 2005/0019859, 2005/0084933 y WO 04/058944 enseñan procesos para la producción de proteínas, específicamente productos glucoproteicos recombinantes, por cultivos celulares animales o mamíferos.

Pueden producirse moléculas solubles de CTLA4 mutante como se describe en el presente documento.

Mutagénesis basada en codones de CTLA4IG

Se usó mutagénesis dirigida y un nuevo procedimiento de cribado para identificar varias mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4 que mejoran la avidéz de unión por CD86. En este contexto, se llevaron a cabo mutaciones en restos en las regiones del dominio extracelular de CTLA4 de serina 25 a arginina 33, la cadena C' (alanina 49 y treonina 51), la cadena F (lisina 93, ácido glutámico 95 y leucina 96) y en la región de metionina 97 a tirosina 102, tirosina 103 a glicina 107 y en la cadena G en las posiciones glutamina 111, tirosina 113 e isoleucina 115. Estos sitios se eligieron basándose en estudios de proteínas de fusión CD28/CTLA4 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 al disolvente, y una falta de identidad u homología de restos de aminoácidos en ciertas posiciones entre

CD28 y CTLA4. Además, cualquier resto que esté espacialmente en proximidad estrecha (de 5 a 20 Unidades de Angstrom) de los restos identificados se considera parte de la presente descripción.

Para sintetizar y explorar moléculas solubles de CTLA4 mutante con afinidades alteradas por CD80 y/o CD86, se adoptó una estrategia de dos etapas. Los experimentos implicaron en primer lugar generar una biblioteca de mutaciones en un codón específico de una parte extracelular de CTLA4 y después explorar estas mediante análisis de BIAcore para identificar mutantes con reactividad alterada a CD80 o CD86. El sistema de ensayo de BIAcore (Pharmacia, Piscataway, N.J.) usa un sistema detector de resonancia de plasmón superficial que esencialmente implica la unión covalente de CD80Ig o CD86Ig con una microplaca sensora recubierta con dextrano que está localizada en un detector. La molécula de ensayo puede después inyectarse en la cámara que contiene la microplaca sensora y puede evaluarse la cantidad de proteína complementaria que se une basándose en el cambio de masa molecular que está físicamente asociado al lado recubierto con dextrano de la microplaca sensora; el cambio de la masa molecular puede medirse por el sistema detector.

15 **Ventajas de las moléculas de CTLA4 mutante**

Debido a que la unión de CTLA4 con CD80 y CD86 se caracteriza por velocidades de asociación rápidas y velocidades de disociación ("off") rápidas, y debido a que los complejos de CTLA4Ig-CD86 se disocian de aproximadamente 5 a 8 veces más rápido que complejos de CTLA4Ig-CD80, se ha razonado que la ralentización de la velocidad de disociación de CTLA4Ig de CD80 y/o CD86 daría como resultado moléculas con propiedades inmunosupresoras más potentes. Por lo tanto, se espera que las moléculas solubles de CTLA4 mutante que tengan una mayor avidéz por células CD80 o CD86 positivas en comparación con CTLA4 de tipo silvestre, o formas no mutadas de CTLA4Ig, bloqueen la sensibilización de células activadas por antígeno específico con mayor eficacia que CTLA4 de tipo silvestre o formas no mutadas de CTLA4Ig.

25 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto en la materia a preparar y usar la misma. No se pretende que los ejemplos limiten de otro modo de ninguna manera el alcance de la invención.

30 **Ejemplo 1**

Este ejemplo proporciona una descripción de los métodos usados para generar las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas solubles de CTLA4 mutante descritas en el presente documento. Se generó un mutante de un único sitio L104EIg y se ensayó con respecto a cinética de unión por CD80 y/o CD86. La secuencia de nucleótidos de L104EIg se usó como un molde para generar la secuencia de CTLA4 mutante de doble sitio, L104EA29YIg, que se ensayó con respecto a cinética de unión para CD80 y/o CD86.

40 **Mutagénesis basada en codones de CTLA4Ig**

Se desarrolló una estrategia de mutagénesis y cribado para identificar moléculas de CTLA4Ig mutante que tuvieron velocidades de disociación (velocidades "off") más lentas de moléculas CD80 y/o CD86. Se generaron secuencias de nucleótidos de mutantes de un único sitio usando CTLA4Ig (Patentes de Estados Unidos N.º: 5.844.095; 5.851.795; y 5.885.796; N.º de Referencia de ATCC 68629) como un molde. Los cebadores de PCR de oligonucleótidos mutagénicos 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 conocido como NNG/T). De esta manera, un codón específico que codifique un aminoácido podría mutarse aleatoriamente para codificar cada uno de los 20 aminoácidos. A este respecto, la mutagénesis de XXG/T produce 32 codones potenciales que codifican cada uno de los 20 aminoácidos. Se digirieron los productos de PCR que codifican mutaciones en proximidad estrecha a M97-G107 de CTLA4Ig (véase Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4; o figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6), con SacI/XbaI y se subclonaron en vector de expresión CTLA4Ig π LN (también conocido como piLN) cortado de forma similar. Este método se usó para generar la molécula de CTLA4 mutante de un único sitio L104EIg (Figura 8, SEQ ID NO: 5 y 6).

Para mutagénesis en proximidad a S25-R33 de CTLA4Ig, se introdujo en primer lugar un sitio de restricción de NheI silencioso 5' de este bucle, mediante mutagénesis dirigida por cebador de PCR. Los productos de PCR se digirieron con NheI/XbaI y se subclonaron en vectores de expresión de CTLA4Ig o L104EIg cortados de forma similar. Este método se usó para generar la molécula de CTLA4 mutante de doble sitio L104EA29YIg (Figura 7, SEQ ID NO: 3 y 4). En particular, la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de CTLA4 mutante de un único sitio, L104EIg, se usó como un molde para generar la molécula de CTLA4 mutante de doble sitio, L104EA29YIg. El vector piLN que tiene la L104EA29YIg se muestra en la Figura 12.

Ejemplo 2

A continuación se proporciona una descripción de los métodos de cribado usados para identificar los polipéptidos de CTLA4 mutantes de sitio doble e individual, expresados a partir de las construcciones descritas en el Ejemplo 1, que mostraron una mayor avidéz de unión por antígenos CD80 y CD86, en comparación con moléculas de CTLA4Ig no mutadas.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* actuales indican que CTLA4Ig en sí mismo es incapaz de bloquear completamente la sensibilidad de células T activadas por antígeno específico. Los estudios *in vitro* con CTLA4Ig y anticuerpo monoclonal específico para CD80 o CD86 que miden la inhibición de la proliferación de 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, lo que indica que CTLA4Ig no era tan eficaz en el bloqueo de interacciones de CD86. Estos datos apoyan hallazgos anteriores de Linsley *et al.* (Immunity, (1994), 1: 793-801) que mostraban que la inhibición de respuestas celulares mediadas por CD80 requería aproximadamente 100 veces menos concentraciones de CTLA4Ig que para respuestas mediadas por CD86. Basándose en estos hallazgos, se supuso que las moléculas solubles de CTLA4 mutante que tienen una mayor avidéz por CD86 que CTLA4 de tipo silvestre deberían tener mejor capacidad de bloquear la sensibilización de células activadas por antígenos específicos que CTLA4Ig.

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

Se transfectaron células COS con ADN plasmídico purificado por miniprep individual y se propagaron durante varios días. Se aplicó medio de cultivo acondicionado durante tres días a microplacas biosensoras BIAcore (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) recubiertas con CD80Ig o CD86Ig solubles. La unión específica y disociación de proteínas mutantes se midió por 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 microplacas sensoras NCM5 de uso en investigación (Pharmacia) usando acoplamiento de N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimida N-hidroxisuccinimida convencional (Johnsson, B., *et al.* (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277; Khilko, S.N., *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268: 5425-15434).

Método de cribado

Se transfectaron de forma transitoria células COS que habían crecido en placas de cultivo tisular de 24 pocillos con ADN que codificaba CTLA4Ig mutante. Se recogió el medio de cultivo que contenía CTLA4Ig mutantes solubles secretados 3 días después.

Se permitió que el medio de cultivo de células COS acondicionado fluyera sobre microplacas biosensoras BIAcore derivatizadas con CD86Ig o CD80Ig (como se describe en Greene *et al.*, 1996 J. Biol. Chem. 271: 26762-26771), y se identificaron moléculas mutantes con velocidades de "disociación" más lentas que las observadas para CTLA4Ig de tipo silvestre. Los ADNc correspondientes a muestras de medios seleccionados se secuenciaron y se preparó ADN para realizar transfección transitoria de células COS a mayor escala, a partir de lo cual se preparó proteína CTLA4Ig mutante después de purificación de proteína A del medio de cultivo.

Se realizaron análisis de datos de unión en equilibrio y condiciones de análisis BIAcore 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 de BIAcore

Se normalizaron las líneas basales en sensogramas a unidades de respuesta cero (UR) antes del análisis. Las muestras se procesaron sobre celdas de flujo derivatizadas de forma simulada para determinar los valores de unidades de respuesta (UR) de fondo debido a diferencias del índice refractario masivo entre soluciones. Se calcularon las constantes de disociación en equilibrio (K_d) a partir de representaciones de R_{eq} frente a C, donde R_{eq} es la respuesta de estado estacionario menos la respuesta de una microplaca derivatizada de forma simulada, y C es la concentración molar del analito. Se analizaron curvas de unión usando software de ajuste de curvas no lineal comercial (Prism, Software GraphPAD).

Los datos experimentales se ajustaron en primer lugar a un modelo para unión del único ligando con un único receptor (modelo de 1 sitio, es decir, un sistema de langmuir sencillo, $A+B \leftrightarrow AB$), y se calcularon las constantes de asociación en equilibrio ($K_d = [A] \cdot [B] / [AB]$) a partir de la ecuación $R = R_{máx} \cdot C / (K_d + C)$. Posteriormente, los datos se ajustaron al modelo de dos sitios más sencillo de unión a ligando (es decir, a un receptor que tiene dos sitios de unión independientes que no interactúan como se describe por la ecuación $R = R_{máx1} \cdot C / (K_{d1} + C) + R_{máx2} \cdot C / (K_{d2} + C)$).

La bondad de ajuste de estos dos modelos se analizó visualmente por comparación con datos experimentales y estadísticamente por un ensayo de F de las sumas de cuadrados. El modelo de un sitio más sencillo se eligió como el mejor ajuste, a no ser que el modelo de dos sitios se ajustara significativamente mejor ($p < 0,1$).

- 5 Se realizaron análisis de asociación y disociación usando software BIA evaluation 2.1 (Pharmacia). Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_{on} de dos maneras, suponiendo tanto interacciones de un único sitio homogéneas como interacciones de dos sitios paralelas. Para interacciones de un único sitio, se calcularon los valores de k_{on} de acuerdo con la ecuación $R_t = R_{eq}(1 - \exp^{-k_s(t-t_0)})$, donde R_t es una respuesta en un momento 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
- 10 es una concentración de analito, calculada con respecto a sitios de unión monoméricos. Para interacciones de dos sitios se calcularon los valores de k_{on} según la ecuación $R_t = R_{eq1}(1 - \exp^{-k_s1(t-t_0)}) + R_{eq2}(1 - \exp^{-k_s2(t-t_0)})$. Para cada modelo, los valores de k_{on} se determinaron a partir de la pendiente calculada (hasta aproximadamente 70 % de asociación máxima) de representaciones de k_s frente a C .
- 15 Los datos de disociación se analizaron de acuerdo 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. Se usó el modelo de sitio de unión excepto cuando los residuos eran mayores que el fondo de máquina (2-10 UR, de acuerdo con la máquina), en cuyo caso se empleó el modelo de dos sitios de unión. Se calcularon los semitiempos de ocupación del receptor usando la relación $t_{1/2} = 0,693/k_{off}$.
- 20

Citometría de flujo

- Se obtuvo mAb murino L307.4 (anti-CD80) de Becton Dickinson (San Jose, California) e IT2.2 (anti-B7-0 [también conocido como CD86]), de Pharmingen (San Diego, California). Para inmunotinción, se retiraron CHO CD80-positivas y/o CD86 positivas de sus vasos de cultivo por incubación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía EDTA 10 mM. Se incubaron en primer lugar células CHO ($1-10 \times 10^5$) con mAb o proteínas de fusión de inmunoglobulina en DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) 10 %, después se lavaron y se incubaron con reactivos de segunda etapa de inmunoglobulina anti-ratón o anti-humano de cabra conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Tago, Burlingame, California). Se proporcionó a las células un lavado final y se analizaron en un FACSscan (Becton Dickinson).
- 25
- 30

SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño

- Se realizó SDS-PAGE en geles de acrilamida de Tris/glicina 4-20 % (Novex, San Diego). Se tiñeron geles analíticos con Azul de Coomassie, y se obtuvieron imágenes de geles húmedos por escaneado digital. Se analizaron CTLA4Ig (25 μ g) y L104EA29YIg (25 μ g) por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna SK-GEL G300 SW_{XL} (7,8 x 300 mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrada en solución salina tamponada con fosfato que contenía NaN_3 0,02 % a un caudal de 1,0 ml/min.
- 35

CTLA4X_{C120S} y L104EA29YX_{C120S}

- Se preparó CTLA4X_{C120S} monocatenario como se ha descrito previamente (Linsley *et al.*, (1995) J. Biol. Chem., 270: 15417-15424). Brevemente, se usó un plásmido de expresión de CTLA4 de oncostatina M (OMCTLA4), como un molde, el cebador directo, GAGGTGATAAAGCTTACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG se eligió para adaptarse a las secuencias del vector; y el cebador inversor, GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC correspondía a los últimos siete aminoácidos (es decir, los aminoácidos 118-124) en el dominio extracelular de CTLA4 y contenía un sitio de enzima de restricción y un codón de terminación (TGA). El cebador inverso especificó una mutación C120S (cisteína a serina en la posición 120). En particular, la secuencia GCA (nucleótidos 34-36) del primer cebador mostrado anteriormente se reemplaza con una de las siguientes secuencias de nucleótidos: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT o GCT. Como entenderán los expertos en la materia, la secuencia de nucleótidos GCA es una secuencia complementaria invertida del codón TGC para cisteína. De forma similar, las secuencias de nucleótidos AGA, GGA, TGA, CGA, ACT o GCT son las secuencias complementarias invertidas de los codones de serina. Los productos de reacción en cadena de la polimerasa se digirieron con *HindIII/XbaI* y se subclonaron direccionalmente en el vector de expresión π LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). Se preparó L104EA29YX_{C120S} de una manera idéntica. Cada construcción se verificó por secuenciación de ADN.
- 40
- 45
- 50
- 55

Identificación y caracterización bioquímica de mutantes de alta avidéz

- Se eligieron veinticuatro aminoácidos para mutagénesis y las ~2300 proteínas mutantes resultantes se ensayaron con respecto a unión de CD86Ig por resonancia de plasmón superficial (RPS; como se ha descrito anteriormente). Los efectos predominantes de la 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 los restos M97-Y102 aparentemente dio como resultado reducción de la unión a ligando. La mutagénesis de los restos S25, A29, y T30, K93, L96, Y103, L104 y G105 dio como resultado proteínas con velocidades de "asociación" lentas y/o "disociación" lentas. Estos resultados confirman los hallazgos previos de que los restos en la región S25-R33, y restos en o cerca de M97-Y102 influyen en la unión a ligando (Peach *et al.*, (1994) J. Exp. Med., 180: 2049-2058).
- 60
- 65

La mutagénesis de los sitios S25, T30, K93, L96, Y103 y G105 dio como resultado la identificación de algunas proteínas mutantes que tenían velocidades de “disociación” más lentas de CD86Ig. Sin embargo, en estos casos, la velocidad de “disociación” lenta estuvo comprometida por una velocidad de “asociación” lenta que dio como resultado proteínas mutantes con una avidéz general por CD86Ig que era aparentemente similar a la vista con CTLA4Ig de tipo silvestre. Además, la mutagénesis de K93 dio como resultado agregación significativa que puede haber sido responsable de los cambios cinéticos observados.

La mutagénesis aleatoria de L104 seguida de transfección de células COS y cribado por RPS de muestras de medio de cultivo sobre CD86Ig inmovilizada produjo seis muestras de medio que contenían proteínas mutantes con velocidad de “disociación” aproximadamente 2 veces más lenta que 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 a la unión de CD86Ig.

Después se repitió la mutagénesis en cada sitio enumerado en la Tabla II, esta vez usando L104E como el molde de PCR en lugar de CTLA4Ig de tipo silvestre, como se ha descrito anteriormente. El análisis de RPS, usando de nuevo CD86Ig inmovilizada, identificó seis muestras de medios de cultivo de mutagénesis de alanina 29 con proteínas que tenían velocidades de “disociación” aproximadamente 4 veces más lentas que CTLA4Ig de tipo silvestre. Las dos más lentas fueron sustituciones de tirosina (L104EA29Y), dos fueron de leucina (L104EA29L), una fue de triptófano (L104EA29W), y una fue de treonina (L104EA29T). Aparentemente, no se identificó ningún mutante de velocidad de “disociación” lenta cuando la alanina 29 se mutó aleatoriamente, sola, en CTLA4Ig de tipo silvestre.

La masa molecular relativa y el estado de agregación de L104E purificado y L104EA29YIg se evaluaron por SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño. L104EA29YIg (~1 µg; carril 3) y L104EIg (~1 µg; carril 2) aparentemente tenían la misma movilidad electroforética que CTLA4Ig (~1 µg; carril 1) en condiciones reductoras (~50 kDa; +βME; más 2-mercaptoetanol) y no reductoras (~100 kDa; -βME) (FIG. 10A). La cromatografía de exclusión por tamaño demostró que L104EA29YIg (FIG. 10C) aparentemente tenía la misma movilidad que CTLA4Ig dimérica (FIG. 10B). Los picos principales representan dímeros proteicos mientras que el pico menor de elución más rápida en la FIG. 10B representa agregados de mayor peso molecular. Estuvo presente aproximadamente 5,0 % de CTLA4Ig como agregados de mayor peso molecular pero no hubo ninguna prueba de agregación de L104EA29YIg o L104EIg. Por lo tanto, la unión más fuerte con CD86Ig vista con L104EIg y L104EA29YIg no pudo atribuirse a la agregación inducida por mutagénesis.

Análisis de equilibrio y unión cinética

Se realizaron análisis de equilibrio y unión cinética en CTLA4Ig purificada de proteína A, L104EIg y L104EA29YIg usando resonancia de plasmón superficial (RPS). Los resultados se muestran en la Tabla I.

