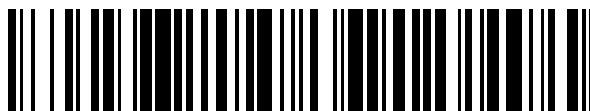


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 721**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2008** **E 13150320 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2612868**

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

30 Prioridad:

01.11.2007 US 984631 P
07.05.2008 US 51215 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2018

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 688 721 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos y ácidos nucleicos inmunosupresores

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a nuevos polipéptidos que se unen a CD80 y/o CD86, ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, y métodos para preparar y usar tales polipéptidos y ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los linfocitos T desempeñan un papel principal en el inicio y la regulación de las respuestas inmunológicas. A que se produzca la activación completa de los linfocitos T, se requieren al menos dos sucesos de señalización distintos. Una primera señal se produce por la interacción de receptores de linfocitos T (TCR) expresados en linfocitos T con antígenos específicos (Ag) presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresadas en células de presentación de antígeno (APC). Una segunda señal (coestimulación) resulta de la interacción entre ligandos coestimuladores expresados en las APC y sus correspondientes receptores expresados en linfocitos T. Una ruta de coestimulación dominante implica la interacción entre los ligandos CD80 (B7-1 o B7.1) y CD86 (B7-2 o B7.2) expresados en las APC con CD28 y CTLA-4 (también conocido como CD152) expresado principalmente en linfocitos T. El CTLA-4 (el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos) y CD28 sirven como receptores para los ligandos CD80 y CD86.

La señalización positiva está mediada a través del receptor CD28. La unión del ligando o ligandos CD80 y/o CD86 a CD28 disminuye el umbral de activación de linfocitos T estimulando la formación de sinapsis inmunológicas (Viola A. *et al.*, *Science* 283: 680-682 (1999)). Además, la coestimulación de CD28 activa o mejora la producción de factores fundamentales para la proliferación y supervivencia de linfocitos T, tales como interleuquina-2 (IL-2), NF- κ B, y Bcl-XL (Norton S. D. *et al.*, *J. Immunol.* 149: 1556-1561 (1992); Vella A. T. *et al.*, *J. Immunol.* 158: 4714-4720 (1997)). *In vivo*, los ratones con déficit de CD28 están severamente inmunocomprometidos y muestran escasas respuestas a linfocitos T específicos de antígeno (Green, J. M. *et al.*, *Immunity* 1: 501-508 (1994)). Cuando los linfocitos T se activan en ausencia de la señal coestimuladora puede resultar anergia o tolerancia de los linfocitos T.

La señalización negativa está mediada a través del receptor CTLA-4. Cada uno de los ligandos CD80 y CD86 se une con alta avidéz a CTLA-4 y contraequilibra las respuestas inmunoproliferativas obtenidas a partir de la señalización de CD28. Los mecanismos potenciales de señalización de CTLA-4 incluyen unión competitiva de moléculas coestimuladoras CD80/CD86 (Masteller, E. M. *et al.*, *J. Immunol.* 164: 5319 (2000)), inhibición de la señalización de TCR por inducción de fosfatasa para la inmunosinapsis (Lee K. M. *et al.*, *Science* 282: 2263 (1998)), y alteración de la sinapsis inmunológica (Pentcheva-Hoang T. *et al.*, *Immunity* 21:401 (2004); Chikuma S. *et al.*, *J. Exp. Med* 197:129 (2003); Schneider H. *et al.*, *Science* 313: 1972 (2006)). *In vivo*, los ratones con déficit de CTLA-4 muestran serotipos autoinmunes profundos caracterizados por infiltración tisular masiva y destrucción de órganos (Waterhouse P. *et al.*, *Science* 270: 985 (1995)).

Los agentes terapéuticos diseñados para antagonizar la ruta de coestimulación de CD80/CD86, tales como CTLA-4-Ig humano soluble, se mantienen prometedores para el tratamiento de enfermedades y trastornos autoinmunes. La presente invención proporciona moléculas ventajosas que tienen una mejora de las capacidades para modular o suprimir la señalización a través de la ruta de coestimulación de CD80/CD86 y métodos de uso de tales moléculas para manipulación seleccionada y diferencias de respuestas de linfocitos T. Tales moléculas tienen un uso beneficioso en diversas aplicaciones como se discute con detalle a continuación.

50 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un dímero de proteína de fusión aislado o recombinante que comprende dos proteínas de fusión monoméricas unidas mediante al menos un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína presentes en cada proteína de fusión mutante monomérica, en el que cada proteína de fusión monomérica comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la SEQ ID NO: 50 en no más de 6 restos de aminoácido y que incluye restos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los restos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la SEQ ID NO: 50 y (b) un polipéptido de Fc de Ig, y en el que el dímero de proteína de fusión se une a CD80 humano o CD86 humano o a un dominio extracelular de cualquiera y tiene una mayor capacidad para suprimir una respuesta inmunológica que un dímero de proteína de fusión LEA29Y-Ig, en el que el dímero de proteína de fusión LEA29Y-Ig comprende dos proteínas de fusión de LEA29Y-Ig monoméricas cada una comprendiendo la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 166.

La invención también proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 50.

La invención también proporciona un dímero de polipéptido aislado o recombinante que comprende dos polipéptidos

de la invención.

La invención también proporciona una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 50 y un segundo polipéptido, en la que el
5 segundo polipéptido es un polipéptido de Fc de Ig.

La invención también proporciona un dímero de proteína de fusión aislado o recombinante que comprende dos proteínas de fusión monoméricas unidas mediante al menos un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína presentes en cada proteína de fusión mutante monomérica, en el que cada proteína de fusión monomérica
10 comprende (a) un polipéptido que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 50 y (b) un polipéptido de Fc de Ig.

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la invención, un dímero de polipéptido de la invención, una proteína de fusión de la invención, o un dímero de proteína de fusión de la invención o una proteína de fusión monomérica del
15 dímero de proteína de fusión de la invención, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo.

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

20 La invención también proporciona una célula hospedadora aislada o recombinante que comprende un ácido nucleico de la invención y/o un vector de la invención.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable o vehículo farmacéuticamente aceptable y un dímero de proteína de fusión de la invención.

25 La invención también proporciona un dímero de proteína de fusión de la invención para uso en:

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

La invención también proporciona el uso de un dímero de proteína de fusión de la invención para la preparación de un medicamento para:

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

La invención también proporciona un método para producir un polipéptido de la invención, un dímero de polipéptido de la invención, una proteína de fusión de la invención, o un dímero de proteína de fusión de la invención o una proteína de fusión monomérica del dímero de proteína de fusión de la invención que comprende cultivar una célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo y recuperar el polipéptido o proteína expresados por la célula.

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 es un diagrama esquemático del mutante CTLA-4-Ig de pCDNA de vector de expresión de plásmido, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante. En la Figura 1, cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG2 (hIgG2) humano.