TABLA I

Constantes de equilibrio y cinéticas aparentes				
Proteína inmovilizada	Análito	$k_{on} (x 10^5) M^{-1}S^{-1}$	$k_{off} (x 10^{-3}) S^{-1}$	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3,44 ± 0,29	2,21 ± 0,18	6,51 ± 1,08
CD80Ig	L104EIg	3,02 ± 0,05	1,35 ± 0,08	4,47 ± 0,36
CD80Ig	L104EA29YIg	2,96 ± 0,20	1,08 ± 0,05	3,66 ± 0,41
CD80Ig	CTLA4X _{C120S}	12,0 ± 1,0	230 ± 10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YX _{C120S}	8,3 ± 0,26	71 ± 5	85,0 ± 2,5
CD86Ig	CTLA4Ig	5,95 ± 0,57	8,16 ± 0,52	13,9 ± 2,27
CD86Ig	L104EIg	7,03 ± 0,22	4,26 ± 0,11	6,06 ± 0,05
CD86Ig	L104EA29YIg	6,42 ± 0,40	2,06 ± 0,03	3,21 ± 0,23
CD86Ig	CTLA4X _{C120S}	16,5 ± 0,5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	L104EA29YX _{C120S}	11,4 ± 1,6	300 ± 10	267 ± 29

(los valores son las medias ± desviación típica de tres experimentos diferentes)

Se calcularon las constantes de disociación en equilibrio observadas (K_d ; Tabla I) a partir de curvas de unión generadas sobre una serie de concentraciones (5,0-200 nM). L104EA29YIg se une más fuertemente con CD86Ig que L104EIg o CTLA4Ig. La K_d menor de L104EA29YIg (3,21 nM) que L104EIg (6,06 nM) o CTLA4Ig (13,9 nM) indica mayor avidéz de unión de L104EA29YIg por CD86Ig. La menor K_d de L104EA29YIg (3,66 nM) que L104EIg (4,47 nM) o CTLA4Ig (6,51 nM) indica mayor avidéz de unión de L104EA29YIg con CD80Ig.

El análisis de unión cinética reveló que las velocidades de “asociación” comparativas para unión de CTLA4Ig, L104EIg y L104EA29YIg para unión de CD80 fueron similares, al igual que las velocidades de “asociación” para CD86Ig (Tabla I). Sin embargo, las velocidades de “disociación” para estas moléculas no fueron equivalentes (Tabla I). En comparación con CTLA4Ig, L104EA29YIg tuvo una velocidad de “disociación” aproximadamente 2 veces más lenta que CD80Ig, y una velocidad de “disociación” aproximadamente 4 veces más lenta que CD86Ig. L104E tuvo velocidades de “disociación” intermedias entre L104EA29YIg y CTLA4Ig. Ya que la introducción de estas mutaciones no afecta significativamente a las velocidades de “asociación”, el aumento de la avidéz por CD80Ig y CD86Ig observado con L104EA29YIg probablemente se debía principalmente a una reducción de las velocidades de “disociación”.

Para determinar si el aumento de la avidéz de L104EA29YIg por CD86Ig y CD80Ig se debía a las mutaciones que afectaban al modo 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 monocatenarias de dominios extracelulares de CTLA4 y L104EA29Y después de la mutagénesis de cisteína 120 a serina como se ha descrito anteriormente y en Linsley *et al.*, (1995) J. Biol. Chem., 270: 15417-15424. Se mostró que las proteínas purificadas CTLA4X_{C120S} y L104EA29YX_{C120S} eran monoméricas por cromatografía de permeación en gel (Linsley *et al.*, (1995), mencionado anteriormente), antes de analizar sus propiedades de unión a ligando por RPS. Los resultados mostraron que la afinidad de unión de ambas proteínas monoméricas por CD86Ig era aproximadamente 35-80 veces menor que la vista para sus dímeros respectivos (Tabla I). Esto apoya los datos previamente publicados que establecen que se requería dimerización de CTLA4 para unión a ligando de alta avidéz (Greene *et al.*, (1996) J. Biol. Chem., 271: 26762-26771).

L104EA29YX_{C120S} se unión con una afinidad aproximadamente 2 veces mayor que CTLA4X_{C120S} tanto con CD80Ig como con CD86Ig. La afinidad aumentada se debió a una velocidad de disociación de ambos ligandos aproximadamente 3 veces más lenta. Por lo tanto, la unión a ligando más fuerte por L104EA29Y se debía más probablemente a cambios estructurales potenciadores de la avidéz que se habían introducido en cada cadena monomérica en lugar de alteraciones en las que la molécula se dimerizó.

Localización y análisis estructural de mutaciones potenciadoras de la avidéz

La estructura en solución del dominio de tipo IgV extracelular de CTLA4 se ha determinado recientemente por espectroscopia RMN (Metzler *et al.*, (1997) Nature Struct. Biol., 4: 527-531. Esto permitió la localización precisa de leucina 104 y alanina 29 en el pliegue tridimensional (FIG. 11A-B). La leucina 104 se sitúa cerca de la secuencia de aminoácidos MYPPPY altamente conservada. La alanina 29 se sitúa cerca del extremo C terminal de la región S25-R33, que está espacialmente adyacente a la región MYPPPY. Aunque hay interacción significativa entre restos en la base de estas dos regiones, no hay aparentemente ninguna interacción directa entre L104 y A29 aunque ambas comprenden parte de un núcleo hidrófobo contiguo en la proteína. Las consecuencias estructurales de los dos mutantes potenciadores de la avidéz se evaluaron por modelización. La mutación A29Y puede alojarse fácilmente en la hendidura entre la región S26-R33 y la región MYPPPY, y puede actuar para estabilizar la conformación de la región MYPPPY. En CTLA4 de tipo silvestre, L104 forma interacciones hidrófobas extensivas con L96 y V94 cerca de la región MYPPPY. Es altamente improbable que la mutación de ácido glutámico adopte una conformación similar a la de L104 por dos razones. En primer lugar, no hay suficiente espacio para alojar la cadena lateral de ácido glutámico más larga en la estructura sin alterar significativamente la región S25-R33. En segundo lugar, los costes energéticos de internar la carga negativa de la cadena lateral de ácido glutámico en la región hidrófoba serían grandes. En su lugar, los estudios de modelización predicen que la cadena lateral de ácido glutámico se trasloca a la superficie donde su carga puede estabilizarse por solvatación. Dicho cambio conformacional puede alojarse fácilmente por G105, con alteración mínima de otros restos en las regiones.

Unión de mutantes de alta avidéz con células CHO que expresan CD80 o CD86

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

Como se muestra en la Figura 2, se incubaron CHO CD80 positivas o CD86 positivas ($1,5 \times 10^5$) con las concentraciones indicadas de CTLA4Ig (cuadrados cerrados), L104EA29YIg (círculos) o L104EIg (triángulos) durante 2 horas a 23 °C, se lavaron y se incubaron con anticuerpo anti-inmunoglobulina humana de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Se analizó la unión de un total de 5.000 células viables (determinación individual) en un FACScan, y se determinó la intensidad de fluorescencia media (IFM) a partir de histogramas de datos usando PC-LYSYS. Los datos se corrigieron con respecto a fluorescencia de fondo medida en células incubadas con un reactivo de segunda etapa solamente (IFM = 7). mAb L6 de control (80 µg/ml) proporcionó IFM < 30. Estos resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

La unión de L104EA29YIg, L104EI y CTLA4Ig con células CHO transfectadas con CD80 humanas es aproximadamente equivalente (FIG. 2A). L104EA29YIg y L104EIg se unen más fuertemente con células CHO transfectadas de forma estable con CD86 humano que CTLA4Ig (FIG. 2B).

5 Ensayos funcionales

Se aislaron células T CD4 positivas humanas por selección negativa inmunomagnética (Linsley *et al.*, (1992) J. Exp. Med. 176: 1595-1604). Se estimularon células T CD4 positivas aisladas con forbal miristato acetato (PMA) más células CHO CD80 positivas o CD86 positivas en presencia de concentraciones de valoración del inhibidor. Se cultivaron células T CD4 positivas (8-10 x 10⁴/pocillo) en presencia de PMA 1 nM con o sin estimuladores de células CHO irradiadas. Se midieron las respuestas proliferativas mediante la adición de [3H]timidina 1 µCi/pocillo durante las últimas 7 horas de un cultivo de 72 horas. Se realizó inhibición de PMA más CD80 positivas o CD86 positivas, células T estimuladas por L104EA29YIg y CTLA4Ig. Los resultados se muestran en la FIG. 3. L104EA29YIg inhibe la proliferación de células CHO CD80 positivas tratadas con PMA más que CTLA4Ig (FIG. 3A). L104EA29YIg también es más eficaz que CTLA4Ig en la inhibición de la proliferación de células CHO CD86 positivas tratadas con PMA (FIG. 3B). Por lo tanto, L104EA29YIg es un inhibidor más potente de la co-estimulación mediada tanto por CD80 como por CD86 de células T.

La Figura 4 muestra inhibición por L104EA29YIg y CTLA4Ig de células T humanas aloestimuladas preparadas anteriormente, y aloestimuladas adicionalmente con una línea celular linfoblastoide B humana (LCL) denominada PM que expresó CD80 y CD86 (células T a 3,0x10⁴/pocillo y PM a 8,0x10³/pocillo). Se produjo aloestimulación primaria durante 6 días, después las células se sometieron a pulsos con ³H-timidina durante 7 horas, antes de determinarse la incorporación del radiomarcador.

Se realizó aloestimulación secundaria de la siguiente manera. Se recogieron células T aloestimuladas primarias de siete días sobre medio de separación de linfocitos (MSL) (ICN, Aurora, OH) y se dejaron reposar durante 24 horas. Las células T se volvieron a estimular después (secundarias), en presencia de cantidades de valoración de CTLA4Ig o L104EA29YIg, añadiendo PM en la misma relación que anteriormente. Se produjo estimulación durante 3 días, después las células se sometieron a pulsos con radiomarcador y se recogieron como anteriormente. El efecto de L104EA29YIg en células T aloestimuladas secundarias se muestra en la FIG. 4A. El efecto de L104EA29YIg en células T aloestimuladas secundarias se muestra en la FIG. 4B. L104EA29YIg inhibe las respuestas proliferativas de células T tanto primarias como secundarias mejor que CTLA4Ig.

Para medir la producción de citocinas (Figura 5), se prepararon placas de aloestimulación secundaria por duplicado. Después de 3 días, el medio de cultivo se ensayó usando kits de ELISA (Biosource, Camarillo, CA) usando condiciones recomendadas por el fabricante. Se descubrió que L104EA29YIg era más potente que CTLA4Ig en el bloqueo de la producción de citocinas IL-2, IL-3 y γ-IFN de células T después de un estímulo alógenico secundario (FIGS. 5A-C).

Los efectos de L104EA29YIg y CTLA4Ig en la respuesta de linfocitos mixta (RLM) de mono se muestran en la Figura 6. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC; 3,4x10⁴ células/pocillo de cada mono) de 2 monos sobre medio de separación de linfocitos (MSL) y se mezclaron con fitohemaglutinina (PHA) 2 µg/ml. Las células se estimularon 3 días y después se sometieron a pulsos con radiomarcador 16 horas antes de la recogida. L104EA29YIg inhibió la preparación de células T de mono mejor que CTLA4Ig.

TABLA II

El efecto en la unión de CD86Ig por mutagénesis de CTLA4Ig en los sitios enumerados			
Sitio de mutagénesis	Sin efecto aparente	Efectos de mutagénesis	
		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	+		
(El efecto predominante está indicado con un signo "+")			

Ejemplo 3

5 Este estudio comparó la eficacia y seguridad de L104EA29YIg, descrito anteriormente, como un inmunosupresor de mantenimiento con CsA durante 12 meses cuando se usó como parte de un régimen de combinación sin ICN que consistía en inducción de basiliximab (Simulect®; Novartis), mofetil micofenolato (MMF; CellCept®; Roche), y corticosteroides en receptores de trasplante renal.

10 Fueron elegibles receptores adultos de un aloinjerto renal de HLA no idéntico de un donante vivo o muerto. Los sujetos con un trasplante renal anterior, un historial de anticuerpos reactivos a panel de >20 %, o los considerados por el investigador que tenían mayor riesgo de rechazo agudo se restringieron a ≤10 % de la población de estudio. Los criterios de expresión incluyeron enfermedad renal subyacente de glomerulosclerosis focal y segmental, glomerulonefritis membranoproliferativa de Tipo I o II o síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica; hepatitis B o C activa, o VIH; y edad del donante >60 o <6, donantes con muerte cardíaca, o tiempo de isquemia fría de riñón del donante de >36 horas.

15 Este fue un estudio abierto, aleatorio, con controles activos, de múltiples dosis, multicentro realizado en los Estados Unidos, Europa y Canadá. Los pacientes elegibles de cualquier sexo de ≥18 años de edad que se habían sometido a un trasplante renal (donante muerto o vivo, excepto cuando el donante y receptor eran HLA idénticos) se seleccionaron aleatoriamente para tratamiento en una relación 1:1:1 con un régimen de tratamiento más intensivo (MI) de L104EA29YIg, régimen de tratamiento menos intensivo (LI) de L104EA29YIg, o Ciclosporina A (CsA); todos en combinación con terapia de inducción con basiliximab (Simulect®; Novartis), terapia de mantenimiento adyuvante con mofetil micofenolato (MMF; CellCept®; Roche) y corticosteroides. Ambos regímenes de L104EA29YIg indujeron una fase temprana, en la que se administró L104EA29YIg a 10 mg/kg, y una fase de mantenimiento, en la que se administró L104EA29YIg a 5 mg/kg en intervalos de semana q4 o semana q8. Las dosis para cada régimen se basaron en el peso corporal. Estas dosis se dictaron por los perfiles de valle diana que se mostró que eran eficaces durante estudios con primates no humanos. Estos perfiles necesitaron dosis que eran inicialmente mayores durante el periodo de mayor riesgo inmunológico (Día 0-90). La fase temprana fue mayor en el régimen MI (6 frente a 3 meses) e incluyó una dosificación más frecuente.

20 El régimen de tratamiento más intensivo (MI) de L104EA29YIg consistió en la administración de 10 mg/kg los días 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 y 169, seguido de 5 mg/kg cada 4 u 8 semanas. El régimen de tratamiento menos intensivo (LI) de L104EA29YIg consistió en 10 mg/kg los días 1, 15, 29, 57 y 85, seguido de 5 mg/kg cada 4 u 8 semanas. Se administró L104EA29YIg en una infusión intravenosa de 30 minutos. Los pacientes seleccionados aleatoriamente para CsA recibieron dos dosis al día (7 ± 3 mg/kg) para conseguir el intervalo previamente especificado de concentraciones en suero diana de 150-400 ng/ml durante el primer mes y 150-300 ng/ml durante los meses 2-12, lo que es coherente con la práctica médica actual. Todos los pacientes recibieron 2 g de MMF al día y 20 mg de basiliximab cada 4 días. También se proporcionó un régimen de reducción progresiva de corticosteroides que consistía en una embolada iv de 500 mg de metilprednisolona el Día 1 y 250 mg el Día 2, seguido de 100 mg de prednisona oral el Día 3, 50 mg el Día 4, 25 mg los Días 5-30, 22,5 mg los Días 31-44, 20 mg los Días 45-58, 17,5 mg los Días 59-72, 15 mg el Día 73-86, 12,5 mg los Días 87-100 y 10 mg los Días 101-114. Después del Día 114, la dosis de prednisona podría reducirse en 2,5 mg cada dos meses, pero no menos de 5 mg al día.

35 El objetivo primario fue demostrar que L104EA29YIg no era inferior a CsA en la prevención del rechazo agudo a los 6 meses. Los objetivos secundarios incluyeron la evaluación de la incidencia del rechazo agudo (confirmado por biopsia o supuesto) a los 6 meses y 1 año; la velocidad de filtración glomerular (VFG) medida mediante eliminación de iohexol a los 1, 6 y 12 meses; parámetros de hipertensión; colesterol y triglicéridos en suero; y seguridad general.

Otros análisis pre-especificados incluyeron muerte del paciente o pérdida de injerto al cabo de 1 año; la gravedad de rechazo agudo; la incidencia de diabetes mellitus postrasplante [definida como cualquier terapia requerida para hiperglucemia durante >4 semanas, o una hemoglobina A1C (HbA1c) >7 %, en pacientes que no se ha sabido previamente que sean diabéticos]; VFG calculada, usando las fórmulas de Modificación de Dieta en Enfermedad Renal (MDER, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-470), Jelliffe (RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. *Ann Intern Med.* 1973; 79: 604-605), Cockcroft-Gault (Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31-41), y Nankivell (Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. *Transplantation.* 1995; 59(12): 1683-1689); farmacocinética e inmunogenicidad. El diagnóstico y tratamiento del rechazo agudo (RA) se basó en los criterios y grado de Banff 97 (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2): 713-23.). Se realizó un análisis post-hoc de la incidencia de nefropatía de aloinjerto crónica (NAC).

El diagnóstico y el tratamiento del rechazo agudo (RA) se basó en los criterios y grado de Banff 97 (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2): 713-23.). Se realizaron biopsias de aloinjertos renales intraoperatorias para evaluar la histología basal. Se tiñó el tejido del que se tomó la biopsia y se clasificó según la clasificación de trabajo de Banff 97 de la patología de trasplantes de riñones. Un patólogo independiente evaluó las biopsias sin conocer el tratamiento para confirmar todos los episodios de RA clínicamente sospechado antes del fragmento para RA.

Los criterios de valoración adicionales incluyeron: rechazo agudo demostrado por biopsia y clínicamente sospechado (CSBPAR) a los 12 meses; muerte o pérdida de injerto al cabo de 1 año; gravedad de episodios de RA (medidos usando la escala de Banff 97); fracaso del tratamiento (definido como opinión del investigador; rechazo de grado \geq IIb; rechazo recurrente o resistente a esteroides); función renal a los 1, 6 y 12 meses (velocidades de filtración glomerular [VFG] evaluadas por limitación de iohexol) y pruebas de nefropatía de aloinjerto crónica (NAC) (fibrosis intersticial y atrofia tubular); parámetros de hipertensión (tensión arterial [TA] diastólica \geq 11,97 kPa y/o TA sistólica \geq 18,62 kPa); lípidos en suero; seguridad, tolerabilidad y acontecimientos adversos (AA) en pacientes tratados con L104EA29Ylg en comparación con pacientes tratados con CsA.

Para evaluaciones de seguridad y tolerabilidad, se registraron los AA, las mediciones de laboratorio (hematología, bioquímica y análisis de orina) y signos vitales durante las visitas clínicas programadas regulares.

Resultados

Un total de 218 pacientes se sometieron a trasplante renal y se asignaron aleatoriamente al grupo de MI (N=74), el grupo LI (N=71) o CsA (N=73). La demografía y las características clínicas basales fueron similares entre los tres grupos de tratamiento. Un total de 164 pacientes completaron 1 año de tratamiento. De los pacientes que lo interrumpieron antes de 1 año (N=16 frente a 16 frente a 20; régimen MI frente a régimen LI frente a CsA), las razones más comunes fueron AA (N=5 frente a 8 frente a 9) y fracaso del tratamiento (N=7 frente a 5 frente a 3).

La incidencia de CSBPAR se produjo infrecuentemente en todos los grupos de tratamiento, y no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa en la incidencia de CSBPAR o rechazo agudo demostrado por biopsia (RADB) entre los grupos de tratamiento. A los 6 y 12 meses, la incidencia de CSBPAR fue de 6,8 %, 5,6 % y 8,2 % para tratamiento de MI, LI y CsA, respectivamente.

La incidencia de RADB también fue similar entre grupos a los 6 y 12 meses, aunque RADB fue ligeramente mayor en el grupo de LI que en los otros dos grupos (18,9 %, 29,6 % y 17,8 % para tratamiento de MI, LI y CsA, respectivamente). El rechazo agudo demostrado por biopsia fue más frecuente que CSBPAR en todos los grupos de tratamiento, y fue más común en el grupo de LI. Sin embargo, se descubrió que muchos de estos acontecimientos se producían en pacientes con L104EA29Ylg a concentraciones en suero valle menor de lo deseado.

No se vio ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento en la gravedad de RA; sin embargo, los números fueron pequeños y no dieron como resultado pérdida de injerto.

Este estudio se realizó sin ocultación a la medicación del estudio para permitir el tratamiento de referencia con respecto a CsA, lo que probablemente contribuyó al mayor número de biopsias tomadas en los grupos de L104EA29Ylg (N=345) en comparación con el grupo de CsA (N=144). Aunque esto no era inesperado para un estudio diseñado de este modo, podría haber aumentado la tasa de diagnóstico de anomalías histológicas renales en los grupos de tratamiento de L104EA29Ylg.

La muerte y/o pérdida de injerto fue infrecuente en todos los grupos de tratamiento, indicándose 1 muerte en el grupo de MI, 4 en el grupo CsA y ninguna en el grupo de LI. La mayoría de las pérdidas de injerto no estuvieron provocadas por acontecimientos inmunológicos y solamente se perdieron 3 injertos en los grupos de MI y CsA frente a 1 en el grupo de LI.

Se vieron mejoras significativas en la función renal con tratamiento basado en L104EA29Ylg en comparación con la inmunosupresión basada en CsA. La eliminación de lohexol fue mayor con tratamiento con L104EA29Ylg en todos los puntos temporales, con una mejora media de 11 ml/min 1,73 m² (~20 %) en comparación con CsA en 12 meses.

5 A los 12 meses, la nefropatía de aloinjerto crónica (NAC) fue entre 30 y 50 % menos común, en términos relativos, en pacientes tratados con L104EA29Ylg que los tratados con CsA. Las tasas de nueva NAC o empeoramiento de NAC a los 12 meses fueron de 29 %, 19 % y 44 % para grupos de MI, LI y CsA, respectivamente.

10 Al cabo de 1 año, la tensión arterial sistólica media fue de 0,40-0,53 kPa mayor en pacientes tratados con CsA (17,69 kPa) frente a pacientes en los grupos de tratamiento de MI (17,29 kPa) y LI (17,16 kPa). Esto fue a pesar del uso menor de medicación anti-hipertensiva en los grupos de L104EA29Ylg (MI, 87,5 %; LI 84,1 %; CsA 92,2 %). El colesterol en suero total fue ligeramente menor con L104EA29Ylg (MI: 198 mg/dl; LI: 201 mg/dl) frente a pacientes tratados con CsA (212 mg/dl) aunque el uso de medicación reductora de lípidos también fue menor con L104EA29Ylg (MI: 36,1 %; LI: 31,9 %; CsA: 53,1 %).

20 Cuatro pacientes (5,5 %) murieron en el grupo de CsA en comparación con 1 en los grupos de tratamiento con L104EA29Ylg. Las tasas de acontecimientos adversos (AA) fueron comparables entre grupos de tratamiento; sin embargo, los AA relacionados fueron significativamente menores después de tratamiento con L104EA29Ylg que con tratamiento de CsA. La administración intravenosa de L104EA29Ylg se toleró bien sin reacciones de infusión. Los pacientes tratados con L104EA29Ylg no mostraron acontecimientos adversos relacionados con CsA típicos, tales como anemia, leucopenia, hirsutismo, temblores e hiperplasia de las encías. La terapia basada en L104EA29Ylg no se asoció con ningún riesgo aumentado de infecciones o tumores malignos en comparación con terapia basada en CsA.

25 **Conclusión**

30 Este estudio de 12 meses demuestra que la terapia de mantenimiento basada en L104EA29Ylg confiere eficacia equivalente en la prevalencia de RA y supervivencia de pacientes e injerto similar en comparación con CsA. Además, L104EA29Ylg demostró mejoras significativas en la función renal y reducciones en NAC en comparación con la inmunosupresión de mantenimiento basada en CsA. L104EA29Ylg fue segura y se toleró bien y no se asoció con toxicidades relacionadas con ICN típicas.

35 Las tasas de CSBPAR y RADB fueron similares entre los tres grupos de tratamiento lo que demostraba que las bajas tasas de RA observadas con terapia basada en CsA también se conseguían con L104EA29Ylg. La mayoría de RADB se clasificaron como sub-clínicos, lo que sugiere que la función renal no estaba alterada. La tasa numéricamente menor de RA en el grupo de MI, en comparación con el grupo de LI, sugiere una posible respuesta dependiente de dosis con L104EA29Ylg. Biopsias más frecuentes en los grupos de L104EA29Ylg podrían haber conducido potencialmente a sobrediagnóstico de rechazo tanto agudo como crónico en estos grupos, lo que sugiere que los beneficios de la terapia de L104EA29Ylg pueden estar infravalorados en este estudio.

45 La mayoría de acontecimientos de RADB se produjeron en los primeros tres meses después del trasplante, lo que no es inesperado ya que otros han mostrado que se requieren mayores dosis de inmunosupresores durante el periodo postrasplante temprano (Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, Ritz E. Acute failure of the transplanted kidney-pathophysiology, diagnosis and prevention. Ann Transplant 1996; 1(4): 5-9 and Bennett WM. Posttransplant acute renal failure. Ren Fail 1997; 19(2): 225-6). Ya que la mayoría de estos acontecimientos se produjeron a valores valle por debajo de lo deseado, debería tomarse en consideración la alteración del régimen en el primer mes de tratamiento, antes de alcanzar un estado estacionario. La mayoría de los RADB vistos durante la fase de mantenimiento se produjeron a niveles muy bajos o indetectables de L104EA29Ylg, lo que sugiere que la incidencia de RA durante esos periodos estaba relacionada con inmunosupresión insuficiente, lo que puede evitarse por alteraciones en el régimen de dosis.

50 Este estudio demuestra que L104EA29Ylg se asocia a tasas de AA generales similares en comparación con CsA, con menos AA relacionados con el fármaco del estudio. No se identificaron diferencias reales en el número de AA relacionados con virus entre los tres grupos de tratamiento.

55 En presencia de bajas tasas de RA, el nuevo objetivo de inmunosupresión de mantenimiento es la reducción en complicaciones de la salud a largo plazo, incluyendo hipertensión, hiperlipidemia, toxicidad farmacológica y la prevención de la cicatrización. Como en enfermedades autoinmunitarias, está surgiendo una nueva generación de agentes inmunosupresores de mantenimiento inmunoselectivo. La inhibición de la co-estimulación de células T mediante bloqueo de co-estimulación inmunoselectivo con L104EA29Ylg representa un nuevo paradigma, que ofrece la perspectiva de inmunosupresión de mantenimiento más selectiva, toxicidades reducidas y mejora de los resultados a largo plazo en trasplante renal.

65

Ejemplo 4

- 5 Existe una necesidad médica no satisfecha sustancial de nuevas terapias en trasplante renal que puedan proporcionar supervivencia al sujeto y al injerto a corto plazo comparable a los ICN sin sus efectos nefrotóxicos, cardiovasculares y metabólicos a largo plazo. La necesidad es particularmente grande entre receptores de aloinjertos renales definidos por ECD, cuyas tasas de supervivencia de sujeto e injerto a largo plazo son notablemente menores a las de receptores de aloinjertos de donantes que cumplen los criterios de elegibilidad convencionales. L104EA29Ylg, un agente inmunosupresor con un mecanismo de acción nuevo, es un candidato no nefrotóxico prometedor para uso en receptores de trasplantes renales de aloinjertos de ECD. Debido a que puede administrarse L104EA29Ylg en el momento del injerto en lugar de una manera retardada, como es necesario frecuentemente con ICN, especialmente en los aloinjertos con función renal alterada inicial, proporciona inmunosupresión de una manera oportuna y sin la necesidad de preparaciones antilinfocíticas policlonales. Esto puede traducirse en tasas de rechazo agudo comparables con un perfil de seguridad favorable. Como no se anticipa que L104EA29Ylg sea nefrotóxico, debería verse beneficios adicionales con respecto a estructura (es decir, NAC) y función (es decir, VFG) de aloinjertos. Finalmente, a diferencia de ICN, el mecanismo dirigido de acción de L104EA29Ylg debería proporcionar inmunosupresión sin afectar de forma adversa al perfil cardiovascular/metabólico. Se proporciona posteriormente una evaluación general de beneficio-riesgo para el uso de L104EA29Ylg en esta población objeto.
- 20 Se estudiarán dos regímenes de dosis (como se describe en el Ejemplo 3, con una modificación menor del régimen de LI y usando el programa de infusión de mantenimiento cada 4 semanas).

Objetivos primarios

- 25 1) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en el compuesto de supervivencia de sujeto e injerto a los 12 meses.
2) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en el compuesto de VFG medida < 60 ml/min/1,73 m² el Mes 12 o una reducción en el VFG ≥ 10 ml/min/1,73 m² del Mes 3 al Mes 12.

Objetivos secundarios

- 30 1) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en VFG medida a los 12 meses.
2) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en NAC demostrado por biopsia a los 12 meses.
35 3) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en VFG medida a los 3 meses, y el cambio de línea basal (3 meses) a los 12 meses.
4) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con una VFG medida < 30 ml/min/1,73 m² a los 12 meses.
5) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en VFG calculada a los 3, 12, 24 y 36 meses y cambio desde la línea basal (3 meses) a los 12, 24 y 36 meses.
40 6) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en DMPT a los 12, 24 y 36 meses.
7) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en las medidas de hipertensión a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo SBP y DBP, incidencia y prevalencia de hipertensión e hipertensión controlada, e intensidad del régimen de tratamiento.
8) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en las medidas de dislipidemia a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo colesterol total, no-HDL, lipoproteína de baja densidad (LDL) y HDL en suero, y TG, incidencia y prevalencia de dislipidemia y dislipidemia controlada, e intensidad de régimen de tratamiento.
45 9) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en supervivencia de sujeto e injerto a los 24 y 36 meses.
10) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en medidas de rechazo agudo a los 6 meses, incluyendo la incidencia y gravedad de rechazo agudo, el uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales para función renal alterada y FIT anticipado, el uso inicial de terapia de agotamiento de linfocitos para tratamiento de rechazo agudo, la incidencia de rechazo agudo resistente a esteroides, la incidencia de recuperación completa (vuelta de SC a la línea basal) después de rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratados independientemente de los hallazgos histológicos.
50 11) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en QoL.
55 12) Evaluar la seguridad general de L104EA29Ylg, en relación con CsA.

Objetivos terciarios

- 60 1) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la pendiente e intersección de VFG calculada desde línea basal (3 meses) a los 12, 24 y 36 meses.
2) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con una VFG medida < 45 ml/min/1,73 m² a los 12 meses.
65 3) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con < 75 ml/min/1,73 m² de VFG calculada en el Mes 12 y sujetos con una reducción de VFG calculada del Mes 3 al Mes 12 de al menos 15 ml/min/1,73 m².

4) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la incidencia de FIT.

5) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en las medidas de rechazo agudo a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo la incidencia y gravedad de rechazo agudo, el uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales para función renal alterada y FIT anticipado, el uso inicial de terapia de agotamiento de linfocitos para tratamiento de rechazo agudo, y la incidencia de rechazo agudo resistente a esteroides, la incidencia de recuperación completa (vuelta de SCr a la línea basal) después de rechazo agudo, la incidencia de rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratados independientemente de los hallazgos histológicos.

6) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en un criterio de valoración de enfermedad cardiovascular compuesto (muerte cardiovascular adjudicada, infarto de miocardio, ictus isquémico, hospitalización no electiva para causa cardiovascular e intervención coronaria percutánea) a los 12, 24 y 36 meses.

7) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en un criterio de valoración de enfermedad cardiorenal (muerte, pérdida de injerto, infarto de miocardio no letal e ictus) a los 12, 24 y 36 meses.

8) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la Puntuación de Riesgo de Framingham a los 12, 24 y 36 meses.

9) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la incidencia de la interrupción del fármaco del estudio.

10) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en anticuerpos anti-antígeno de leucocito humano (HLA) del donante.

11) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la positividad de C4d en muestras de ensayo de biopsia.

Diseño del estudio

La duración del estudio es de 3 años con un periodo de seguimiento posterior de 8 semanas para evaluaciones de seguridad. Al final de periodo del tratamiento de 3 años, los sujetos pueden ser elegibles para un estudio de extensión a largo plazo.

Este es un estudio aleatorio, con ocultación parcial, con controles activos, en grupos paralelos. Todos los sujetos recibirán un riñón de un donante con criterios ampliados como se define posteriormente. Estos criterios se basan en parte en los publicados por la United Network of Organ Sharing (UNOS); también incluyen otras características ampliamente usadas para identificar órganos potencialmente comprometidos, tales como los de donantes con muerte cardíaca (DCD, sin pulso cardíaco) o con tiempo de isquemia fría (TIC) prolongado.

Aproximadamente 540 sujetos se asignarán aleatoriamente en una relación 1:1:1 a tratamiento con L104EA29Ylg (régimen de MI), L104EA29Ylg (régimen de LI) o CsA. Todos los sujetos recibirán también inducción con basiliximab y un régimen inmunosupresor de mantenimiento de fondo de MMF y corticosteroides. Los sujetos asignados aleatoriamente al régimen de MI recibirán i.v. L104EA29Ylg (10 mg/kg) los Días 1 y 5, después cada 2 semanas hasta el Mes 3 (Semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 12), y después cada 4 semanas hasta 6 meses (Semanas 16, 20 y 24). Después de 6 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de MI recibirán la dosis de mantenimiento de L104EA29Ylg 5 mg/kg administrada cada 4 semanas hasta completar el ensayo a los 36 meses. Los sujetos asignados aleatoriamente al régimen de LI recibirán i.v. L104EA29Ylg (10 mg/kg) los Días 1 y 5, y después cada 2 semanas hasta el Mes 1 (Semanas 2 y 4) y cada 4 semanas hasta el Mes 3 (Semanas 8 y 12). Después de 3 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de LI recibirán la dosis de mantenimiento de L104EA29Ylg 5 mg/kg administrada cada 4 semanas hasta completar el ensayo a los 36 meses.

Se conservará la ocultación entre los grupos de LI y MI con el uso de infusiones de placebo en el grupo de tratamiento de LI las Semanas 6 y 10. Los sujetos asignados aleatoriamente a CsA recibirán dosis dos veces al día que se diseñan para conseguir un intervalo de concentración valle en suero específico coherente con la práctica médica actual.

El uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales (Timoglobulina o ATGAM) está permitido, pero no es necesario, para sujetos asignados aleatoriamente a CsA que experimentan función de aloinjerto renal alterada y FIT anticipado. Estos agentes se utilizan ampliamente en esta capacidad para proporcionar inmunosupresión hasta que la función del injerto se recupera para administración de CsA. La decisión de usar y dosificar una preparación antilinfocítica policlonal en esta situación clínica depende del criterio del investigador dentro de las directrices de protocolo. La seguridad y eficacia de L104EA29Ylg se evaluará a los 1, 2 y 3 años.

Mediciones de resultados primarios

Cada régimen basado en L104EA29Ylg se comparará con el régimen basado en CsA en las siguientes medidas de resultados de eficacia primarios: (1) el compuesto de supervivencia de sujeto e injerto a los 12 meses; (2) el compuesto de VFG medida $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ el Mes 12 o una reducción de VFG $\geq 10 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ del Mes 3 al Mes 12. La intención es demostrar la ausencia de inferioridad para muerte y pérdida de injerto y superioridad para función renal. El criterio de valoración de supervivencia del sujeto y el injerto se seleccionó porque estas medidas

son los resultados clínicos más importantes para receptores de aloinjertos. Aunque la pérdida de aloinjertos puede prevenirse por terapia inmunosupresora eficaz, la misma terapia puede aumentar el riesgo de muerte por infección, PTLD, tumor maligno, nefrotoxicidad o enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, es apropiado examinar el criterio de valoración compuesto de supervivencia del sujeto e injerto como una medida sumario del beneficio neto de terapia inmunosupresora en receptores de aloinjertos. Este criterio de valoración compuesto tiene la ventaja adicional de poder evaluarse en todos los sujetos sin sesgo debido a datos ausentes o la situación errónea del sujeto.

La función renal como un criterio de valoración se seleccionó porque la relación entre la función renal después del trasplante y el resultado renal a largo plazo se ha demostrado repetidas veces en diversas situaciones. La asociación está presente si la función renal se mide algunos días después del trasplante, en el momento del alta hospitalaria o a los 6 y 12 meses después del trasplante. Se ha observado en receptores de riñones de donantes vivos y muertos, en receptores de riñones de donantes muertos más jóvenes y más viejos, en receptores de segundo trasplante y en receptores adultos y pediátricos.

Los resultados de estudios multicentros confirman la importancia de SCr para predecir la supervivencia de injerto a largo plazo. La relación entre la función renal y el pronóstico a largo plazo es fuerte y reproducible, pero no estrictamente lineal. En un análisis de receptores de trasplantes renales adultos, el examen de la relación entre SCr al cabo de 1 año y la mediana proyectada de la semivida del injerto reveló un punto de inflexión pronunciado en SCr > 1,5 mg/dl. De forma similar, el examen de la relación entre el cambio en SCr de 6 meses a 1 año (Δ SCr) y la mediana proyectada de la semivida del injerto reveló un punto de inflexión pronunciado en Δ SCr \geq 0,3 mg/dl. Por lo tanto, tanto el nivel absoluto de la función renal al cabo de 1 año como el cambio en la función renal desde 6 meses (o un punto temporal postrasplante temprano, estable similar) a 1 año es adecuado para su uso como medidas del resultado. La ausencia de linealidad en la relación de la función renal con el resultado a largo plazo sugiere que las medidas categóricas de la función renal tendrían mayor relevancia clínica que las dimensionales. Los valores umbral de > 1,5 mg/dl al cabo de 1 año para función renal y cambio de SCr de \geq 0,3 mg/dl del Mes 6 al Año 1 parecen apropiados.