50 Las Figuras 2A-2D son diagramas esquemáticos de proteínas de fusión hCD80-Ig, hCD86-Ig, LEA29Y-Ig, y hCTLA-4-IgG2 a modo de ejemplo, respectivamente. El péptido señal, dominio extracelular (ECD), conector (si lo hubiera), y dominio Fc de de Ig de cada proteína de fusión se muestran de forma esquemática. También se muestran los restos de aminoácido presentes en las uniones entre el péptido señal, ECD, conector (si lo hubiera), y Fc de Ig. El péptido señal de cada proteína de fusión por lo general se escinde durante el procesamiento y por lo tanto la proteína de fusión secretada (madura) no contiene la secuencia del péptido señal. La Figura 2D presenta un diagrama esquemático de una proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 (“hCTLA-4-IgG2”) humana que comprende un dominio extracelular de CTLA-4 humano (“el ECD de hCTLA-4”) fusionado de forma covalente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de IgG2 humana. La secuencia de polipéptidos predicha de esta proteína de fusión hCTLA-4-IgG2 se muestra en la SEQ ID NO: 161 y comprende los siguientes segmentos: péptido señal de hCTLA-4 (restos de aminoácido 1-37), polipéptido de ECD de hCTLA-4 (restos de aminoácido 38-161), y polipéptido de Fc de IgG2 humano (restos de aminoácido 162-389). Entre el extremo C-terminal del polipéptido de ECD de hCTLA-4 y el extremo N-terminal del Fc de IgG2 humano no se incluye ningún conector (por ejemplo, ningún resto o restos de aminoácido). El polipéptido de Fc de IgG2 humano comprende una bisagra, dominio CH2, y dominio CH3 de IgG2 humana. En la Figura 2D, se muestran los restos de aminoácido en las uniones entre estos diversos segmentos. De forma específica, se muestran los últimos cuatro restos de aminoácido del péptido señal, los primeros cinco y los últimos cinco restos de
65

aminoácido del polipéptido de ECD de hCTLA-4, y los primeros cinco y los últimos cinco restos de aminoácido del polipéptido de Fc de IgG2 humano.

El péptido señal por lo general se escinde durante el procesamiento y por lo tanto la proteína de fusión secretada (proteína de fusión madura) de hCTLA-4-IgG2 generalmente no contiene la secuencia del péptido señal. La secuencia de polipéptidos de la forma madura o secretada de esta proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2 se muestra en la SEQ ID NO: 162. La secuencia del polipéptido de ECD de hCTLA-4 comprende los restos de aminoácido 1-124 de SEQ ID NO: 162, y la secuencia del polipéptido de Fc de IgG2 humano comprende los restos de aminoácido 125-352 de la SEQ ID NO: 162. En otro aspecto, esta proteína de fusión de hCTLA-4 Ig madura no incluye el resto de lisina C-terminal (K) y por lo tanto comprende los restos de aminoácido 1-351 de la SEQ ID NO: 162.

La proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2 madura, que tiene un total de 352 aminoácidos, comprende los restos de aminoácido 38-389 de la secuencia de polipéptidos de la proteína WT hCTLA-4 de longitud completa que se muestra en la SEQ ID NO: 160, y comienza con la secuencia de aminoácidos: metionina-histidina-valina-alanina. Si se desea, los aminoácidos de la forma madura se pueden numerar comenzando con la Met de la secuencia Met-His-Val-Ala, designando Met como el primer resto (por ejemplo, el ECD comprende los restos de aminoácido numerados de 1-124), al igual que en la SEQ ID NO: 162. Un dímero de hCTLA-4-IgG2 maduro es la forma de la proteína de fusión generalmente usada en los ensayos de los Ejemplos que se describen a continuación, a menos que se indique de otro modo. Una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión hCTLA-4-IgG2, que comprende el ECD de hCTLA-4 fusionado al polipéptido de Fc de hIgG2, se muestra en la SEQ ID NO: 163.

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

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

La Figura 5 muestra un análisis de Biacore™ habitual de la unión de las siguientes proteínas de fusión para hCD86-Ig: proteína de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig, y D3-IgG2. La fase de disociación del análisis comienza en el momento marcado por la flecha. La proteína de fusión Orenicia®, que está formada por el polipéptido de ECD de CTLA-4 humano de tipo silvestre fusionado a un polipéptido de dominio Fc de IgG1 mutante, sirve de forma eficaz como un control de CTLA-4-Ig humano de tipo silvestre. Una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, tal como D3-IgG2, que tiene una avidéz de unión a CD86-Ig más elevada que la proteína de fusión Orenicia® tiene una tasa de disociación de CD86-Ig más lenta que la proteína Orenicia®.

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

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

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

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

La Figura 10 es un diagrama esquemático que muestra la estructura de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo. De forma esquemática se muestran dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig idénticas monoméricas mutantes, cada una comprendiendo un ECD de CTLA-4 mutante maduro fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG2 humano. Cada polipéptido de IgG2 humana incluye una bisagra de IgG2, dominio CH2, y dominio CH3. También se muestran los restos de aminoácido a modo de ejemplo presentes en las uniones entre el ECD y los polipéptidos de Fc de Ig. Los restos de aminoácido en las uniones entre estos componentes pueden diferir dependiendo de la secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante y/o secuencia de polipéptidos de Ig. La proteína de fusión dimérica resulta de la formación de al menos un enlace disulfuro entre restos de cisteína en posiciones análogas en los dos monómeros. Los restos de cisteína (C) implicados potencialmente en la formación de enlaces disulfuro entre los dos monómeros se marcan con asteriscos. El péptido señal de cada proteína de fusión monomérica por lo general se escinde durante el procesamiento y por lo tanto la proteína de fusión secretada (madura) generalmente no incluye la secuencia del péptido señal.

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

Las Figuras 12A-12F presentan un alineamiento de la secuencia de polipéptidos del dominio extracelular de

CTLA-4 de tipo silvestre humano (designado en la figura como "hCTLA4ECD"), la secuencia de polipéptidos del polipéptido LEA29Y (designado en la figura, "LEA29YECD"), y las secuencias de polipéptidos de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutantes a modo de ejemplo. Los nombres del clon de estos polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutantes se indican en la parte izquierda. Los restos de aminoácido que son idénticos a los que se encuentran en el ECD de CTLA-4 humano de tipo silvestre se indican con un periodo (.).

La Figura 13 presenta una matriz BLOSUM62.

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

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

Descripción detallada

DEFINICIONES

También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la invención.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de restos de ácido nucleico (por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite de forma específica, los términos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabólica de una manera similar a la de los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos particular también incluye de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias de nucleótidos complementarias así como la secuencia que se ha indicado explícitamente. De forma específica, las sustituciones de codón degenerado se pueden conseguir generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones (o todos) seleccionados está sustituida con restos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260: 2605 2608 (1985); y Cassol *et al.*, (1992); Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8: 91 98 (1994)). El término ácido nucleico o polinucleótido se usa indistintamente con ADNc o ARNm codificado por un gen.