Los estudios a los que se ha hecho referencia anteriormente, la importancia del pronóstico de la función renal se demostró usando SCr como un marcador. Estos estudios fueron en general demasiado grandes para usar medidas directas de la filtración glomerular. Las limitaciones de SCr como un marcador de la función renal se conocen bien. Los niveles de SCr reflejan principalmente el equilibrio entre la excreción renal de creatinina y la generación endógena de creatinina. Esta última puede verse afectada significativamente por variaciones de la masa muscular, infección, inflamación y uso de esteroides, que son todos habituales en la población trasplantada. Además, la excreción renal de creatinina puede producirse por 2 vías – filtración glomerular y secreción tubular. La influencia de la pérdida de la filtración glomerular en SCr se enmascara habitualmente por aumentos compensatorios de la secreción tubular y de este modo se reduce la utilidad de SCr aumentada como un marcador de la alteración renal. Se ha estimado que el 40 % de los sujetos con VFG reducida tendrán SCr normal o baja. Se han desarrollado numerosas fórmulas que buscan mejorar la correlación entre SCr y VFG teniendo en cuenta el efecto de los factores demográficos y biométricos. El nivel de acuerdo entre VFG estimada a partir de diversas fórmulas y VFG verdadera medida por eliminación de inulina se ha estudiado en 294 receptores de trasplante con función renal estable. La proporción de valores de VFG predichos que difirieron de la eliminación de inulina medida en al menos 10 ml/min/1,73 m² varió de 34 % para la fórmula de Jellife hasta 53 % para la fórmula de Nankivell. La fórmula propuesta por Levey *et al* se usará para calcular VFG en este estudio. Se ha mostrado que esta fórmula predice VFG con más precisión en la población trasplantada, que tiene la mejor correlación entre valor predicho y medido en comparación con otras fórmulas, tales como Nankivell. Dada la diferencia sustancial entre VFG verdadera y VFG calculada, la eliminación de un marcador de filtración glomerular verdadero se usará para evaluar el criterio de valoración primario de la función renal (Apéndice 1). Se usará una VFG de 60 ml/min/1,73 m², o cambio de VFG de al menos 10 ml/min/1,73 m², como los equivalentes aproximados de los valores umbral de SCr de 1,5 mg/dl o cambio de SCr de al menos 0,3 mg/dl establecido en estudios epidemiológicos grandes. El componente de cambio del criterio de valoración compuesto se evaluará de los Meses 3 a 12, ya que la función renal postrasplante es en gran medida estable en el Mes 3.

Otras medidas de resultados

Los objetivos secundarios clave son evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en VFG medida a los 12 meses y en NAC demostrada por biopsia a los 12 meses. Estos criterios de valoración se segregan a partir de otros criterios de valoración secundarios para enfatizar su importancia en la evaluación de L104EA29YIg. Como se ha analizado anteriormente, la masa de nefronas funcionales y reserva renal en riñones ECD probablemente se reduzcan en el momento del trasplante debido a las características del donante (por ejemplo, mayor edad, comorbilidades cardiovasculares, procedimientos de procuración y TIC) con tasas de supervivencia de sujeto e injerto resultantes que están bastante por debajo de las observadas con órganos donantes de criterios convencionales. Ya que la función renal está potencialmente disminuida en el momento del injerto, es posible que una proporción sustancial de sujetos puedan cumplir los criterios para el criterio de valoración de la función renal co-primario en el momento de entrada en el estudio o determinación de la función de aloinjerto renal de línea basal. En consecuencia, un objetivo secundario clave del protocolo es evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en la diferencia de VFG medida a los 12 meses. Este criterio de valoración secundario clave permite diferenciar los

efectos de L104EA29YIg, en comparación con CsA, independientemente de la variabilidad de donante preexistente en esta población de ECD. También contribuye a la evaluación de la función renal en total, y refuerza además la conclusión de que L104EA29YIg proporciona un beneficio médico significativo en receptores de trasplante renal. El objetivo secundario clave restante es la NAC demostrada por biopsia a los 12 meses. NAC solo está por detrás de la muerte con un injerto funcional como la causa principal de pérdida de aloinjerto renal tardía. Paradójicamente, se cree que los ICN contribuyen a NAC mediante rutas directas (es decir, efectos nefrotóxicos directos) e indirectas (es decir, efectos cardiovasculares y metabólicos adversos). Debido a su mecanismo de acción específico, L104EA29YIg probablemente sea directamente nefrotóxica o altere de forma adversa los parámetros cardiovasculares y metabólicos.

En el Ejemplo anterior, se vieron efectos favorables en la incidencia reducida de NAC entre sujetos tratados con L104EA29YIg. En el estudio actual, el establecimiento de una reducción en la incidencia de NAC, junto con una mejora de la función renal, reforzaría la conclusión de que L104EA29YIg proporciona un beneficio médico significativo en receptores de trasplante renal. La eficacia de L104EA29YIg en la prevención del rechazo agudo se evaluará por diversas medidas de resultados. Estas incluyen su incidencia, gravedad, sensibilidad a la terapia y resultado. La interpretación de estas medidas, sin embargo, se complica por diferencias intrínsecas en L104EA29YIg y CsA. La L104EA29YIg se administra en el momento del trasplante, mientras que CsA se inicia una vez que hay pruebas de función renal incipiente. Se anticipa que algunos sujetos asignados aleatoriamente a CsA en este estudio recibirán una preparación antilinfocítica policlonal para proporcionar cobertura inmunosupresora si la función renal inicial está alterada y se anticipa FIT. Esta acción terapéutica puede evitar o enmascarar el desarrollo de rechazo agudo en sujetos tratados con CsA y hacer al sujeto no evaluable para las medidas de resultado de rechazo agudo. Debido a que es innecesario tomar acciones similares en sujetos asignados aleatoriamente a L104EA29YIg, que se tratan desde el momento del trasplante, la evaluación comparativa del rechazo agudo es desigual. Para evaluar con más precisión la eficacia de L104EA29YIg en la prevención del rechazo agudo, también se ha indicado el uso de preparaciones linfocíticas policlonales en esta capacidad junto con otras medidas del rechazo agudo.

Población de estudio

La población de estudio incluye receptores de aloinjertos renales que son potencialmente subóptimos debido a características de donante, procedimiento de procuración, TIC u otros factores. Los criterios de elegibilidad específicos se basan en los "criterios expandidos" para donación de órganos publicados por UNOS. Los receptores de riñones de donantes con TIC prolongado o de DCD, también serán elegibles. En general, los criterios inmunológicos no desempeñarán un papel importante en la selección de sujetos. Son elegibles sujetos con diversos niveles de riesgo inmunológico. El estudio excluirá, sin embargo, sujetos de mayor riesgo inmunológico (compatibilidad cruzada positiva, anticuerpos reactivos a paneles [ARP] de $\geq 30\%$, o los previamente trasplantados). Estos sujetos pueden requerir terapia para reducir su carga de anticuerpo, tal como plasmáferesis, que está más allá del alcance de este protocolo. Los sujetos se reclutarán en aproximadamente 90 sitios en todo el mundo.

Medidas de resultado de eficacia primaria

- 1) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en el compuesto de supervivencia de sujeto e injerto a los 12 meses.
- 2) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en el compuesto de VFG medida < 60 ml/min/1,73 m² el Mes 12 o una reducción de VFG ≥ 10 ml/min/1,73 m² del Mes 3 al Mes 12.

Medidas de resultados de eficacia secundarios

- 1) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en VFG medida a los 12 meses.
- 2) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en NAC demostrado por biopsia a los 12 meses.
- 3) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en VFG medida a los 3 meses, y cambio desde la línea basal (3 meses) a 12 meses.
- 4) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con una VFG medida < 30 ml/min/1,73 m² a los 12 meses.
- 5) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en VFG calculada a los 3, 12, 24 y 36 meses y cambios desde la línea basal (3 meses) hasta 12, 24 y 36 meses.
- 6) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en DMPT a los 12, 24 y 36 meses.
- 7) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en las medidas de hipertensión a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo SBP y DBP, incidencia y prevalencia de hipertensión e hipertensión controlada, e intensidad del régimen de tratamiento.
- 8) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en las medidas de dislipidemia a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo colesterol total, distinto de HDL, LDL y HDL y TG en suero, incidencia y prevalencia de dislipidemia y dislipidemia controlada e intensidad del régimen de tratamiento.
- 9) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en supervivencia del sujeto y el injerto a los 24 y 36 meses.
- 10) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, en relación con CsA, en medidas de rechazo agudo a los 6 meses, incluyendo la incidencia y gravedad de rechazo agudo, el uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales para

función renal alterada y FIT anticipado, el uso inicial de terapia de agotamiento de linfocitos para el tratamiento de rechazo agudo, la incidencia de rechazo agudo resistente a esteroides, la incidencia de recuperación completa (vuelta de SCr a la línea basal) después de rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratados independientemente de los hallazgos histológicos.

- 5 11) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en QoL
10) Evaluar la seguridad general de L104EA29Ylg, en relación con CsA.

Medidas de resultado terciarias

- 10 1) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la pendiente e intersección de VFG calculada a partir de línea basal (3 meses) a los 12, 24 y 36 meses.
2) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con una VFG medida < 45 ml/min/1,73 m² a los 12 meses.
15 3) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con < 75 ml/min/1,73 m² de VFG calculada en el Mes 12 y sujetos con una reducción de VFG calculada del Mes 3 al Mes 12 de al menos 15 ml/min/1,73 m².
4) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la incidencia de FIT.
5) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en medidas de rechazo agudo a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo la incidencia y gravedad de rechazo agudo, el uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales para función renal alterada y FIT anticipado, el uso inicial de terapia de agotamiento de linfocitos para el tratamiento de rechazo agudo, y la incidencia de rechazo agudo resistente a esteroides, la incidencia de recuperación completa (vuelta de SCr a la línea basal) después de rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratados independientemente de los hallazgos histológicos.
20 6) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en un criterio de valoración de enfermedad cardiovascular compuesto (muerte cardiovascular adjudicada, infarto de miocardio, ictus isquémico, hospitalización no voluntaria por causa cardiovascular e intervención coronaria percutánea) a los 12, 24 y 36 meses.
7) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en un criterio de valoración de enfermedad cardiorrenal (muerte, pérdida de injerto, infarto de miocardio no letal e ictus) a los 12, 24 y 36 meses.
30 8) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la Puntuación de Riesgo de Framingham a los 12, 24 y 36 meses.
9) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la incidencia de la interrupción del fármaco del estudio.
35 10) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en anticuerpos anti-HLA del donante.
11) Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en positividad de C4d en muestras de ensayo de biopsia.

40 Definición de Pérdida de Injerto. La pérdida de injerto se define como pérdida funcional o pérdida física. La pérdida funcional se definirá como un nivel mantenido de SCr $\geq 6,0$ mg/dl (530 mol/l) como se determina por el laboratorio central durante ≥ 4 semanas o ≥ 56 días consecutivos de diálisis, o alteración de la función renal en tal grado que el sujeto reciba un segundo trasplante. Todas las causas de pérdida de injerto se adjudicarán por un EAC independiente.

45 Definición de Función de Injerto Retardada (FIT). La FIT se define como tratamiento con diálisis el Día del estudio 8 (Día postoperatorio 7).

50 Definición de Nefropatía de Aoinjerto Crónica (NAC). Un histopatólogo central sin conocimiento del tratamiento determinará la NAC demostrada por biopsia usando la clasificación de trabajo de Banff 97 de patología de trasplante de riñones. La incidencia de NAC se determinará comparando todas las biopsias después del Día 1 con biopsias basales obtenidas en el momento del trasplante. Esta comparación establece la presencia y gravedad de cualquier histopatología preexistente que pueda interpretarse posteriormente como NAC.

55 Definición de Diabetes Mellitus Postrasplante. La DMPT se definirá de acuerdo con la definición expuesta en una directriz de consenso internacional reciente.20 Estos criterios se resumen como: a) Síntomas de diabetes más concentración de glucosa en plasma (GP) casual ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) O b) glucosa en plasma en ayunas (GPA) ≥ 26 mg/dl (7,0 mmol/l) O c) GP a las 2 horas ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) durante un ensayo de tolerancia a la glucosa oral Y d) un ensayo de laboratorio de confirmación basado en mediciones de GP venosa debe realizarse otro día en ausencia de hiperglucemia inequívoca acompañada de descompensación metabólica aguda. El estudio utilizará GPA para evaluación de DMPT, sin embargo, si los sujetos se evalúan usando estos otros métodos y se descubre que cumplen los criterios anteriores, se considerará que tienen DMPT.
60

65 Definición de Medidas de Hipertensión. La hipertensión será como se define en este estudio de acuerdo con el Seventh Report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure 21 para sujetos con enfermedad renal crónica. Esta definición se basa en TAS $\geq 17,29$ kPa o TAD

$\geq 10,64$ kPa. Además, todos los sujetos que tienen una TAS $< 17,29$ kPa y una TAD $< 10,64$ kPa que reciben una medicación o medicaciones antihipertensivas para la indicación de hipertensión o con un historial médico de hipertensión se incluyen en esta definición. La incidencia de hipertensión se define como la proporción de sujetos que desarrollan hipertensión después de asignación aleatoria y trasplante. La prevalencia de la hipertensión se define como la proporción de sujetos en cualquier momento dado que cumplen la definición anteriormente indicada de hipertensión. La hipertensión controlada se define como una TAS $< 17,29$ kPa y una TAD $< 10,64$ kPa mientras que reciben una medicación antihipertensiva para la indicación de hipertensión o que reciben una medicación antihipertensiva para otra indicación con un historial médico de hipertensión. no se considerará que sujetos con una TAS $< 17,29$ kPa y una TAD $< 10,64$ kPa a los que se ha recetado una medicación o medicaciones antihipertensivas para una indicación o indicaciones distintas de hipertensión (por ejemplo, bloqueadores beta para profilaxis de migraña) sin historial médico de hipertensión tengan hipertensión o hipertensión controlada. La intensidad del régimen de tratamiento se define como el número total de medicaciones antihipertensivas usadas para controlar la hipertensión. Todas las medicaciones antihipertensivas se contarán para la indicación de hipertensión en sujetos con hipertensión o hipertensión controlada ya que los efectos antihipertensivos están presentes independientemente de la indicación.

Definición de Medidas de Dislipidemia. La dislipidemia se define de acuerdo con directrices recientes de la National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-K/DOQI).²² La dislipidemia se define como hipertrigliceridemia (TG ≥ 500 mg/dl [5,65 mmol/l]), hipercolesterolemia (LDL ≥ 100 mg/dl [2,59 mmol/l]), o no-HDL elevada (no-HDL ≥ 130 mg/dl [3,36 mmol/l]) en presencia de TG altos (TG ≥ 200 mg/dl [2,26 mmol/l]). La dislipidemia controlada se define en este estudio como sujetos que reciben tratamiento farmacológico para una de las dislipidemias anteriormente indicadas que se trata con éxito, y sus valores lipídicos caen por debajo de los umbrales descritos en el párrafo anterior. Algunos de estos agentes tienen precauciones específicas y/o advertencias con respecto a la dosis de partida o dosis recomendada máxima con uso simultáneo de CsA, dosificación con insuficiencia renal o pueden provocar alteraciones de PK de CsA. Refiérase al prospecto apropiado para recomendaciones específicas. Cualquier otro agente (es decir, terapia distinta de estatina) usado como un antihiperlipidémico se considerará intensidad del tratamiento del Nivel I. El uso simultáneo de una estatina y un agente de otra clase (por ejemplo, ezetimibe) elevará el nivel de intensidad de la terapia de estatina en 1 nivel; por lo tanto, son posibles más de 5 niveles de intensidad.

El rechazo agudo se definirá como un acontecimiento clínico-patológico que requiere pruebas clínicas y confirmación por biopsia. Un patólogo independiente central sin conocimiento del tratamiento evaluará las biopsias de aloinjertos con respecto a la presencia y gravedad de rechazo agudo usando clasificación de trabajo de Banff 97 de patología de trasplante de riñones. En los análisis de rechazo agudo la interpretación y clasificación de la biopsia por el patólogo central prevalecerá sobre la interpretación local. Las biopsias realizadas para rechazo agudo sospechado que no cumplen completamente los criterios, pero el patólogo central las interpreta como rechazo agudo y dan como resultado tratamiento de rechazo agudo, se contarán como rechazo agudo. El rechazo subclínico se define como hallazgos histológicos por el patólogo central coherentes con rechazo agudo, pero que carecen de su correlación clínica. El rechazo agudo resistente a esteroides se define como falta de mejora en el SCR y/o hallazgos histológicos que requieren el uso de terapia de agotamiento de linfocitos después de tratamiento con corticosteroides. Puntuación de Riesgo de Framingham. Esta puntuación de riesgo utiliza datos del estudio cardíaco de Framingham 23 para estimar el riesgo a los 10 años de enfermedad cardíaca coronaria "dura" (infarto de miocardio y muerte coronaria). Los factores de riesgo incluidos en este cálculo son edad, sexo, colesterol total, colesterol HDL, SBP, diabetes, tratamiento de hipertensión y cualquier uso de cigarrillos en el mes previo.

Determinación del tamaño de las muestras

El objetivo primario es estimar el efecto de L104EA29Ylg en tasas de supervivencia de sujeto e injerto y función renal a los 12 meses en comparación con CsA. Los 2 criterios de valoración co-primarios son: (1) la proporción de sujetos con un injerto de supervivencia a los 12 meses postrasplante y (2) la proporción de sujetos cuya VFG medida a los 12 meses es < 60 ml/min/1,73 m², y/o cuya VFG medida se redujo ≥ 10 ml/min/1,73 m² del Mes 3 al Mes 12. Un tamaño de muestra de 180 sujetos por grupo de tratamiento proporcionará 83 % de potencia para determinar que el límite superior de los IC bilaterales al 97,3 % para la diferencia absoluta (entre cada régimen de L104EA29Ylg y el régimen de CsA) en el criterio de valoración co-primario (supervivencia del sujeto e injerto) no superarán el 10 %, si la verdadera tasa de supervivencia del sujeto e injerto a los 12 meses es del 80 % para el régimen de CsA y el 83 % para cada uno de los 2 regímenes de L104EA29Ylg. Para el criterio de valoración de función renal, el tamaño de muestra de 180 sujetos por grupo tiene potencia para detectar una reducción del 25 % en la proporción de sujetos que cumplen el criterio de valoración de VFG medida para cada régimen de L104EA29Ylg en comparación con el régimen de CsA, suponiendo que el 75 % de sujetos de CsA cumplen el criterio de valoración de la función renal y 25 % de abandonos por grupo de tratamiento. En general, 180 sujetos por grupo de tratamiento proporcionarán al menos 80 % de potencia para detectar un régimen de L104EA29Ylg que cumple ambos criterios de valoración co-primarios con error de Tipo 1 general controlado al nivel de significación de 0,05 (ajuste de Dunnett).