El término "gen" en su sentido amplio se refiere a cualquier segmento de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) asociado con una función biológica. Un gen puede incluir una secuencia codificante y/o secuencia reguladora requerida para su expresión. Un gen también por incluir segmento(s) de ácido nucleico de ADN no expresado que, por ejemplo, forma secuencias de reconocimiento para otra u otras proteínas (por ejemplo, promotor, potenciador, u otra región reguladora). Un gen se puede obtener a partir de la diversidad de fuentes, incluyendo clonación a partir de una fuente de interés sintetizando logó a partir de información de secuencia conocida o predicha, y puede incluir una o más secuencias designadas por tener parámetros deseados.

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan indistintamente para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más restos de aminoácido es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácido de origen natural y polímeros de aminoácido de origen no natural. Como se usa en el presente documento, los términos incluyen cadenas de aminoácido de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), en las que los restos de aminoácido se unen mediante enlaces peptídicos covalentes.

La numeración de un polímero de aminoácido o polímero de ácido nucleico dados "corresponde a" o es "relativa a" la numeración de un polímero de de aminoácido o polímero de ácido nucleico seleccionados cuando la posición de cualquier componente polimérico dado (por ejemplo, aminoácido, nucleótido, también denominados genéricamente como un "resto") se designa por referencia a la misma posición o a una posición equivalente en el aminoácido copolímero de ácido nucleico dados, en lugar de por la posición homérica real del componente en el polímero dado. Por lo tanto, por ejemplo, la numeración de una posición de aminoácido dada en una secuencia de polipéptidos dada corresponde a la misma posición del aminoácido o a una equivalente en una secuencia de polipéptidos seleccionada usada como una secuencia de referencia.

Una "posición equivalente" (por ejemplo, una "posición de aminoácido equivalente" o "posición de ácido nucleico equivalente" o "posición de resto equivalente") en el presente documento se define como una posición (tal como una posición de aminoácido o posición de ácido nucleico o posición de resto) de una secuencia de polipéptidos de ensayo (o polinucleótido de ensayo) que se alinea con una posición correspondiente de una secuencia de polipéptidos de referencia (o polinucleótido de referencia), cuando se alinea (preferentemente alinea de forma óptima) usando un algoritmo de alineamiento como se describe en el presente documento. No es necesario que la

posición del aminoácido equivalente de la secuencia de polipéptidos de ensayo tenga el mismo número de posición numérica que el de la posición correspondiente del polipéptido de ensayo.

5 De forma análoga, no es necesario que la posición del ácido nucleico equivalente de la secuencia de polinucleótidos de ensayo tenga el mismo número de posición numérica el de la posición correspondiente del polinucleótido de ensayo.

10 Un polinucleótido "mutante" comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia en uno o más restos de aminoácido de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido precursor o de referencia (tal como, por ejemplo, una secuencia de polipéptidos de tipo silvestre (WT)). En un aspecto, un polipéptido mutante comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido precursor o de referencia en aproximadamente un 1 %, un 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, un 50 % o más del número de restos totales de la secuencia de polipéptidos precursora o de referencia.

15 En otro aspecto, un polipéptido mutante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % con respecto a la secuencia de polipéptidos de un polipéptido precursor o de referencia. En otro aspecto, un polipéptido mutante comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido precursor o de referencia en 1 a 100 o más restos de aminoácido (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más restos de aminoácido).

20 Un polipéptido mutante puede comprender una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos de un polipéptido precursor o de referencia en, por ejemplo, la delección, adición, o sustitución de uno o más restos de aminoácido (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más restos de aminoácido) del polipéptido precursor o de referencia, o cualquier combinación de tal delección o delecciones, adición o adiciones, y/o sustitución o sustituciones. El propio polipéptido de referencia o precursor puede ser un polipéptido mutante.

25

De "origen natural" tal como se aplica a un objeto se refiere a que el objeto se encuentra en la naturaleza a diferencia de ser producido de forma artificial por el hombre. De "origen no natural" tal como se aplica a un objeto se refiere a que el objeto no es de origen natural (es decir, que el objeto no se puede encontrar en la naturaleza). Por ejemplo, un polipéptido de origen no natural se refiere a un polipéptido que ha sido preparado por el hombre, tal como, por ejemplo, mediante su síntesis *in vitro* o preparado de forma artificial.

30

Una "subsecuencia" o "fragmento" de una secuencia de interés es cualquier parte de toda la secuencia, hasta que, pero no incluyendo, toda la secuencia de interés.

35

Un ácido nucleico, proteína u otro componente se "aisla" cuando se separa parcial o completamente de componentes con los que normalmente está asociado (otras proteínas, ácidos nucleicos, células, reactivos sintéticos, etc.). En una base molar, una especie aislada es más abundante que otra especie en una composición. Por ejemplo, una especie aislada puede comprender al menos aproximadamente un 50 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Preferentemente, la especie de interés se purifica hasta una homogeneidad esencial (es decir, no se pueden detectar especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales). La pureza y la homogeneidad se pueden determinar usando un número de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como electroforesis en gel de agarosa o poli(acrilamida) de una muestra de proteína o ácido nucleico, seguido de visualización después de tinción. Si se desea, una técnica de alta resolución, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o un medio similar se puede usar para purificación del material.

40

45

El término "purificado" tal como se aplica a ácidos nucleicos o polipéptidos generalmente representa un ácido nucleico o polipéptido que está esencialmente libre de otros componentes tal como se determina mediante técnicas analíticas bien conocidas (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido purificado forma una banda discreta en un gel electroforético, eluato cromatográfico, y/o un medio sujeto a centrifugación por gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético está "purificado". Un ácido nucleico o polipéptido purificado tiene una pureza de al menos aproximadamente un 50 %, normalmente al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o una pureza superior (por ejemplo, porcentaje en peso en una base molar).

50

55

Un ácido nucleico o polipéptido es "recombinante" cuando es artificial o modificado por ingeniería, o se obtiene a partir de una proteína o ácido nucleico artificial o modificado por ingeniería.

60 El término "recombinante" cuando se usa en referencia a una célula por lo general indica que la célula replica un ácido nucleico heterólogo o expresa un polipéptido codificado por un ácido nucleico heterólogo. Las células recombinantes pueden comprender genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también incluyen las que comprenden genes que se encuentran en la forma nativa de la célula, pero se modifican y se vuelven a introducir en la célula por medios artificiales. El término también incluye células que comprenden un ácido nucleico endógeno con respecto a la célula que se ha modificado sin retirar el ácido nucleico de la célula; las modificaciones de ese tipo incluyen las obtenidas por reemplazo genético,

65

mutación específica del sitio, y técnicas relacionadas conocidas por las personas con una experiencia habitual en la materia. La tecnología del ADN recombinante incluye técnicas para la producción de ADN recombinante *in vitro* y transferencia del ADN recombinante en células en las que se puede expresar o propagar, produciendo de ese modo un polipéptido recombinante.