Criterios de inclusión

Población diana: 1) El sujeto es un receptor por primera vez de un trasplante de riñón de donante muerto. 2) El donante y/o el riñón del donante cumplen al menos 1 de los siguientes criterios ampliados para donación de órganos: a) edad del donante ≥ 60 años O b) edad del donante de 50 – 59 años y 1 de los siguientes: (i) accidente cerebrovascular (ACV) + hipertensión + SCr $> 1,5$ mg/dl O (ii) ACV + hipertensión O (iii) ACV + SCr $> 1,5$ mg/dl O (iv) hipertensión + SCr $> 1,5$ mg/dl o c) TIC ≥ 24 horas, edad del donante > 10 años O d) donante con muerte cardíaca (donante sin pulso cardíaco) 3) hombres y mujeres, de 18 años de edad y mayores, inclusive 4) mujeres en edad fértil deben usar un método adecuado de anticoncepción para evitar embarazo durante el estudio y durante hasta 8 semanas después del estudio de tal manera que el riesgo de embarazo se minimice. Las mujeres en edad fértil incluyen cualquier mujer que haya experimentado menarquia y que no se haya sometido a esterilización quirúrgica exitosa (histerectomía, ligamiento de tubos bilaterales u ooforectomía bilateral) o no sea postmenopáusica (definida como amenorrea ≥ 12 meses consecutivos; o mujeres con terapia de reemplazo hormonal con nivel de hormona foliculoestimulante en suero documentada > 35 mUI/ml). Incluso las mujeres que están usando hormonas anticonceptivas orales, implantadas o inyectables o productos mecánicos tales como dispositivo intrauterino o métodos de barrera (diafragma, preservativos, espermicidas) para evitar el embarazo o practiquen la abstinencia o cuando el compañero sea estéril (por ejemplo, vasectomía), deberían considerarse con potencial para tener hijos. Las mujeres en edad fértil deben tener un ensayo de embarazo de suero negativo (sensibilidad mínima 25 UI/l o unidades equivalentes de gonadotropina coriónica humana [HCG] en un periodo de 72 horas antes del inicio de la medicación del estudio. 5) Los hombres deben usar un método adecuado de anticoncepción a lo largo del estudio, y durante hasta 8 semanas después de la última infusión, de modo que el riesgo de embarazo de sus parejas se minimice.

Criterios de exclusión

1) Mujeres en edad fértil que no desean o no pueden usar un método aceptable para evitar el embarazo durante el periodo completo del estudio y durante hasta 8 semanas después de la última infusión. 2) Mujeres que están embarazadas o en lactancia. 3) Mujeres con una prueba de embarazo positiva al administrar o antes de la administración del fármaco del estudio. 4) Hombres que no desean o no pueden usar un método adecuado de anticoncepción durante el periodo completo del estudio y durante hasta 8 semanas después de la última infusión de medicamento del estudio. 5) Edad del donante < 10 años. 6) Sujetos con enfermedad renal subyacente de: a) Glomerulosclerosis segmental focal (demostrada por biopsia) b) Glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo I o II, c) Síndrome urémico hemolítico/síndrome de púrpura trombocitopénica trombótica. 7) Sujetos con PRA actual ≥ 30 %. 8) Sujetos con una compatibilidad cruzada linfocitotóxica de células T positiva. 9) Sujetos con cualquier trasplante de órgano sólido previo (incluyendo riñón). 10) Sujetos que reciben un trasplante simultáneo de órgano sólido (corazón, hígado, páncreas) o células (islote, médula ósea, células madre). 11) Sujetos que reciben riñones emparejados del donante de criterios ampliados (trasplante de riñón doble). 12) Sujetos que son positivos para anticuerpos de la hepatitis C o positivos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para hepatitis C. 13) Sujetos que son positivos para antígeno de superficie de la hepatitis B o positivos por PCR para hepatitis B. 14) Sujetos con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) conocida. 15) Sujetos con tuberculosis (TB) activa que han requerido tratamiento en los 3 años previos o cualquier sujeto que haya requerido previamente terapia de combinación triple (o más) para TB. Los sujetos con un derivado proteico purificado (DPP) positivo conocido no serán elegibles para el estudio a no ser que completen el tratamiento para TB latente y tengan una prueba de rayos x torácico negativo en el momento de la admisión. Los ensayos de DPP realizados en los últimos 12 meses son aceptables siempre que haya documentación de los resultados. Los sujetos sin un DPP en los últimos 12 meses que tienen un resultado negativo previo pueden admitirse si también tiene una prueba de rayos x torácica negativa en el momento de la admisión, sin síntomas indicativos de TB, sin contactos con TB conocidos, que no residen actualmente en, o han viajado recientemente a, o han inmigrado previamente de un área endémica para TB. Una respuesta de DPP que es ≥ 10 mm de induración o una puntuación de Heaf de > 1 en sujetos no inmunizados para Bacilo de Calmette-Guérin (no BCG) o > 2 en sujetos inmunizados para BCG debería considerarse un ensayo positivo. Pueden aplicarse criterios más conservativos según las directrices publicadas y/o las normas locales aprobadas por la sociedad médica. 16) Sujetos con cualquier infección activa u otra contraindicación que normalmente excluiría trasplante. 17) Sujetos cuya esperanza de vida está gravemente limitada por patología u otra condición médica subyacente. 18) Sujetos con un historial de cáncer (distinto de cánceres de células cutáneas distintos de melanoma curados por resección local) en los últimos 5 años. 19) Sujetos con un historial de abuso de sustancias (drogas o alcohol) en los últimos 5 años, o trastornos psicóticos que no son compatibles con seguimiento de estudio adecuado. 20) Sujetos con enfermedad de úlcera péptica activa, diarrea crónica o mala absorción gastrointestinal. 21) Sujetos con valores de laboratorio local que son criterios de toxicidad común (CTC) de Grado II o mayor no pueden participar en el estudio. Sin embargo, ciertos parámetros de laboratorio especificados que son excepciones a CTC de Grado II se permitirán. Se observan las siguientes concesiones: Hematología: la hemoglobina puede estar por debajo de CTC de Grado II (pero no por debajo de 8 g/dl). Las plaquetas pueden estar por debajo de CTC de Grado II, pero no por debajo de 80.000/mm³ (80 x 10⁹/l). El recuento de glóbulos blancos totales (WBC) puede estar por debajo de CTC de Grado II, pero no por debajo de 3000/mm³ (3 x 10⁹/l). Los recuentos de granulocitos y linfocitos pueden ser cualquier valor. Química: los valores de SCr y nitrógeno de urea en sangre (NUS) pueden ser cualquier valor. La glucosa en sangre puede ser de cualquier valor. Análisis de orina: los resultados de análisis de orina pueden ser cualquier valor. 22) Todas las mujeres de 40 años y las mujeres de cualquier edad

que tengan parientes de primer grado con historial de carcinoma de mama o que tengan otros factores de riesgo de carcinoma de mama, deben hacerse una mamografía de cribado, o proporcionar resultados de una mamografía de cribado realizada en un intervalo de 6 meses de la admisión. Los sujetos con una mamografía que tiene sospecha de tumor maligno y en la que no puede excluirse razonablemente la posibilidad de tumor maligno después de evaluaciones clínicas, de laboratorio u otras de diagnóstico adicionales se excluirán. Si la mamografía de cribado no se realizó en un intervalo de 6 meses de la admisión, pero se considera que el sujeto es un candidato de trasplante adecuado por los criterios locales, puede obtenerse la mamografía basal en un periodo de 4 semanas después del trasplante. 23) Sujetos que tienen acceso i.v. difícil u otras razones que evitarían probablemente la evaluación del criterio de valoración co-primario de VFG medida o sujetos que es improbable que se sometan (por ejemplo, debido a problemas de coagulación preexistentes) o no deseen someterse a la biopsia de aloinjerto de 12 meses especificada por el protocolo. 24) Sujetos con un historial de verdadera alergia a agentes de contraste de rayos x yodados i.v. 25) Sujetos que han usado cualquier fármaco de investigación en los 30 días antes de la visita del Día 1. 26) Sujetos que se han tratado previamente con L104EA29Ylg. 27) Prisioneros o sujetos que están detenidos obligatoriamente (encarcelados involuntariamente) para tratamiento de una enfermedad psiquiátrica o física (por ejemplo, enfermedad infecciosa) no pueden admitirse en este estudio.

Administración de L104EA29Ylg

El Día 1 se define como el día del trasplante (Día postrasplante 0). La infusión de la dosis del Día 1 debería comenzar después de que el cirujano haya realizado una evaluación *intraoperatoria* inicial, y ha concluido que el sujeto sigue siendo un candidato de trasplante, y el trasplante se realizará, y antes de comenzar las anastomosis vasculares de trasplante. Las dosis de infusión se basarán en el peso corporal real del sujeto el Día del estudio 1, y no se modificará durante el transcurso del estudio, a no ser que haya un cambio de peso corporal $\pm 10\%$. El fármaco del estudio debería administrarse al sujeto a una velocidad relativamente constante durante 30 minutos. Deberían administrarse las dosis del Día 1 y Día 5 (Día postrasplante 4) con aproximadamente 96 horas de diferencia (± 6 horas). Se proporcionan posteriormente ventanas de infusión y visitas posteriores. Para sujetos con diálisis, la infusión de L104EA29Ylg y determinación del peso del sujeto deberían producirse después del tratamiento de diálisis.

Régimen de MI de L104EA29Ylg: Los sujetos asignados aleatoriamente al régimen de MI recibirán i.v. L104EA29Ylg (10 mg/kg) los Días 1 y 5, y después cada dos semanas durante 2 meses (Semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 12), y después 4 semanas hasta los 6 meses (Semanas 16, 20 y 24). Después de 6 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de MI recibirán L104EA29Ylg a la dosis de mantenimiento de 5 mg/kg cada 4 semanas hasta completar el ensayo a los 36 meses.

Régimen de LI de L104EA29Ylg: Los sujetos asignados aleatoriamente al régimen de LI recibirán i.v. L104EA29Ylg (10 mg/kg) los Días 1 y 5, y después cada 2 semanas durante 2 semanas (Semanas 2 y 4), y después cada 4 semanas durante 2 meses (Semanas 8 y 12). Después de 3 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de LI recibirán L104EA29Ylg a la dosis de mantenimiento de 5 mg/kg cada 4 semanas hasta completar el ensayo a los 36 meses. Se conservará la ocultación entre el grupo de LI y MI con el uso de 2 infusiones de placebo en el grupo de tratamiento de LI. Por lo tanto, se administrarán infusiones de placebo (dextrosa 5 % en agua para inyección [D5W]) a sujetos asignados aleatoriamente al régimen de LI las semanas 6 y 10.

Administración de Ciclosporina (CsA)

La dosis diaria de CsA debería administrarse en 2 dosis divididas en un programa uniforme en relación con el momento del día y las comidas. En los días de visita del estudio, el sujeto debe posponer la dosis de CsA matutina hasta después de las extracciones de nivel de CsA valle en sangre. Los días de visita del estudio, cuando el sujeto va a someterse a supervisión de TA normalizada y/o evaluación de VFG medida, estas medidas deben completarse antes de la dosificación de CsA. La dosis diaria inicial debería ser de 7 ± 3 mg/kg (es decir, 4-10 mg/kg). Las dosis posteriores deberían ajustarse para mantener un intervalo predefinido de concentraciones en suero valle: 1^{er} mes: nivel diana 150-300 ng/ml. Después del 1^{er} mes: nivel diana de 100-250 ng/ml. No se va a usar en este estudio supervisión de los niveles CsA usando la concentración en plasma 2 horas después de la dosis (C2). Aunque una declaración de consenso internacional reciente sobre el tratamiento de Neoral por supervisión de C2 favoreció el uso de supervisión de C2, también indicó claramente la falta de datos con respecto a los efectos a largo plazo en la función renal, incidencia de NAC, y perfil de seguridad general asociados a la supervisión de C2. 24 Además, no todos los sujetos son adecuados para supervisión C2, incluyendo sujetos con diabetes, vaciado gástrico lento o sujetos que usan medicación simultánea que altera la eliminación de CsA. Además, los niveles de C2 bajos pueden resultar de verdadera absorción baja (en la que debería aumentarse la dosis de CsA) o de absorción lenta (en la que hay una concentración en plasma máxima retardada y un aumento de la dosis puede producir toxicidad). Finalmente, esta práctica no es universal, y validar de forma prospectiva esta práctica está más allá del alcance del protocolo actual. Para información de prescripción adicional, véase el prospecto. La CsA debería iniciarse en todos los sujetos el Día 7. Para los sujetos en los que el investigador cree que no va en beneficio del sujeto iniciar CsA en absoluto (por ejemplo, debido a función renal alterada) y elige usar una medicación que no es del estudio (por ejemplo, sirolimus) en su lugar, esta acción se considerará una interrupción de la medicación del estudio.

Para sujetos con función de aloinjerto inmediato: Para sujetos asignados aleatoriamente a tratamiento con CsA, la primera dosis de CsA debería administrarse tan pronto como, pero no hasta que, haya pruebas de función de aloinjerto adecuada. La función de aloinjerto adecuada se define como una reducción de la SCr de al menos 1 mg/dl en comparación con el valor postrasplante inicial o la producción de orina ≥ 250 ml en un periodo de 12 horas (o menos) después del trasplante.

Para sujetos con función de aloinjerto renal alterada y FIT anticipada: Los sujetos con función de aloinjerto alterada postoperatoria y FIT anticipadas son elegibles para recibir, pero no es necesario que reciban, una preparación antilinfocítica policlonal. Tanto si un sujeto recibe una preparación de linfocitos policlonal como si no, debería iniciarse CsA cuando haya pruebas de recuperación de la función del aloinjerto (como se ha definido anteriormente) o el Día 7.

Corticosteroides

Todos los sujetos en este estudio se tratarán con corticosteroides diarios. **MANTENIMIENTO – REDUCCIÓN PROGRESIVA DE ESTEROIDES.** Día del trasplante (Día 1): metilprednisolona (como succinato sódico) 500 mg i.v. al llegar al quirófano (OR).

Día 2: metilprednisolona (como succinato sódico) 250 mg i.v.

Día 3: prednisona (o prednisolona) 100 mg por vía oral (p.o.)

Día 4 a Día 14 (es decir, al final de la Semana 2): reducción progresiva de prednisona (o prednisolona) de 20 - 30 mg p.o. al día.

Día 15 a Mes 6. Reducción progresiva de prednisona (o prednisolona) no menor de 2,5 mg. p.o. al día.

Los sujetos deben permanecer con al menos 2,5 mg p.o. al día hasta el tercer año.

Las primeras 2 dosis (Día del estudio 1, día del trasplante y Día del estudio 2, Día postoperatorio 1) deben administrarse i.v. Las dosis restantes deben administrarse p.o. Sin embargo, se permite dosificación i.v. de una dosis equivalente de metilprednisolona en momentos en que no sea posible la dosificación oral. Dichas razones para dosificación i.v. en lugar de p.o. son enfermedad intercurrente, íleo postoperatorio u otras causas a criterio del investigador. Si no está disponible metilprednisolona, se permite el uso de otro agente corticosteroide i.v. de dosis equivalente a metilprednisolona.

Dosificación de mofetil micofenolato

Todos los sujetos en este estudio se tratarán con MMF. Debería administrarse MMF diariamente en 2 dosis divididas en un programa uniforme en relación con el momento del día y las comidas. La dosis debería ser 2 g al día; sin embargo, en afroamericanos, pueden administrarse 3 g al día a criterio del investigador. Debería administrarse MMF p.o. Se permite la dosificación intravenosa, si es necesario debido a enfermedad intercurrente, íleo postoperatorio u otras causas a criterio del investigador. La primera dosis debería administrarse de forma preoperatoria. Las dosis posteriores deberían administrarse p.o. tan pronto como el sujeto sea capaz de tolerar medicamentos por la boca. La dosis y el programa pueden ajustarse según se determine basándose en los valores de laboratorio (por ejemplo, WBC reducidos) y tolerabilidad del sujeto (véase posteriormente). Para información de prescripción completa, véase el prospecto.

Para sujetos que desarrollan náuseas, diarrea u otros efectos adversos gastrointestinales relacionados con MMF (por ejemplo, síntomas completamente evaluados y que se considera que no tienen etiología distinta de la intolerabilidad a MMF), la dosis de MMF puede reducirse hasta la dosis tolerada máxima. Para sujetos que desarrollan neutropenia (recuento de neutrófilos absoluto $< 1,3 \times 10^3/l$), la dosificación con MMF debería interrumpirse o debería reducirse la dosis según el prospecto.

Dosificación de Basiliximab

Todos los sujetos en este estudio se tratarán con el régimen de dosificación recomendado de basiliximab. Debería administrarse basiliximab a través de una vena periférica o central solamente. El basiliximab reconstituido (20 mg en 5 ml) debería diluirse a un volumen de 50 ml con solución normal o dextrosa al 5 % y administrarse como una infusión i.v. durante 20-30 minutos. La primera dosis de 20 mg debería administrarse el Día 1 (el día del trasplante; Día postoperatorio 0). Para sujetos asignados aleatoriamente a L104EA29Ylg, esta primera infusión de basiliximab debería producirse tan pronto como sea posible después de completar la infusión de L104EA29Ylg. La segunda dosis de 20 mg debería proporcionarse el Día 5 (día postoperatorio 4). La segunda dosis de basiliximab no debería administrarse a sujetos si han recibido o se espera que reciban un tratamiento de agotamiento de linfocitos. Para información adicional, véase el prospecto.

Preparaciones antilinfocíticas policlonales para función de aloinjerto renal alterada y FIT anticipada

El uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales (timoglobulina o ATGAM) se permite, pero no se requiere, para sujetos asignados aleatoriamente a CsA que experimentan función de aloinjerto renal alterada y FIT anticipada después de trasplante. Se permite el uso de otras preparaciones antilinfocíticas policlonales o globulinas antitimocitos policlonales en regiones en las que existe autorización en el mercado, y si están indicadas para el tratamiento de rechazo agudo en trasplante renal. Debe observarse que OKT3 no debe usarse para este fin, pero puede usarse para el tratamiento de Grado IIb de Banff 97 o mayor rechazo agudo o rechazo agudo resistente a esteroides. No se permite el uso de Campath 1-H® (alemtuzumab) en este protocolo, ya que no está indicado para su uso en trasplante de riñón. Estos agentes se utilizan ampliamente en esta capacidad para proporcionar inmunosupresión hasta que la función del injerto permite la administración de CsA. Por lo tanto, pueden usarse preparaciones antilinfocíticas policlonales en esta situación clínica, a criterio del investigador, en sujetos que cumplen ≥ 1 de los siguientes criterios que se observan en presencia de una arteria y vena de trasplante patente y sin pruebas de hidronefrosis por ecografía: a) producción de orina $< 250 \text{ cm}^3/12$ horas, b) sin mejora significativa ($< 1 \text{ mg/dl}$) en ScR desde el valor basal durante las primeras 24-72 horas después del trasplante, c) tratamiento de diálisis. El uso de estos agentes para función de aloinjerto renal alterada y FIT anticipada no se permite en sujetos tratados con L104EA29Ylg.