5 Un “casete de expresión recombinante” o simplemente un “casete de expresión” es una construcción de ácido nucleico, generada por vía recombinante o sintética, con elementos de ácido nucleico que son capaces de realizar expresión de un gen estructural en hospedadores compatibles con tales secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos promotores y opcionalmente señales de terminación de transcripción. Por lo general, el casete de expresión recombinante incluye un ácido nucleico a transcribir (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado) y un promotor. Como se describe en el presente documento también se pueden usar factores adicionales necesarios o útiles para realizar expresión. Por ejemplo, un casete de expresión también puede incluir secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia señal que dirige secreción de una proteína expresada desde la célula hospedadora. En un casete de expresión también se pueden incluir señales de terminación de transcripción, potenciadores, y otras secuencias de ácidos nucleicos que influyen en la expresión genética.

20 Un “ácido nucleico” exógeno”, “segmento de ADN exógeno”, “secuencia heteróloga”, o “ácido nucleico heterólogo”, como se usa en el presente documento, es uno que se origina a partir de una fuente extraña con respecto a la célula hospedadora particular, o, si es de la misma fuente, se modifica a partir de su forma original. Por lo tanto, un gen heterólogo en una célula hospedadora incluye un gen que es endógeno para la célula hospedadora particular, pero que se ha modificado. La modificación de una secuencia heteróloga en las aplicaciones que se describen en el presente documento por lo general se produce a través del uso de métodos de evolución molecular dirigida. Por lo tanto, el término se refiere a un segmento de ADN que es extraño o heterólogo para la célula, u homólogo para la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en el que el elemento no se encuentra habitualmente. Los ácidos nucleicos exógenos o ADN exógeno se expresan para producir polipéptidos exógenos.

30 Un “vector” puede ser cualquier agente que sea capaz de suministrar o mantener un ácido nucleico en una célula hospedadora e incluye, por ejemplo, pero no se limita a, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN), ácidos nucleicos desnudos, vectores virales, virus, ácidos nucleicos formando complejos con uno o más polipéptidos u otras moléculas, así como ácidos nucleicos inmovilizados sobre partículas en fase sólida. Los vectores se describen con detalle a continuación. Un vector puede ser útil como un agente para suministrar o mantener un gen exógeno y/o proteína en una célula hospedadora. Un vector puede ser capaz de transducir, transfectar, o transformar una célula, haciendo de ese modo que la célula replique o exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintos a los nativos para la célula o de una forma nativa para la célula. Un vector puede incluir materiales para ayudar a conseguir la entrada de un ácido nucleico en la célula, tal como una partícula viral, liposoma, revestimiento proteico, o similares. Se puede usar cualquier método de transferencia de un ácido nucleico en la célula; a menos que se indique de otro modo, el término vector no implica ningún método en particular de suministro de un ácido nucleico en una célula o implica que cualquier tipo de célula en particular es el sujeto de la transducción. La presente invención no se limita a ningún vector específico para el suministro o mantenimiento de cualquier ácido nucleico de la invención, incluyendo, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido CTLA-4 mutante de la invención o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que se une a CD80 y/o CD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, un ECD de CD80 o un ECD de CD86).

45 La expresión “vector de expresión” generalmente se refiere a una construcción de ácido nucleico consecuencia, generada por vía recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico específicos que permiten la transcripción de un ácido nucleico en particular en una célula hospedadora. El vector de expresión generalmente incluye un ácido nucleico a transcribir unido de forma operativa a un promotor. El término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación después de la transcripción, traducción, modificación después de la traducción, y/o secreción.

55 Un “péptido señal” es una secuencia peptídica (o de aminoácidos) que generalmente precede a un polipéptido de interés y se traduce en conjunto con el polipéptido y dirige o facilita el polipéptido al sistema secreto. Un péptido señal generalmente está unido con enlace covalente o fusionado al extremo amino terminal del polipéptido de interés y facilita la secreción del polipéptido de interés a partir de una célula hospedadora. El péptido señal por lo general se escinde del polipéptido de interés después de la traducción.

60 El término “codificante” se refiere a la capacidad de una secuencia de nucleótidos para codificar uno o más aminoácidos. El término no requiere un codón de inicio o parada. Una secuencia de aminoácidos se puede codificar en uno cualquiera de seis marcos de lectura diferentes proporcionados por una secuencia de polinucleótidos y su complemento.

65 La expresión “secuencia de control” se define en el presente documento para que incluya todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña para la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia propeptídica,

promotor, secuencia de péptido señal, y terminados de transcripción. Como mínimo, una secuencia de control incluye un promotor, y señales transcripción y parada de traducción. Las secuencias de control se pueden proporcionar con conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

5 La expresión "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteico. Los límites de la secuencia codificante generalmente se determinan mediante un marco abierto de lectura (ORF), que puede comenzar con el codón de parada ATG.

10 Un ácido nucleico está "unido de forma operativa" con otra secuencia de ácidos nucleicos cuando se coloca en a una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia codificante si dirige la transcripción de la secuencia codificante. Unido de forma operativa se refiere a que las secuencias de ADN que se están uniendo generalmente son contiguas y, cuando sea necesario unen dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, dado que los potenciadores generalmente funcionan cuando están separados del promotor en varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden tener longitudes variables, algunos elementos polinucleótidos se pueden unir de forma operativa pero no son contiguos.

20 Una "célula hospedadora" es cualquier célula que sea susceptible de transformación con un ácido nucleico.

Un "antígeno" se refiere a una sustancia que reacciona con el producto(s) de una respuesta inmunológica estimulada por un inmunógeno específico. Véase, por ejemplo, JULIUS CRUSE *ET AL.*, ATLAS OF IMMUNOLOGY 60 (1999); RICHARD COICO *ET AL.*, IMMUNOLOGY: A SHORT COURSE 27-30 (5^a ed. 2003). Una respuesta inmunológica puede comprender una respuesta humoral y/o una respuesta inmunológica mediada por células (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos (CTL)). Los productos de una respuesta inmunológica pueden incluir anticuerpos y/o los CTL. Los antígenos por lo general son macromoléculas (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos complejos, fosfolípidos, polisacáridos) que son extraños para el hospedador; esa parte del antígeno conocida como el determinante antigénico reacciona con (por ejemplo, se une a) el producto(s) de la respuesta inmunológica, tal como un anticuerpo o un receptor de linfocitos T específicos sobre un linfocito T. Un antígeno puede, pero no necesariamente, inducir una respuesta inmunológica así como reaccionar con el producto(s) de la respuesta inmunológica. "Antigenicidad" se refiere al estado o propiedad de ser antigénicos - es decir, tener las propiedades de un antígeno. La especificidad del antígeno se puede mostrar en la relación de un antígeno con respecto a su anticuerpo o viceversa; un antígeno generalmente reacciona de una forma altamente específica con su anticuerpo correspondiente y no con el mismo grado de especificidad con otros anticuerpos provocados por el inmunógeno. Una "cantidad antigénica" es una cantidad de un antígeno que reacciona de forma detectable con el producto(s) de una respuesta inmunológica estimulada por un inmunógeno específico.

Un "inmunógeno" es una sustancia que es capaz de inducir una respuesta inmunológica en lugar de tolerancia inmunológica. Véase, por ejemplo, JULIUS CRUSE *ET AL.*, mencionado anteriormente en 60-61; RICHARD COICO, mencionado anteriormente en 27-30. Los inmunógenos también reaccionan con (por ejemplo, se unen) el producto(s) de la respuesta inmunológica inducida que se ha o han inducido de forma específica contra los mismos. Por lo tanto, todos los inmunógenos son antígenos. "Inmunogenicidad" se refiere al estado o propiedad de ser inmunogénico - es decir, tener las propiedades de un inmunógeno. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad de un inmunógeno que es eficaz para inducir una respuesta inmunológica detectable. Un inmunógeno puede provocar una respuesta inmunológica fuerte en un sujeto, tal como inmunidad protectora al menos parcial o completa con respecto al menos un patógeno.

Un "inmunomodulador" o molécula "inmunomoduladora", tal como un polipéptido o ácido nucleico inmunomodulador, modula una respuesta inmunológica. Por "modulación" o "que modula" una respuesta inmunológica se pretende hace referencia a que la respuesta inmunológica está alterada. Por ejemplo, "modulación" de o "que modula" una respuesta inmunológica en un sujeto generalmente se refiere a que una respuesta inmunológica se estimula, se induce, se inhibe, se disminuye, se suprime, se aumenta, se potencia, o de otro modo se altera en un sujeto. Tal modulación de una respuesta inmunológica se puede evaluar por medios conocidos por los expertos en la materia, incluyendo los que se describen a continuación. Un "inmunosupresor" o "agente inmunosupresor" es una molécula, tal como un polipéptido o ácido nucleico, que suprime una respuesta inmunológica.

Una región o dominio de Fc de una molécula de inmunoglobulina o anticuerpo (también denominado un polipéptido de Fc de Ig o polipéptido de Fc) corresponde en gran medida a la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, y es responsable de diversas funciones, incluyendo la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, la región de Fc de Ig de la molécula de IgG comprende los dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina en la región bisagra N-terminal que dirige en CH2. La región bisagra es una parte de la cadena pesada entre Fc y CH1 que contiene los enlaces disulfuro inter-cadena pesada y la flexibilidad para molécula de anticuerpo. Los dominios constantes de la región de Fc interactúan con células del sistema inmunológico. Los receptores Fc son proteínas que se unen a la región de Fc de anticuerpos. Una familia significativa de receptores Fc para la clase de anticuerpo de IgG incluye los receptores Fc gamma (FcγR). La unión de los anticuerpos a receptores Fc en células media un número de funciones de anticuerpo. Diferentes subclases de IgG presentan diferentes afinidades hacia receptores

Fc gamma. En general, IgG1 y IgG3 se unen a los receptores con mayor afinidad que IgG2 e IgG4. Los receptores Fc se expresan en diversas células, que incluyen, por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, neutrófilos, y ciertos linfocitos. La unión de un Fc de Ig a su receptor pone a estas células efectoras en sitios del antígeno unido, dando como resultado por último señalización y respuestas inmunológicas, incluyendo activación de linfocitos B, respuestas inflamatorias, respuestas citotóxicas, y respuestas fagocíticas.

Una fusión de Fc de Ig es una molécula que comprende uno o más polipéptidos (o una o más moléculas pequeñas) unida de forma operativa a una región de Fc de una inmunoglobulina o anticuerpo. Véase, por ejemplo, Chamow *et al.*, 1996, Trends Biotechnol. 14: 52-60. Por consiguiente, una proteína de fusión de Fc de Ig es una molécula que comprende uno o más polipéptidos unidos de forma operativa a una región de Fc de Ig. Una proteína de fusión de Fc de Ig puede comprender, por ejemplo, la región de Fc de un anticuerpo (que facilita las funciones efectoras y farmacocinética) y la región de unión o dominio de unión de una proteína receptora o proteína ligando u otra proteína o fragmento de la misma. La región de unión o dominio de unión media el reconocimiento del receptor diana o ligando (comparable habla de una región variable de anticuerpos de un anticuerpo para un antígeno). Una región de Fc de Ig se puede unir de forma indirecta o directa a uno o más polipéptidos o moléculas pequeñas (compañeros de fusión). Diversos conectores conocidos en la técnica y como se describe con mayor detalle a continuación se pueden usar para unir un Fc de Ig a un compañero de fusión para generar una fusión de Fc de Ig. Una proteína de fusión de Fc de Ig por lo general comprende una región de Fc de Ig unida con enlace covalente directa o indirectamente al menos a un polipéptido, polipéptido que generalmente se une a un ligando o receptor diana.

Una "afinidad de unión específica" entre dos moléculas, por ejemplo, un ligando y un receptor, se refiere a una unión preferente de una molécula hacia otra. La unión de moléculas por lo general se considera específicas y la constante de asociación de unión en equilibrio (por ejemplo, K_A) es de aproximadamente $1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ o superior, incluyendo de aproximadamente 10^4 a 10^{13} M^{-1} , de aproximadamente 10^6 a 10^{12} M^{-1} , de aproximadamente 10^8 M^{-1} a 10^{11} M^{-1} o de aproximadamente 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Los valores de K_A para la interacción de unión entre un antígeno y un anticuerpo generalmente varían de aproximadamente 10^5 M^{-1} a aproximadamente 10^{12} M^{-1} , normalmente de aproximadamente 10^7 M^{-1} a aproximadamente 10^{11} M^{-1} , y a menudo de aproximadamente 10^8 M^{-1} a aproximadamente 10^{10} M^{-1} . $K_A (\text{M}^{-1})$ se le denomina calculando k_a/k_d , en la que k_a es la constante de la tasa de asociación y k_d es la constante de la tasa de disociación. Las unidades de k_a y k_d son $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y s^{-1} , respectivamente. La constante de disociación en equilibrio, K_D , es lo recíproco de K_A . $K_D = k_d/k_a$. Para la reacción $A + B \rightleftharpoons AB$ (que representa un solo ligando que se une a una sola proteína de interés (por ejemplo, receptor)), K_D es igual a $([A] \cdot [B])/[AB]$. Los ejemplos no limitantes de técnicas bien conocidas para medir afinidades de unión y/o capacidad de avidéz de moléculas incluyen, por ejemplo, tecnología de Biacore™ (GE Healthcare) como se discute en cualquier parte en el presente documento, microcalorimetría de valoración isotérmica (MicroCal LLC, Northampton, MA USA), ELISA, y métodos de separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Por ejemplo, FACS u otros métodos de separación se pueden usar para seleccionar poblaciones de moléculas (tales como por ejemplo, ligandos con presentación de superficie celular) que se unen de forma específica al miembro del par de unión asociado (tal como a receptor, por ejemplo, un receptor soluble). Los complejos de ligando-receptor se pueden detectar y clasificar por ejemplo, mediante fluorescencia (por ejemplo, haciendo reaccionar el complejo con un anticuerpo fluorescente que reconoce el complejo). Las moléculas de interés que se unen a un miembro del par de unión asociado (por ejemplo, receptor) se combinan y se ponen a clasificar en presencia de concentraciones menores de receptor. Realizando clasificaciones de múltiples rondas en presencia de concentraciones decrecientes de receptor (un intervalo de concentraciones a modo de ejemplo siendo del orden de 10^{-6} M a menos de 10^{-13} M , es decir, 1 micromolar (μM) a menos de 1 nanomolar (nM), o menos (por ejemplo, 10^{-11} M o 10^{-12} M), dependiendo de la naturaleza de la interacción ligando-receptor), se pueden aislar poblaciones de moléculas de interés que presentan afinidad de unión específica hacia el receptor.