Dosificación de sulfametoxazol/trimetoprim

Todos los sujetos que participan en este estudio que no tienen contraindicaciones debería recibir profilaxis de sulfametoxazol/trimetoprim para evitar infecciones del tracto urinario y por *Pneumocystis carinii*. La dosificación y la administración deben determinarse por el nivel de función renal coherente con el prospecto. Los sujetos con una contraindicación o intolerancia a fármacos sulfa o trimetoprim pueden recibir terapia profiláctica con pentamidina inhalada a criterio del investigador. Para información de prescripción completa, véase los prospectos.

Dosificación de valganciclovir / ganciclovir, aciclovir / valaciclovir

Todos los receptores que no tienen contraindicaciones para valganciclovir, ganciclovir, aciclovir y valaciclovir deberían tratarse de forma profiláctica con estos fármacos para evitar infecciones debidas a CMV y Herpes simple. Las siguientes son directrices para dosificación y duración del tratamiento profiláctico:

Profilaxis durante los primeros 10 días después del trasplante o durante la terapia de agotamiento de células T: Todos los sujetos de trasplante recibirán valganciclovir o ganciclovir según el protocolo durante 10 días después de la cirugía. Si se tratan con terapia de agotamiento de células T para terapia de inducción o tratamiento para rechazo agudo, el sujeto recibirá valganciclovir o ganciclovir durante el transcurso de la terapia de agotamiento de células T. Si se da de alta al sujeto antes de 10 días, se comenzará valganciclovir, ganciclovir, valaciclovir o aciclovir oral basándose en el estado inmunitario para CMV como se describe posteriormente.

Valganciclovir para profilaxis: **Eliminación de creatinina** ≥ 60 ml/min, dosis de 900 mg al día; **Eliminación de creatinina** 40 - 59 ml/min, dosis de 450 mg al día; **Eliminación de creatinina** < 40 ml/min, dosis de 450 mg cada dos días.

Ganciclovir para profilaxis. Si el sujeto es incapaz de tolerar medicamentos orales, o no está disponible valganciclovir para su uso, puede sustituirse con suspensión o cápsulas de ganciclovir. **Eliminación de creatinina** ≥ 70 ml/min, dosis de 1 g 3 veces al día; **Eliminación de creatinina** 50 - 69 ml/min, dosis de 500 mg 3 veces al día; **Eliminación de creatinina** 25 - 49 ml/min, dosis de 500 mg dos veces al día; **Eliminación de creatinina** 10 - 24 ml/min, dosis de 500 mg al día; **Eliminación de creatinina** < 10 ml/min, dosis de 500 mg dos veces después de hemodiálisis 3 veces/semana. Si se necesita ganciclovir i.v., véase el prospecto para dosificación.

Profilaxis después de 10 días de trasplante hasta al menos 3 Meses: Donante seropositivo para anticuerpo de CMV a un receptor seronegativo para anticuerpo de CMV: Continuar con protocolo de valganciclovir o ganciclovir enumerado anteriormente durante ≥ 3 meses.

Donante seropositivo o seronegativo para anticuerpo de CMV a un receptor seropositivo para anticuerpo de CMV: Aciclovir oral durante ≥ 3 meses después del trasplante: **Creatinina en suero** ≥ 50 ml/min, dosis de 800 mg por vía oral 4 veces al día; **Creatinina en suero** 25 - 49 ml/min, dosis de 800 mg por vía oral 3 veces al día; **Creatinina en suero** 11 - 24 ml/min, dosis de 800 mg por vía oral dos veces al día; **Creatinina en suero** < 10 ml/min, dosis de 800 mg por vía oral al día; en hemodiálisis, dosis de 800 mg al día después de hemodiálisis.

El aciclovir puede sustituirse por valaciclovir en el momento del alta por conveniencia del sujeto. **Creatinina en suero** ≥ 50 ml/min, dosis de 500 mg por vía oral 2 veces al día; **Creatinina en suero** 25 - 49 ml/min, dosis de 500 mg por vía oral al día; **Creatinina en suero** 11 - 24 ml/min, dosis de 500 mg por vía oral al día; **Creatinina en suero** < 10 ml/min, dosis de 250 mg por vía oral al día; con hemodiálisis, dosis de 250 mg al día después de hemodiálisis.

Donante seronegativo para anticuerpo de CMV a un receptor seronegativo para anticuerpo de CMV: Protocolo de aciclovir oral necesario para profilaxis de herpes solamente: continuar durante ≥ 3 meses después del trasplante. Aciclovir 400 mg p.o. dos veces al día o puede sustituirse aciclovir por valaciclovir en el momento del alta por conveniencia del sujeto. Para información de prescripción completa, refiérase a los prospectos.

5

Procedimientos de visita solamente de infusión

a) Para sujetos asignados aleatoriamente a tratamiento de L104EA29Ylg: Se requiere una prueba de embarazo negativa antes de la administración de L104EA29Ylg. La dosis debe basarse en el peso del sujeto en la visita de estudio previa más reciente. Los sujetos deberían supervisarse con respecto a signos vitales (antes y después de la infusión) y deberían evaluarse los AA. Pueden requerirse muestras de PK en algunas visitas.

10

b) Para sujetos asignados aleatoriamente a tratamiento de CsA: Se contactará a los sujetos para evaluar AA solamente. La visita puede ser un contacto telefónico, y debería producirse en la ventana de visita prescrita para la visita específica.

15

Ventanas de visita

a) Para sujetos asignados aleatoriamente a tratamiento de L104EA29Ylg: las dosis de los Días 1 y 5 deberían administrarse aproximadamente en un intervalo de 96 horas (± 6 horas). Para facilitar la programación de las visitas solamente de infusión, se permiten las siguientes ventanas para dosis posteriores: **Visita** de la Semana 2, **Ventana de Visita** fecha diana ± 2 días; **Visita** de la Semana 4 – Mes 6, **Ventana de Visita** fecha diana ± 3 días, **Visita** del Mes 7 – Mes 36, **Ventana de Visita** fecha diana ± 5 días; **Visita** de seguimiento de 8 semanas, **Ventana de Visita** fecha diana ± 5 días.

20

b) Para sujetos asignados aleatoriamente a tratamiento con CsA: Después del Día 5, solamente se requiere que los sujetos acudan a visitas clínicas las Semanas 2, 4, 8 y 12; después visita en cada intervalo de 3 meses. En las visitas de intervalos distintos de 3 meses (es decir, las Semanas 6, 10, 16, 20, 28, 32, etc.), se realizará un contacto telefónico para recoger información de AA. Se realizarán visitas clínicas y de contacto en las mismas ventanas de visita que se ha especificado anteriormente para sujetos asignados aleatoriamente a L104EA29Ylg. Las fechas diana para las evaluaciones de VFG de 3 y 12 meses son Semana 12 ± 14 días y Semana 52 ± 14 días. En ciertas circunstancias, y con la aprobación previa del monitor médico, las evaluaciones de VFG medidas el Mes 3 y Mes 12 pueden realizarse hasta el Mes 6 y Mes 15, respectivamente. Dichas razones que pueden requerir una extensión de una evaluación de VFG medida incluyen la presencia de un episodio de rechazo agudo simultáneo o la necesidad de repetir una evaluación por razones técnicas.

25

30

35

La fecha diana para la biopsia de aloinjerto de 12 meses es la Semana 52 ± 14 días. De forma similar, en ciertas circunstancias y con la aprobación previa del control médico, la biopsia de aloinjerto puede obtenerse hasta el Mes 15. Dichas razones que pueden requerir la extensión de una biopsia de aloinjerto incluyen necesidad temporal de anticoagulación.

40

Ejemplo 5

Un experto en la materia utilizará el programa de administración descrito en el Ejemplo 4 anteriormente para diseñar un estudio que comprenda una población de estudio, criterios de donantes y/u objetivos diferentes. Por ejemplo, este estudio de trasplante evaluará sujetos que reciban un trasplante de riñón de un donante vivo o donante muerto con tiempo isquémico frío anticipado < 24 horas. Serán elegibles sujetos con diversos niveles de riesgo inmunológico. Sin embargo, el estudio excluirá sujetos de mayor riesgo inmunológico. Los sujetos se asignarán aleatoriamente a las ramas de MI, LI o CsA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4.

45

Objetivos primarios

Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en el compuesto de supervivencia de sujeto e injerto a los 12 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en el compuesto de VFG medida < 60 ml/min/1,73 m² el Mes 12 o una reducción de VFG medida ≥ 10 ml/min/1,73 m² del Mes 3 al Mes 12. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la incidencia de rechazo agudo a los 12 meses.

50

55

Objetivos secundarios

Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en el compuesto de VFG medida a los 12 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en NAC demostrada por biopsia a los 12 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en los componentes individuales del criterio de valoración compuesto primario de VFG medida ≥ 60 ml/min/1,73 m² el Mes 12 o una reducción de VFG medida ≥ 10 ml/min/1,73 m² del Mes 3 al Mes 12. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en el criterio de valoración compuesto triple de muerte, pérdida de injerto y rechazo agudo a los 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con una VFG medida < 60 ml/min/1,73 m² a los 24 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en VFG medida a los 3 y 24 meses y cambio de línea basal (3

60

65

meses) a 12 meses y a 24 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con una VFG medida $< 30 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ a los 12 y 24 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en VFG calculada a los 6, 12, 24 y 36 meses y cambio de 6 meses a 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en DMTP a los 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en medidas de hipertensión a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo TAS y TAD, incidencia y prevalencia de la hipertensión e hipertensión controlada, e intensidad del régimen de tratamiento. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en medidas de dislipidemia, a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo colesterol total, no HDL, lipoproteína de baja densidad (LDL) y HDL, y TG en suero, incidencia y prevalencia de dislipidemia y dislipidemia controlada, e intensidad del régimen de tratamiento. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en supervivencia del sujeto y el injerto a los 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con una VFG calculada $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ a los 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en medidas de rechazo agudo a los 6, 12, 24 y 36 meses, incluyendo la incidencia y gravedad del rechazo agudo, el uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales para función renal alterada y función de injerto retardada (FIT), anticipada, el uso inicial de terapia de agotamiento de linfocitos para el tratamiento de rechazo agudo, la incidencia del rechazo agudo resistente a esteroides, la incidencia de la recuperación completa (vuelta de SCr a la línea basal) después de rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratados independientemente de los hallazgos histológicos, y el tiempo hasta la aparición de rechazo agudo. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en QoL. Evaluar la seguridad general de L104EA29Ylg, en relación con CsA. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la pendiente e intersección de VFG calculada de 3 meses a 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos de VFG calculada $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ el Mes 12 o sujetos con una reducción de VFG calculada del Mes 3 al Mes 12 de al menos $10 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la incidencia de FIT. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con enfermedad renal crónica de Estadio 1 a Estadio 5 a los 12 y 24 meses como se evaluó por VFG medida. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la proporción de sujetos con enfermedad renal crónica de Estadio 1 a Estadio 5 a los 36 meses como se evaluó por VFG medida. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en un criterio de valoración de enfermedad cardiovascular compuesto (muerte cardiovascular adjudicada, infarto de miocardio, ictus isquémico y procedimientos de revascularización [quirúrgicos o percutáneos]) a los 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en un criterio de valoración de enfermedad cardiorenal compuesto (muerte, pérdida de injerto, infarto de miocardio no letal e ictus) a los 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la Puntuación de Riesgo de Framingham a los 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, la incidencia del abandono del fármaco de estudio. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en anticuerpos anti-antígeno de leucocito humano (HLA) de donante. Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en anticuerpos receptores de angiotensina II de tipo 1 (AT1). Evaluar los efectos de L104EA29Ylg, en relación con CsA, en la positividad de C4d en muestras de ensayo de biopsia.

Diseño del estudio

La duración del estudio es de 3 años con un periodo de seguimiento de 8 semanas posterior para evaluaciones de seguridad. Este es un estudio aleatorio, con ocultación parcial, con controles activos, de grupos paralelos. Todos los sujetos recibirán un trasplante de riñón de un donante vivo o un donante muerto con un TIC anticipado < 24 horas.

Aproximadamente 660 sujetos se asignarán aleatoriamente en una relación 1:1:1 a tratamiento con L104EA29Ylg (régimen MI), L104EA29Ylg (régimen LI) o CsA. Todos los sujetos recibirán también inducción con basiliximab y un régimen inmunosupresor de mantenimiento de fondo de MMF y corticosteroides. Los sujetos asignados aleatoriamente al régimen MI recibirán i.v. L104EA29Ylg (10 mg/kg) los Días 1 y 5, después cada 2 semanas hasta el Mes 3 (Semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 12) y después cada 4 semanas hasta 6 meses (Semanas 16, 20 y 24). Después de 6 meses, los sujetos con el grupo de tratamiento de MI recibirán la dosis de mantenimiento de L104EA29Ylg 5 mg/kg administrada cada 4 semanas hasta completar el ensayo a los 36 meses. Los sujetos asignados aleatoriamente al régimen de LI recibirán i.v. L104EA29Ylg (10 mg/kg) los Días 1 y 5, y después cada 2 semanas hasta el Mes 1 (Semanas 2 y 4) y cada 4 semanas hasta el Mes 3 (Semanas 8 y 12). Después de 3 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de LI recibirán la dosis de mantenimiento de L104EA29Ylg 5 mg/kg administrada cada 4 semanas hasta completar el ensayo a los 36 meses. Se conservará la ocultación entre los grupos de LI y MI con el uso de infusiones de placebo en el grupo de tratamiento de LI las Semanas 6 y 10. Los sujetos asignados aleatoriamente a CsA recibirán dosis dos veces al día que se diseñan para conseguir un intervalo de concentración en suero valle específico coherente con la práctica médica actual. La seguridad y eficacia de L104EA29Ylg se evaluarán a los 1, 2 y 3 años. Un DSMB independiente revisará datos del estudio continuamente, y hará recomendaciones para alterar la dirección del ensayo, si es necesario.

Población de estudio

La población del estudio incluye receptores de aloinjertos renales de donantes vivos o donantes muertos con un TIC anticipado < 24 horas. En general, los criterios inmunológicos no desempeñarán un papel importante en la selección del sujeto. Son elegibles sujetos a diversos niveles de riesgo inmunológico. El estudio, sin embargo, excluirá a

sujetos de mayor riesgo inmunológico (compatibilidad cruzada positiva, anticuerpos reactivos a panel actual [ARP] de $\geq 50\%$, o los previamente trasplantados con un ARP actual $\geq 30\%$). Estos sujetos pueden requerir terapia para reducir su carga de anticuerpos, tal como plasmaféresis, que está más allá del alcance de este protocolo. Los sujetos se admitirán en aproximadamente 100 sitios en todo el mundo.

5

Criterios de inclusión

Población diana: 1) El sujeto es un receptor de un trasplante de riñón de donante vivo o donante muerto con un TIC anticipado < 24 horas. 2) Hombres y mujeres, de 18 años de edad y mayores, inclusive. 3) Las mujeres en edad fértil deben usar un método adecuado de anticoncepción para evitar el embarazo durante todo el estudio y durante hasta 8 semanas después del estudio de tal manera que el riesgo de embarazo se minimice. Las mujeres en edad fértil incluyen cualquier mujer que haya experimentado menarquia y que no se haya sometido a esterilización quirúrgica exitosa (histerectomía, ligamiento tubal bilateral u ooforectomía bilateral) o no es postmenopáusica (definida como amenorrea durante 12 meses consecutivos; o mujeres con terapia de reemplazo hormonal [HRT] con nivel de hormona foliculoestimulante [FSH] en suero documentado >35 mIU/ml). Incluso las mujeres que están usando hormonas anticonceptivas orales, implantadas o inyectables o productos mecánicos tales como dispositivo intrauterino o métodos de barrera (diafragma, preservativos, espermicidas) para evitar el embarazo o que practican la abstinencia o cuando el compañero sea estéril (por ejemplo, vasectomía), deberían considerarse con posibilidad de quedarse embarazadas. Las mujeres en edad fértil deben tener una prueba de embarazo de suero negativa (sensibilidad mínima 25 UI/l o unidades equivalentes de gonadotropina coriónica humana [HCG] en un periodo de 72 horas antes del inicio de la medicación del estudio.

10

15

20

Criterios de exclusión

1) Las mujeres en edad fértil que no desean o no pueden usar un método aceptable para evitar el embarazo durante el periodo completo del estudio y durante hasta 8 semanas después de la última infusión. 2) Mujeres que están embarazadas o en lactancia. 3) Mujeres con una prueba de embarazo positiva al admitirse o antes de la administración del fármaco del estudio. 4) Pares de receptores de donantes genéticamente idénticos (es decir gemelos idénticos). 5) Edad del donante <10 años. 6) Sujetos receptores de un órgano de donante de criterio ampliado como se define en: a) edad del donante ≥ 60 años b) edad del donante de 50 - 59 años y 1 de los siguientes: (i) Accidente cerebrovascular (ACV) + hipertensión + SCr $> 1,5$ mg/dl (ii) ACV + hipertensión (iii) ACV + SCr $> 1,5$ mg/dl (iv) Hipertensión + SCr $> 1,5$ mg/dl c) TIC anticipado ≥ 24 horas o d) donante con muerte cardíaca (donante sin latido cardíaco). 7) Sujetos con enfermedad renal subyacente de: a) Glomerulosclerosis segmental focal primaria, b) Glomerulonefritis membranoproliferativa de Tipo I o II, c) Síndrome urémico hemolítico (SUH) / síndrome de púrpura trombocitopénica trombótica. Si un sujeto tiene ESRD de etiología desconocida y/o no tiene ningún diagnóstico confirmado histológicamente, el sujeto puede admitirse en el estudio siempre que no haya ninguna señal o síntoma clínico coherente con el diagnóstico clínico de glomerulosclerosis segmental focal primaria, glomerulonefritis membranoproliferativa de Tipo I o II o SUH, como considere el investigador. 8) Sujetos que se someten a trasplante primario (por primera vez) con un ARP actual $\geq 50\%$, o sujetos que se someten a retrasplante con un ARP $\geq 30\%$. 9) Sujetos con pérdida de injerto previa debida a rechazo agudo. 10) Sujetos con una compatibilidad cruzada linfocitotóxica de células T positiva. 11) Sujetos con trasplante de órgano sólido no renal previo (sujetos que se someten a retrasplante de riñón son elegibles siempre que se cumplan otros criterios del estudio) o sujetos que se someten a trasplantes multiorgánicos (por ejemplo, riñón-páncreas) o sujetos que se considera que es probable que tengan un segundo trasplante de órgano sólido o células (por ejemplo, trasplante de páncreas o islotes) en los siguientes 3 años por el investigador. 12) Sujetos que reciben un trasplante simultáneo de órgano sólido (corazón, hígado, páncreas) o células (islotes, médula ósea, células madre). 13) Sujetos que reciben riñones emparejados (trasplantes de riñones dobles o en bloque). 14) Sujetos que son positivos para anticuerpos conocidos de la hepatitis C o positivos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la hepatitis C. 15) Sujetos que son positivos para antígeno de superficie de la hepatitis B o positivos por PCR para la hepatitis B conocidos. 16) Sujetos con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) conocida. 17) Sujetos con tuberculosis (TB) activa que ha requerido tratamiento en los 3 años anteriores o cualquier sujeto que haya requerido previamente terapia de combinación triple (o más) para TB. Los sujetos con un derivado de proteína purificada (DPP) positiva conocida no serán elegibles para el estudio a no ser que completen el tratamiento para TB latente y tengan una prueba de rayos x torácica negativa en el momento de la admisión. El ensayo de DPP realizado en los 12 meses anteriores es aceptable siempre que haya documentación de los resultados. Los sujetos sin un DPP en los últimos 12 meses que han tenido un resultado negativo previo pueden admitirse si también tienen una prueba de rayos x torácica negativa en el momento de la admisión, sin síntomas indicativos de TB, sin contactos de TB conocidos, no reside actualmente en, ha viajado recientemente a, o ha emigrado previamente de un área endémica para TB. Una respuesta de DPP que es ≤ 10 mm de induración de una puntuación de Heaf de > 1 en sujetos no inmunizados para Bacilo de Calmette-Guérin (no BCG) o > 2 en sujetos inmunizados con BCG debería considerarse un ensayo positivo. Pueden aplicarse criterios más conservativos según las directrices publicadas y/o los patrones locales admitidos por la sociedad médica. 18) Sujetos con cualquier infección activa u otra contraindicación que normalmente excluiría el trasplante. 19) Sujetos cuya esperanza de vida está gravemente limitada por la patología u otra condición médica subyacente. 20) Sujetos con un historial de cáncer (cánceres de

25

30

35

40

45

50

55

60

65

células cutáneas distintos de melanoma curados por resección local) en los últimos 5 años. 21) Sujetos con un historial de abuso de sustancias (drogas o alcohol) en los últimos 5 años, o trastornos psicóticos que no son compatibles con el seguimiento de estudio adecuado. 22) Sujetos con enfermedad de úlcera péptica activa, diarrea crónica o mala absorción gastrointestinal.

5 La administración de y las ventanas de visita para regímenes de MI y LI de L104EA29Ylg y CsA, incluyendo la lista requerida, serán como se ha descrito anteriormente y en el Ejemplo 4.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company Hagerty, David Rusnak, James

<120> MÉTODOS PARA TRATAR TRASTORNOS INMUNITARIOS ASOCIADOS A TRASPLANTE DE INJERTOS CON MOLÉCULAS DE CTLA4 MUTANTES SOLUBLES

15 <130> 10522 PSP

<160> 10

20 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 41

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo de CTLA4 de oncostatina M (OMCTLA4)

30 <400> 1

gagggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 2

<211> 42

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso de CTLA4 de oncostatina M (OMCTLA4)

40 <400> 2

gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 3

<211> 1152

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> L104EA29Ylg

<400> 3

ES 2 634 260 T3

atgggtgtac tgctcacaca gaggaogctg ctcagtctgg tcottgcaact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtaactggc cagcagccga 120
 ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca totccaggca aatatactga ggtccgggtg 180
 acagtgcttc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaaatgagt 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
 acatceccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
 ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg 600
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
 cataatgcca agacaaaagcc gggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
 gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
 aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg cgtggagtg ggagagcaat 960
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctccogtgc tggactccga cggtctcttc 1020
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
 tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
 ccgggtaaat ga 1152

5 <210> 4
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> L104EA29Ylg
 <400> 4

ES 2 634 260 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

ES 2 634 260 T3

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

ES 2 634 260 T3

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> L104Elg

<400> 5

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcaogtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
 ggcategcta gctttgtgtg tgagtatgca totccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
 acagtgcttc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcaagg 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 cgtcagtcct cctcttcccc 540
 caaaaaccca aggacacctt catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720

ES 2 634 260 T3

gtcctcaccg tctctgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
 gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtctttctca 1080
 tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacaagc agaagagcct ctccctgtct 1140
 ccgggtaaat ga 1152

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

<220>
 <223> 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

ES 2 634 260 T3

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

ES 2 634 260 T3

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

5 <210> 7
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> CTLA4lg

<400> 7

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcaagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtaactggc cagcagccga 120
 ggcacgccta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
 acagtgcttc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagggtg 360
 gagctcatgt acccacgcc atactacctg ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
 attgatccag aaccgtgcc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
 acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
 caaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 660
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 720
 gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc 780
 aaaaagccc tcccagccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg cgtggagtg ggagagcaat 960
 gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
 tgctcctgta tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
 ccgggtaaata ga 1152

15 <210> 8
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> CTLA4lg

ES 2 634 260 T3

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

ES 2 634 260 T3

	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> 9
 <211> 636
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(636)

10

<220>
 <221> mat_peptide

ES 2 634 260 T3

<222> (79) .. ()

<400> 9

```

atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
  -25                      -20                      -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10                      -5                      -1 1                      5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag      144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
          10                      15                      20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg      192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
          25                      30                      35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg      240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
          40                      45                      50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc      288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
  55                      60                      65                      70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
          75                      80                      85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
          90                      95                      100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
          105                      110                      115

ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
          120                      125                      130

tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc      528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
  135                      140                      145                      150

aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa      576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
          155                      160                      165

atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag oct tat ttt      624
Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
          170                      175                      180

att ccc atc aat
Ile Pro Ile Asn
          185

```

<210> 10
 <211> 212
 <212> PRT

10

ES 2 634 260 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 90 95 100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
 120 125 130

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
 135 140 145 150

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
 155 160 165

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
 170 175 180

Ile Pro Ile Asn
 185

5

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de CTLA4 mutante que comprende un dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en SEQ ID NO. 8 que comienza con alanina en la posición 26 o metionina en la posición 27 y termina con ácido aspártico en la posición 150, en la que en el dominio extracelular una alanina en la posición 55 se sustituye con una tirosina y una leucina en la posición 130 se sustituye con un ácido glutámico, para uso en el tratamiento de un trastorno inmunitario asociado a trasplante de injerto, en donde el tratamiento comprende un régimen de fase temprana y un régimen de fase de mantenimiento y en donde (i) el régimen de fase temprana varía de los primeros 3 a los 6 meses después del trasplante y comprende la administración de la molécula de CTLA4 mutante a un sujeto el día 1, en la visita de la semana 2, la visita de la semana 4 y después mensualmente hasta la visita del mes 3 a una dosificación de 10 mg/kg de peso del sujeto, y (ii) el régimen de fase de mantenimiento comienza después de que termine el régimen de fase temprana e implica una administración con una frecuencia no superior a una vez al mes de una dosis eficaz de la molécula de CTLA4 mutante a un sujeto para proporcionar una concentración valle en suero de la molécula de CTLA4 mutante de entre aproximadamente 0,2 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml durante el régimen de fase de mantenimiento.
2. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el régimen de fase temprana comprende la administración de la molécula de CTLA4 mutante el día 1, en la visita de la semana 2, la visita de la semana 4, la visita de la semana 8 y la visita de la semana 12.
3. La molécula para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en donde el régimen de fase temprana comprende además la administración de la molécula de CTLA4 mutante el día 5.
4. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el régimen de fase temprana comprende la administración de la molécula de CTLA4 mutante el día 1, el día 5, en la visita de la semana 2, después cada dos semanas durante los primeros 3 meses, seguido de administración mensual hasta la visita del mes 6.
5. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el régimen de fase temprana comprende la administración de la molécula de CTLA4 mutante el día 1, el día 5, en la visita de la semana 2, la visita de la semana 4, la visita de la semana 6, la visita de la semana 10, la visita del mes 4, la visita del mes 5 y la visita del mes 6.
6. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la dosis eficaz de la molécula de CTLA4 mutante durante el régimen de fase de mantenimiento es de 5 mg/kg de peso del sujeto.
7. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el tratamiento comprende la administración de la molécula de CTLA4 mutante a una dosificación de 10 mg/kg de peso del sujeto los días 1, 15, 29, 57, 85 y a continuación mensualmente una dosificación de 5 mg/kg de peso del sujeto .
8. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el tratamiento comprende la administración de la molécula de CTLA4 mutante a una dosificación de 10 mg/kg de peso del sujeto los días 1, 5, 15, 29, 57, 85, y a continuación mensualmente una dosificación de 5 mg/kg de peso del sujeto .
9. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el tratamiento comprende la administración de la molécula de CTLA4 mutante a una dosis de 10 mg/kg de peso del sujeto los días 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141, 169, y a continuación mensualmente una dosificación de 5 mg/kg de peso del sujeto .
10. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el trastorno inmunitario asociado a trasplante de injerto comprende rechazo de trasplante de órgano sólido, tejido y/o células.
11. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 en donde el trastorno inmunitario asociado a trasplante de injerto comprende rechazo de trasplante de riñón.
12. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el sujeto es un receptor de criterios ampliados y/o que recibió el injerto de un donante de criterios ampliados.
13. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde los criterios ampliados incluyen uno o más de los siguientes: injerto de donante de edad menor de 10 y mayor de o igual a 60 años; injerto de donante después de muerte cardíaca; injerto con tiempo isquémico frío anticipado de órgano donante mayor de o igual a 24 horas; sujetos que se someten a trasplante por primera vez con un ARP actual $\geq 50\%$, o que se someten a retrasplante con un ARP $\geq 30\%$; sujetos con pérdida de injerto previa debida a rechazo agudo durante los primeros 6 meses después del trasplante; sujetos con compatibilidad cruzada linfocitotóxica de células T positiva usando linfocitos donantes y suero del receptor; sujetos con infección por VIH; sujetos con tuberculosis activa que han requerido tratamiento en los 3 años anteriores; u otros criterios presentados por la United Network of Organ Sharing (UNOS).

14. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde los criterios ampliados para un riñón de donante incluye al menos 1 de los siguientes criterios ampliados para donación de órganos a) edad del donante ≥ 60 años; o b) edad del donante de 50-59 años y 1 de los siguientes: (i) accidente cerebrovascular (ACV) + hipertensión + SCr $> 1,5$ mg/dl o (ii) ACV + hipertensión o (iii) ACV + SCr $> 1,5$ mg/dl o (iv) hipertensión + SCr $> 1,5$ mg/dl; o c) TIC ≥ 24 horas y edad del donante > 10 años; o d) donante con muerte cardíaca (donante sin pulso cardíaco).
15. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la molécula de CTLA4 mutante comprende:
- (a) una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición 27 y termina con ácido aspártico en la posición 150 de SEQ ID NO: 4, o
- (b) una secuencia de aminoácidos que comienza con alanina en la posición 26 y termina con ácido aspártico en la posición 150 de SEQ ID NO: 4.
16. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la molécula de CTLA4 mutante comprende además una secuencia de aminoácidos que altera la solubilidad, la afinidad y/o la valencia de la molécula de CTL4A mutante soluble.
17. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la secuencia de aminoácidos que altera la solubilidad, la afinidad y/o la valencia comprende un resto de inmunoglobulina.
18. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el resto de inmunoglobulina es una región constante de inmunoglobulina o parte de la misma.
19. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la región constante de inmunoglobulina o parte de la misma se muta para reducir la función efectora.
20. La molécula para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 18 o 19 en donde la región constante de inmunoglobulina o parte de la misma comprende unas regiones bisagra, CH2 y CH3 de una molécula de inmunoglobulina humana o de mono.
21. La molécula para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con ácido glutámico en la posición +152 y termina con lisina en la posición +383, como se muestra en SEQ ID NO: 4.
22. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende además un resto de aminoácido de unión y una inmunoglobulina, donde el resto de aminoácido de unión está localizado entre la secuencia de aminoácidos que termina con ácido aspártico en la posición +150 y la inmunoglobulina.
23. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la molécula de CTLA4 mutante comprende:
- a) una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 y termina con lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356 de la Figura 7, o
- (b) una secuencia de aminoácidos que comienza con alanina en la posición -1 y termina con lisina en la posición +357 o glicina en la posición +356 de la Figura 7.
24. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde dicha molécula de CTLA4 mutante se va a co-administrar con al menos uno de los agentes seleccionados del grupo que consiste en basiliximab, daclizumab, globulina antitimocitos, inhibidores de calcineurina, ciclosporina, tacrolimus, mofetil micofenolato, rapamicina de ácido micofenólico, azatioprina, muromonab, rituximab, sirolimus, everolimus, FTY720, FK778, Jak-3, centicano, corticosteroides, betametasona, budesonida, cortisol, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.
25. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la molécula de CTLA4 mutante se va a co-administrar de forma simultánea o secuencial con agentes que comprenden basiliximab y MMF.
26. La molécula para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la molécula de CTLA4 mutante se va a co-administrar de forma simultánea o secuencial con agentes que comprenden daclizumab y sirolimus.