La expresión "se une de forma específica (o de forma selectiva)" a un anticuerpo o "inmunorreactivo de forma específica (o de forma selectiva) con", cuando hacen referencia a una proteína, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Para seleccionar anticuerpos inmuno reactivos de forma específica con una proteína particular se puede usar diversos formatos de un ensayo. Por ejemplo, de forma rutinaria se usan inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos inmunorreactivos de forma específica con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar inmunoreactividad específica). Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y más habitualmente más de 10 a 100 veces el fondo.

El término "citoquina" incluye, por ejemplo, pero no se limita a, interleuquinas, interferones (IFN), quimioquinas, factores de crecimiento hematopoyético, factores de necrosis tumoral (TNF), y factores de crecimiento transformante. En general, se trata de proteínas de peso molecular pequeño que regulan maduración, activación, proliferación, y diferenciación de células del sistema inmunológico.

La expresión “identificación sistemática” describe, en general, un proceso que identifica moléculas óptimas de la presente invención, tales como, por ejemplo, incluyendo polipéptidos de la invención, y proteínas de fusión relacionadas que comprenden los mismos, y ácidos nucleicos que codifican todas esas moléculas. Varias propiedades de las respectivas moléculas se pueden usar en selección e identificación sistemática, por ejemplo, una capacidad de una molécula respectiva para inducir o alterar una respuesta inmunológica deseada en un sistema de ensayo o en una aplicación *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. La “selección” es una forma de identificación sistemática en la que la identificación y la separación física se consiguen de forma simultánea mediante expresión de un marcador de selección, que, en algunas circunstancias genéticas, permite que las células que expresan el marcador sobrevivan mientras que otras células mueren (o viceversa). Los marcadores de identificación sistemática incluyen, por ejemplo, luciferasa, beta-galactosidasa y proteína fluorescencia de color verde, sustratos de reacción, y similares. Los marcadores de selección incluyen genes de resistencia a fármaco y toxina, y similares. Otro modo de selección implica separación física basándose en un suceso detectable, tal como unión de un ligando a un receptor, creación de un sustrato con una enzima, o cualquier otro proceso físico que pueda generar una señal detectable ya sea directamente (por ejemplo, usando un sustrato o ligando cromogénico) o indirectamente (por ejemplo, por reacción con un anticuerpo secundario cromogénico). La selección mediante separación física se puede conseguir mediante diversos métodos, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, y FACS en célula completa o formatos de microgotita.

Debido a las limitaciones en el estudio de las respuestas inmunológicas primarias *in vitro*, los estudios *in vivo* son métodos de identificación sistemática particularmente útiles. En algunos de tales estudios, un polinucleótido o polipéptido de la invención se introduce primero en un sujeto de ensayo (por ejemplo, un mamífero, tal como un animal), y una respuesta inmunológica inducida se estudia posteriormente analizando el tipo de respuesta de inmunológica en el animal inmunizado (por ejemplo, producción de anticuerpos en el suero del animal inmunizado, proliferación de linfocitos T), o estudiando la calidad por resistencia de la respuesta inmunológica inducida en el animal inmunizado (por ejemplo, nivel del título de anticuerpo inducido).

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

La expresión “composición farmacéutica” se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto, incluyendo un animal o ser humano. Una composición farmacéutica por lo general comprende una cantidad eficaz de un agente activo y un vehículo, excipiente, o diluyente. El vehículo, excipiente, o diluyente por lo general es un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, respectivamente.

La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una dosificación (o dosis) o cantidad de una sustancia suficiente para producir un resultado deseado. El resultado deseado puede comprender una mejora objetiva o subjetiva en el receptor de la dosificación o cantidad. Por ejemplo, el resultado deseado puede comprender una inducción, estimulación, mejora o modulación de una respuesta inmunológica mensurable, detectable o que se puede someter a ensayo en un sujeto al que se ha administrado una dosificación o cantidad de un antígeno o inmunógeno (o composición del mismo) particular. Una dosificación (o dosis) o cantidad de un inmunógeno suficiente para producir tal resultado se puede describir como una dosificación (o dosis) o cantidad “inmunogénica”.

Un “tratamiento profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos o síntomas de, o presenta solamente signos o síntomas tempranos de, una enfermedad, patología, o trastorno, de modo que ese tratamiento se administra con el fin de prevenir o disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad, patología, o trastorno. Un tratamiento profiláctico funciona como un tratamiento preventivo contra una enfermedad, patología, o trastorno, o como un tratamiento que inhibió reducir el desarrollo o potenciación adicionales de una enfermedad, patología o trastorno. Una “actividad profiláctica” es una actividad de un agente que, cuando se administra a un sujeto que no presenta signos o síntomas de, o que presenta solamente signos o síntomas tempranos de, una patología, enfermedad, o trastorno, previene o disminuye el riesgo de que el sujeto desarrolle la patología, enfermedad, o trastorno. Un agente “profilácticamente útil” (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) se refiere a un agente que es útil para prevenir el desarrollo de una enfermedad, patología, o trastorno, o útil para inhibir o reducir el desarrollo o potenciación adicionales de una enfermedad, patología o trastorno.