FIG. 1

Unión en equilibrio a CD86Ig

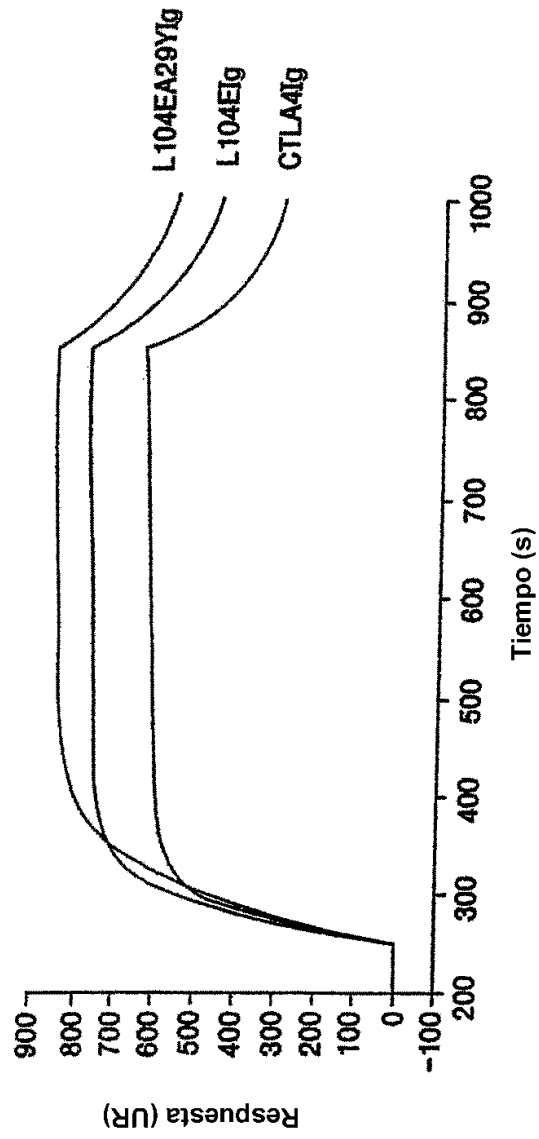


FIG. 2A

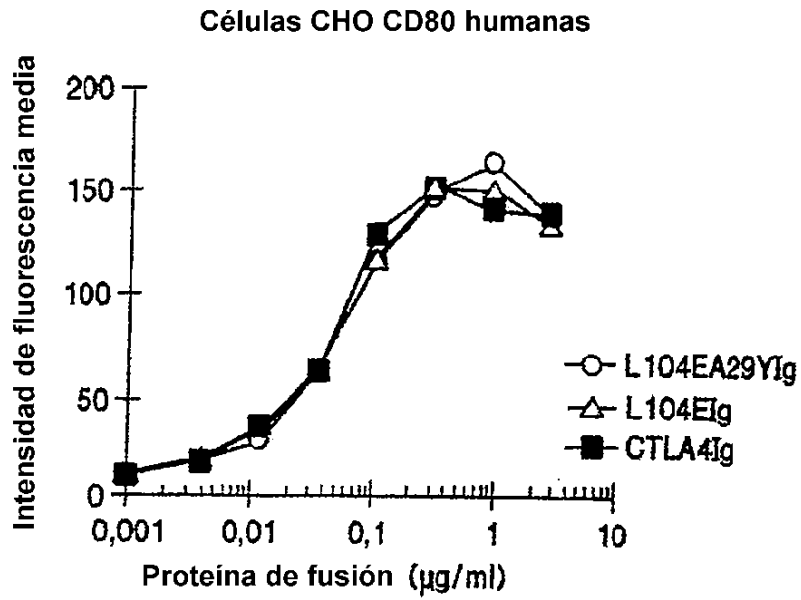


FIG. 2B

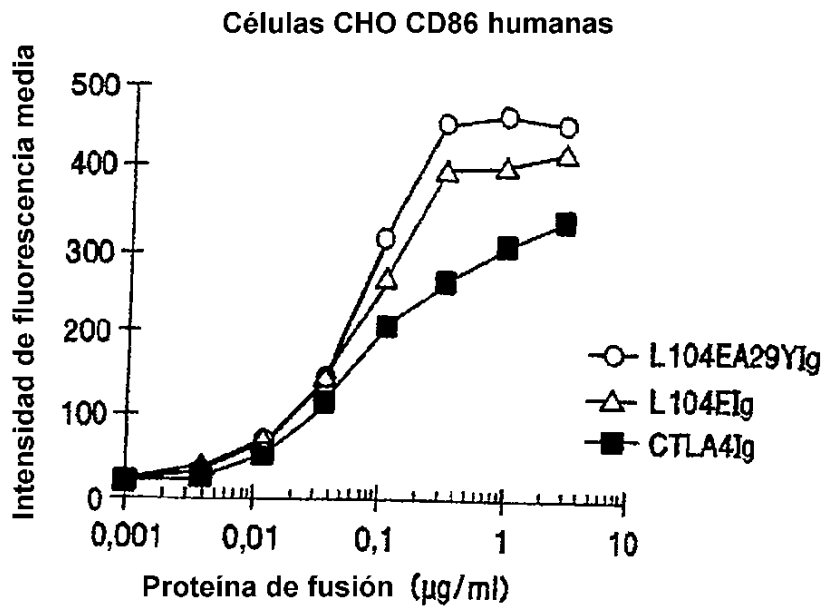


FIG. 3A

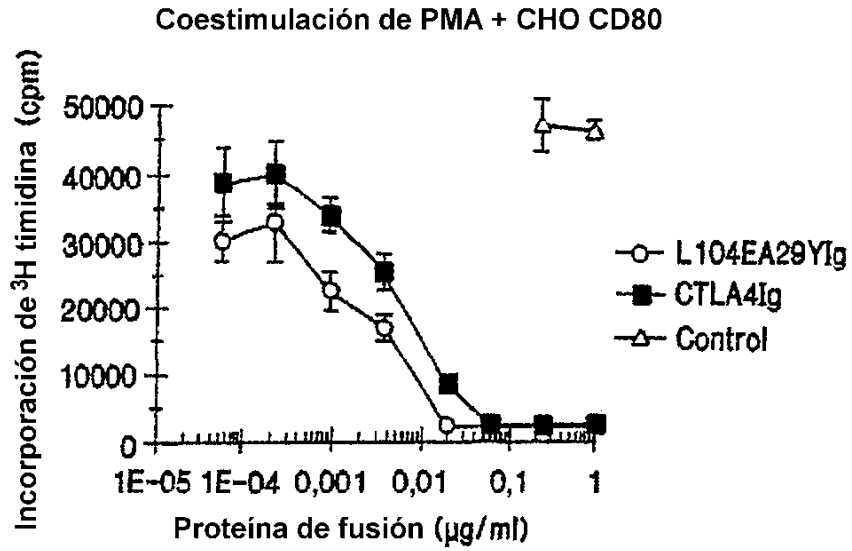


FIG. 3B

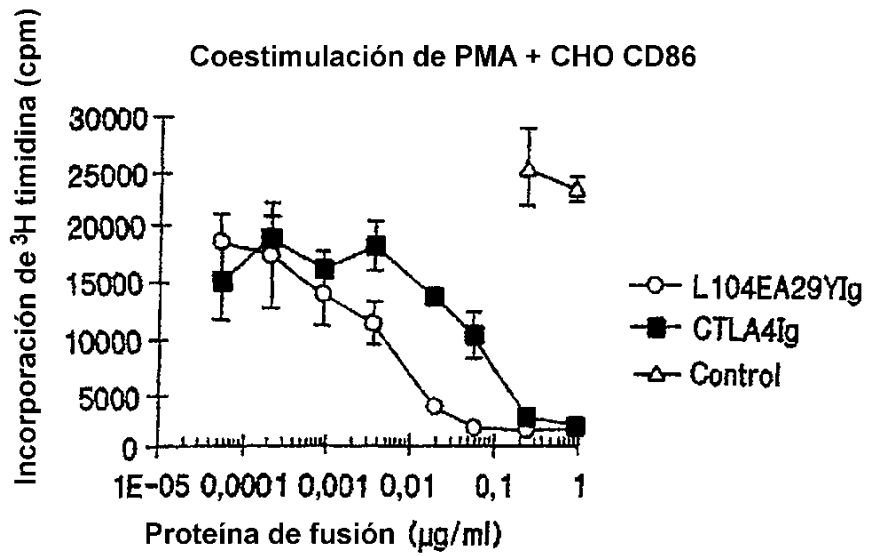


FIG. 4A

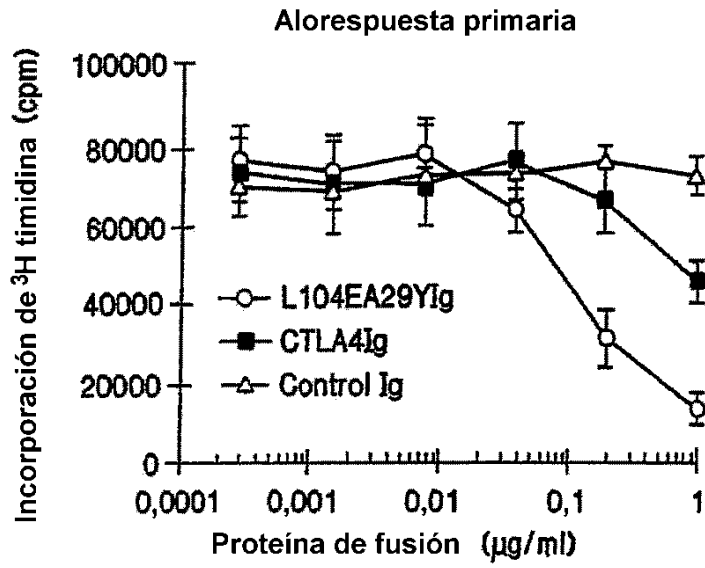


FIG. 4B

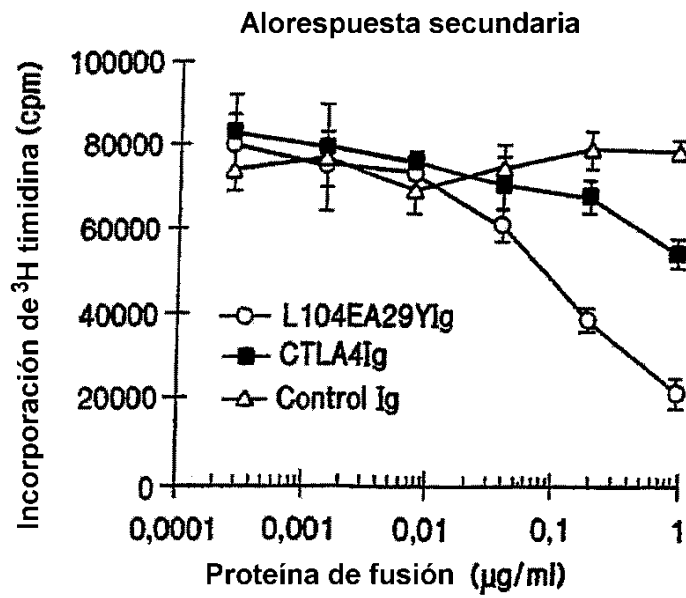


FIG. 5A

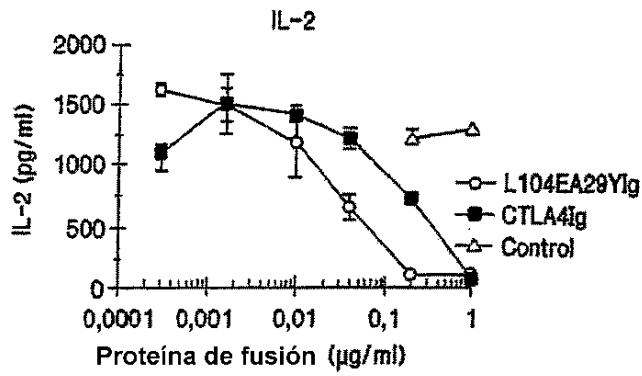


FIG. 5B

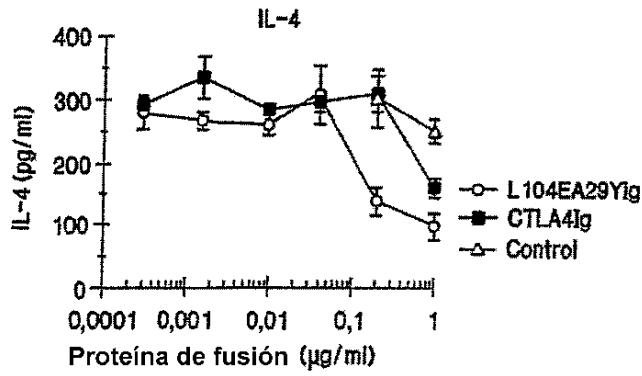


FIG. 5C

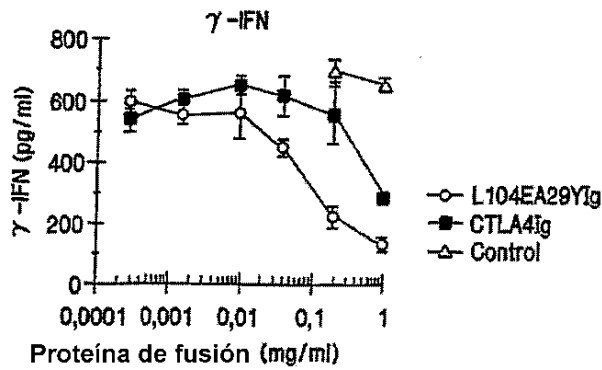


FIG. 6

Inhibición de proliferación de células T de mono inducida por PHA

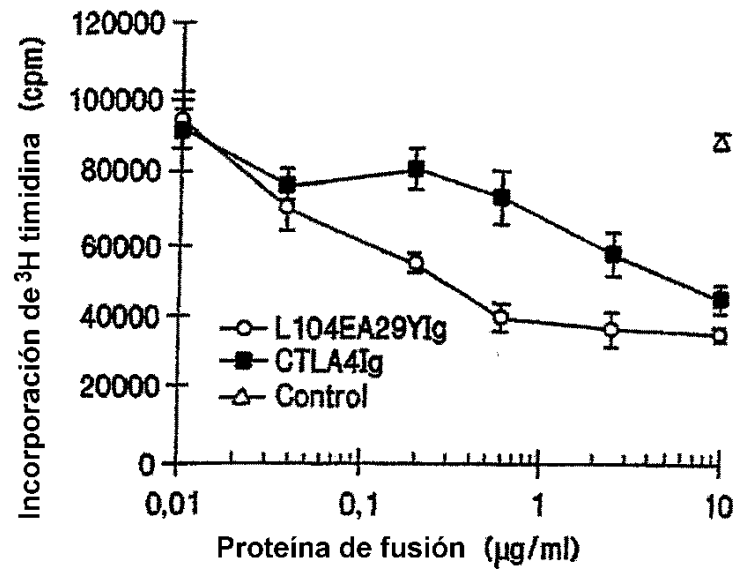


FIG. 7

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCCAGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--E--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTGGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCAAGGGCACTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--F--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCAGGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCGCAGCAGCTGAACTCCTGGGGGATCGTCACTCTTCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCAAGCAACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCCCTGCTGCTG	+522
F--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+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
GTCTCTACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGCTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCAAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCGTGGTCAAAGGCTTCTATCCACGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAJGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--P--S--	+334
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACCAACCACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGTAAATGA	
P--G--K--*	

FIG. 8

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACCGCTGCTCAGTCTGGTCCCTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCACCCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGSACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAAACCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCCTGCCAGATTCCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCACTCTTCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACRTGCGTGGTGGTG	+522
F--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTFCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCACCCTGCTGCCACCGGACTGGCTGARTGGCAAGGAGTACAGTGCAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--F--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACTGCCTGCTCAAAGGCTTCTATCCACGGACATGCGCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTCTGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--F--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACCTCTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACAGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGTAAATGA	
P--G--K--*	

FIG. 9

ATGGGTGTAAGTCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCCTCCTCTCTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCAAGTGGCCCGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGTCAATGATCCACCCGATCTACTACCTGGGCATAGGCAACGGAAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCCTGCCCAGATTCCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCCTGGGTGGATCGTCACTCTCCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCCAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGGTGGACTCCGAAGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCT	+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. 10A

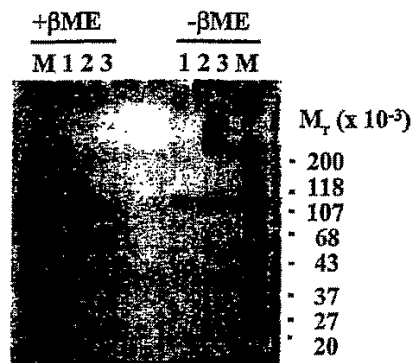


FIG. 10B

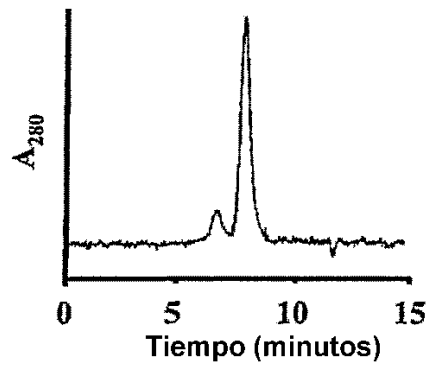


FIG. 10C

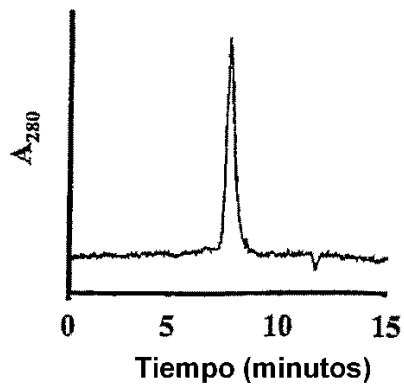


FIG. 11

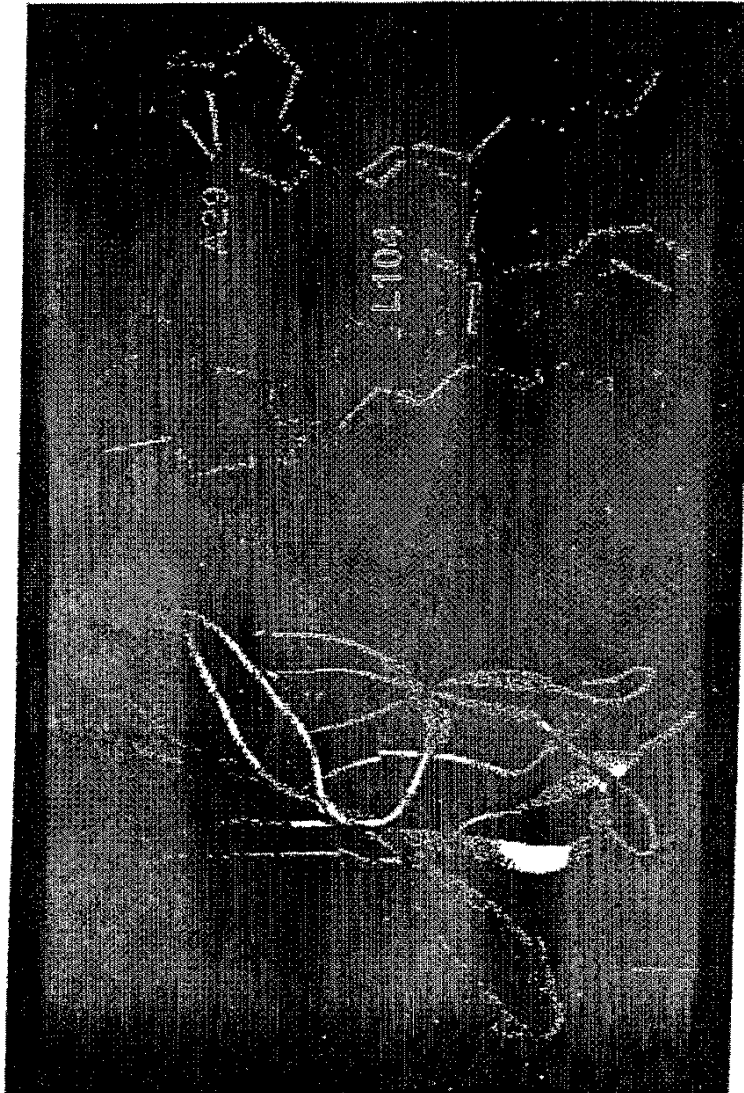


FIG. 12

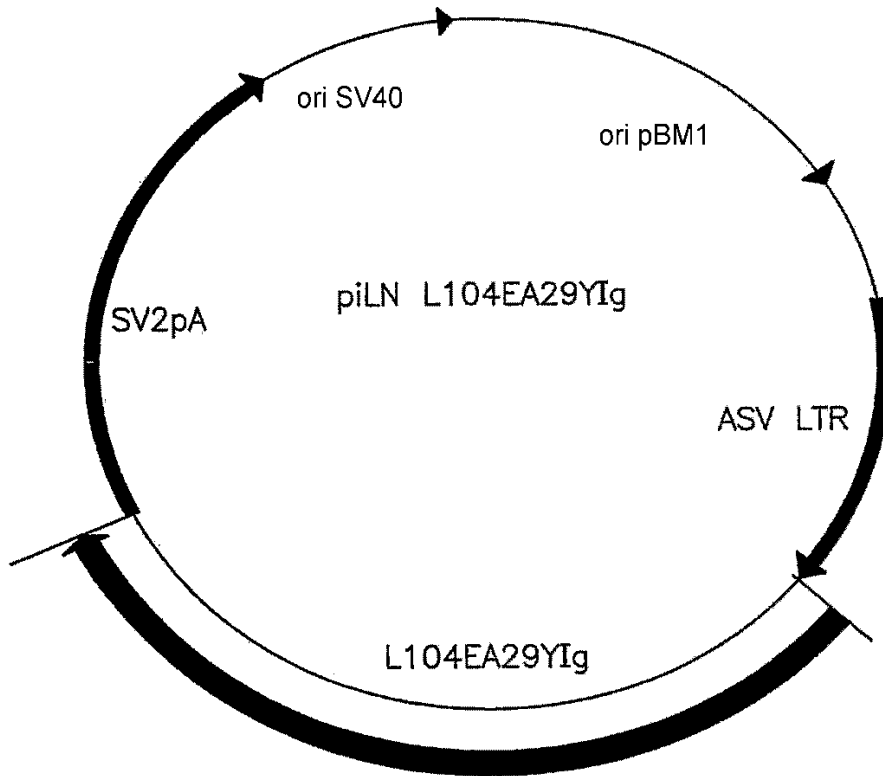


FIG. 13

PÉPTIDO SEÑAL DE ONCOSTATINA M

```

M G V L L T Q R T L L S L V L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT   45
                                     ← -1 +1
A L L F P S M A S M A M H V A
GCA CTG CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC   90

Q P A V V L A S S R G I A S F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT   135

V C E Y A S P G K A T E V R V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG   180

T V L R Q A D S Q V T E V C A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG   225

A T Y M N G N E L T F L D D S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC   270

I C T G T S S G N Q V N L T I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC   315

Q G L R A M D T G L Y I C K V
CAA GCA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG   360

E L M Y P P P Y Y L G I G N G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA   405
                                     |
                                     |
                                     |
← |
T Q I Y V I D P E P C P D S D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC   450

F L L W I L A A V S S G L F F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGS TTG TTT TTT   495

Y S F L L T A V S L S K H L K
TAT ACC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG   540

K R S P L T T G V Y V K M P P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA   585

T E P E C E K Q F Q P Y F I P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC   630

I N
ATC AAT                                                                 636
    
```

SITIO DE GLUCOSILACIÓN