Un “tratamiento terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta síntomas o signos de patología, enfermedad, o trastorno, en el que el tratamiento se administra al sujeto con el fin de disminuir o eliminar esos signos o síntomas. Una “actividad terapéutica” es una actividad de un agente que elimina o disminuye los signos o síntomas de patología, enfermedad o trastorno cuando se administra a un sujeto que padece tales signos o síntomas. Un agente “terapéuticamente útil” se refiere a que el agente es útil para disminuir, tratar, o eliminar signos o síntomas de una enfermedad, patología, o trastorno.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y muchos de los procedimientos de laboratorio en

cultivo celular, genética molecular, biología molecular, química de ácidos nucleicos, y química de proteínas que se describen a continuación se conocen bien y normalmente son usados por las personas con experiencia habitual en la materia. Las técnicas convencionales, tales como las que se describen en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (en lo sucesivo en el presente documento "Sambrook") y CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F. M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (1994, suplementado hacia 1999) (en lo sucesivo en el presente documento "Ausubel"), se usan para métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, métodos de cultivo celular, e incorporación de transgenes, por ejemplo, electroporación, inyección, pistola genética, impresión a través de la piel, y lipofección. Generalmente, las etapas de síntesis y purificación de oligonucleótidos se realizan and de acuerdo con las especificaciones. Las técnicas y procedimientos generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales que se proporcionan a través del presente documento. Se cree que los procedimientos que se encuentran en el mismo son bien conocidos para las personas con una experiencia habitual en la materia y se proporcionan para la conveniencia del vector.

En el presente documento se definen o de otro modo se caracterizan diversos términos adicionales.

MOLÉCULAS Y MÉTODOS QUE SE DESVELAN EN EL PRESENTE DOCUMENTO

En el presente documento se desvelan moléculas y métodos para tratar enfermedades, trastornos, y afecciones del sistema inmunológico, incluyendo, por ejemplo, aquéllas en las que es deseable la modulación del sistema inmunológico (por ejemplo, respuestas inmunológicas dependientes de los linfocitos T). Las moléculas que se desvelan en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos, conjugados, las proteínas de fusión solubles, ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos o proteínas de fusión) son útiles para el tratamiento de enfermedades, trastornos, y afecciones del sistema inmunológico en las que se desea la inmunosupresión, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, el tratamiento de enfermedades, trastornos, y afecciones autoinmunes, enfermedades inmunoproliferativas, trastornos relacionados con injerto, y métodos de tratamiento que implican trasplantes de tejido, célula, órgano, o injertos de un donante a un receptor cuando se desea supresión de una respuesta inmunológica en el receptor contra el tejido, célula, órgano o injerto del donante.

En el presente documento también se desvelan nuevas moléculas de CTLA-4 mutantes que tienen propiedades mejoradas en comparación con una molécula de CTLA-4, tal como el polipéptido de CTLA-4 humano de tipo silvestre ("hCTLA-4") o un fragmento del mismo que se une a CD80 y/o CD86, tal como el dominio extracelular de CTLA-4 humano ("ECD hCTLA-4"). Como se discute con mayor detalle a continuación, se usaron diversas estrategias de mutagénesis de identificación sistemática para preparar e identificar nuevas moléculas de CTLA-4 mutantes que se unen a CD80 y/o CD86. En particular, tales estrategias se usaron para preparar e identificar moléculas mutantes de CTLA-4 con una mejora de la avidéz de unión para CD80 (B7-1) y/o CD86 (B7-2), en comparación con CTLA-4 humano ("hCTLA-4"), y/o que tienen una mejora de las afinidades de unión para CD80 y/o CD86, en comparación con el ECD de hCTLA-4. Las moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación que se pueden unir a ligandos de CD80 y/o CD86 endógenos expresados en células presentadora de antígeno inhiben o bloquean de forma eficaz la interacción de estos ligandos con el receptor CD28 endógeno, que se expresa en la superficie de los linfocitos T. Como resultado, la señal coestimuladora fundamental para la activación de los linfocitos T proporcionada por la interacción del receptor CD28 de la superficie del linfocito T con las moléculas B7 (es decir, CD80 y CD86) se inhibe o se bloquea. Tales linfocitos T no se activan de forma óptima y presentan una reducción de las capacidades de proliferación.

En casos en los que la señalización entre un ligando CD80 o CD86 y un receptor CD28 se bloquea, los linfocitos T no se estimulan de forma óptima para llegar a ser activos y por lo tanto no se induce su proliferación de forma óptima. De forma análoga, en casos en los que la señalización entre un ligando CD80 o CD86 y un receptor CD28 receptor se inhibe, la activación y la proliferación de los linfocitos T se inhibe. Se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes que funcionan como antagonistas para la señalización de CTLA-4. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes que funcionan como antagonistas para la señalización de CD28, suprimiendo o bloqueando de ese modo las respuestas inmunológicas dependientes de los linfocitos T; tales moléculas funcionan como agentes inmunosupresores. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes que se unen tanto a CD80 como a CD86, pero que tienen mayor avidéz de unión hacia CD86 que hacia CD80, y por lo tanto inhiben la coestimulación dependiente de CD86 en mayor medida que la coestimulación dependiente de CD80. Se espera que todas las moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación sean útiles para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones en los que la inmunosupresión es deseable o podría ser beneficiosa.

Se ha mostrado que una proteína de fusión de CTLA-4-Ig humano y una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante específica – ambas desarrolladas por Bristol-Myers Squibb Co. (Princeton, NJ) – son eficaces para el tratamiento de ciertas enfermedades o afecciones relacionadas con el sistema inmunológico. La proteína de fusión Orenicia® (también conocida como Abatacept ("ABA")) (Bristol-Myers Squibb Co. (Princeton, NJ)) es una proteína de fusión dimerica recombinante soluble que consiste en dos proteínas de fusión de inmunoglobulina (Ig) monomérica idénticas unidas de forma covalente en conjunto con un enlace disulfuro formado entre un resto de cisteína presente en cada proteína de fusión monomérica. ORENCIA es una marca comercial registrada de Bristol-Myers Squibb

Company. Cada proteína de fusión de Ig monomérica del dímero Orenzia® consiste en el dominio extracelular de CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 159) fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG1 mutante específico (SEQ ID NO: 186). La secuencia de polipéptidos completa de cada una de tales proteínas de fusión monoméricas se muestra en la SEQ ID NO: 164. El dímero Orenzia® se produce en un sistema de expresión mamífero y tiene un peso molecular aparente de 92 kDa. Se cree que las dos proteínas de fusión de Ig monoméricas del dímero Orenzia® se unen de forma covalente en conjunto mediante un solo enlace disulfuro entre el resto de cisteína en la posición 120 de cada monómero de IgG1 mutante para hCTLA-4 y que no se forman enlaces disulfuro entre los dos polipéptidos de Fc de IgG1 mutante.

El dímero Orenzia® es un modulador de la coestimulación selectivo que inhibe la activación de los linfocitos T mediante la unión a CD80 y CD86 y por lo tanto bloqueando la interacción con CD28. El dímero Orenzia® en la actualidad está aprobado para el tratamiento de adultos humanos que padecen artritis reumatoide (RA) de moderada a severa. La información adicional sobre el dímero Orenzia® y sus indicaciones y eficacia clínicas se proporciona en las páginas web en orenzia.com y bms.com.

Como se ha indicado anteriormente, cada monómero de la proteína de fusión del dímero Orenzia® contiene un dominio extracelular de CTLA-4 humano. El CTLA-4 humano es una proteína de membrana que se expresa de forma transitoria en los linfocitos T. La secuencia de proteínas de longitud completa de hCTLA-4 de longitud completa de WT se muestra en la SEQ ID NO: 160, y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica hCTLA-4 de longitud completa de WT se muestra en la SEQ ID NO: 194. El CTLA-4 humano incluye un péptido señal (SP), dominio extracelular (ECD), dominio transmembrana (TD), y dominio citoplasmático (CD, unido con enlace covalente en conjunto en ese orden (por ejemplo, el extremo C-terminal del SP se une con enlace covalente al extremo N-terminal del ECD, el extremo C-terminal del ECD se une con enlace covalente al extremo N-terminal del TD, y el extremo C-terminal del TD se une con enlace covalente al extremo N-terminal del CD). El polipéptido de ECD de hCTLA-4 de WT por lo general comprende los restos 38-161 de la secuencia de proteínas de hCTLA-4 de longitud completa (SEQ ID NO: 160) y por lo general tiene una longitud de 124 restos de aminoácido. Esta secuencia de polipéptidos de ECD de hCTLA-4 se muestra en la SEQ ID NO: 159. El péptido señal (SP) de la proteína hCTLA-4 de longitud completa, que por lo general comprende los restos de aminoácido 1-35 o 1-37 de la SEQ ID NO: 160, se escinde durante el procesamiento. Véase, por ejemplo, Harper *et al.*, J. Immunol. 147 (3): 1037-1044 (1991). La secuencia del péptido señal CTLA-4 humano que comprende los restos de aminoácido 1-35 o 1-37 de la proteína hCTLA-4 se muestra en la SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO: 216, respectivamente. Si la secuencia del péptido señal es la que se muestra en la SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO: 216, cuando el péptido señal se escinde, la proteína hCTLA-4 madura por lo general comienza con el resto de metionina en la posición 38 del aminoácido de la secuencia de proteínas de hCTLA-4 de longitud completa que se muestra en la SEQ ID NO: 160. Por lo tanto, incluso si la secuencia del péptido señal de hCTLA-4 es la de la SEQ ID NO: 182, que comprende los restos de aminoácido 1-35 de la proteína hCTLA-4, la proteína hCTLA-4 secretada madura resultante comienza con la metionina que está en la posición 38 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa. Los restos de lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 de longitud completa no están presentes en la proteína hCTLA-4 madura y se cree que se escinden de la proteína hCTLA-4 madura durante el procesamiento. Por lo tanto los restos de aminoácido de la secuencia de proteínas de hCTLA-4 maduro se numeran generalmente comenzando con el resto de metionina presente en la posición 38 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa como el primer aminoácido (es decir, ocupando la posición 1); en consecuencia, el resto de histidina ocupa la posición 2 del aminoácido en la proteína hCTLA-4 madura, etc. Cada monómero del dímero Orenzia® incluye la secuencia de polipéptidos de ECD de hCTLA-4 que se muestra en la SEQ ID NO: 159. En la proteína hCTLA-4 de WT de longitud completa, el péptido señal comprende los restos de aminoácido 1-37, el dominio extracelular (ECD) comprende los restos de aminoácido 38-161, el dominio transmembrana (TD) comprende los restos de aminoácido 162-182, y el dominio citoplasmático (CD) comprende los restos de aminoácido 183-223 de la SEQ ID NO: 160. El dominio maduro (MD) de la proteína hCTLA-4 por lo general comprende los restos de aminoácido 36-223, o en algunos casos, los restos de aminoácido 37-223 o 38-223 de la SEQ ID NO: 160.

El ácido nucleico de la SEQ ID NO: 194 comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia del péptido señal (restos de nucleótido 1-111), una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el ECD de hCTLA-4 (restos de nucleótido 112-483), una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático de hCTLA-4 (restos de nucleótido 484-669); los últimos 3 nucleótidos C-terminales son el codón de parada TGA.

Belatacept (también conocido como "LEA29Y-Ig", "LEA-Ig", o "A29YL104E-Ig") (Bristol-Myers Squibb Co. (Princeton, NJ)) es una proteína dimérica recombinante soluble formada por dos proteínas de fusión de Ig idénticas unidas con enlace covalente en conjunto con un enlace disulfuro formado entre un resto de cisteína en cada proteína de fusión monomérica. Cada proteína de fusión monomérica está formada por un polipéptido de dominio extracelular de CTLA-4 mutante fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de IgG1 mutante específico. La secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante se diferencia de la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 humano de WT en dos mutaciones, específicamente una sustitución de una tirosina por la alanina en la posición 29 (abreviada como la sustitución A29Y) y una sustitución de una glutamina por la leucina en la posición 104 (abreviada como la sustitución L104E), en la que los restos de aminoácido en el ECD de CTLA-4 humano se numeran con la metionina en el extremo N-terminal que representa al aminoácido en la posición 1. Cada

monómero de Belatacept incluye la secuencia de polipéptidos de Fc de IgG1 mutante que se muestra en la SEQ ID NO: 186; este polipéptido de Fc de IgG1 mutante es idéntico al polipéptido de Fc de IgG1 mutante incluido en la proteína de fusión Orenicia®. La proteína de fusión monomérica Belatacept por lo tanto se diferencia de cada proteína de fusión monomérica Orenicia® por dos aminoácidos. La secuencia de polipéptidos de cada una de tales proteínas de fusión monoméricas en Belatacept se muestra en la SEQ ID NO: 166. Por lo tanto en nombre "LEA29Y-Ig" refleja el hecho de que cada proteína de fusión monomérica del dímero Belatacept está formada por un ECD de CTFA-4 mutante que se diferencia de la secuencia de polipéptidos de ECD de CTFA-4 humano por dos mutaciones L104E and A29Y. Se ha mostrado que Belatacept se une a CD86 aproximadamente 4 veces con más avidéz y que se une a CD80 aproximadamente 2 veces con más avidéz que el dímero Orenicia® (Larson *et al.*, Amer. J. Transplant. 5: 443-453, 444 (2005). Se ha mostrado que Belatacept es hasta aproximadamente 10 veces más potente que el dímero Orenicia® para inhibir la activación de los linfocitos T *in vitro* y que tiene una mejora de la potencia inmunosupresora *in vivo* en comparación con la proteína Orenicia® como se muestra por su aumento de la capacidad para inhibir las respuestas de anticuerpos dependientes de los linfocitos T y su mejora de la prolongación de la supervivencia a aloinjerto renal en ensayos clínicos que implican a primates no humanos. *Id.* La información adicional sobre Belatacept y sus indicaciones y eficacia clínicas se proporciona en la página web en bms.com.

En el presente documento se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, incluyendo las nuevas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles que se describen en el presente documento, que tienen una avidéz de unión hacia CD86 que es mayor que la avidéz de unión del dímero Orenicia® (hCTLA-4-Ig dimérica) hacia CD86. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, incluyendo las nuevas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutantes diméricas recombinantes solubles, que tienen una avidéz de unión hacia CD80 que es aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión del dímero Orenicia® hacia CD80. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, incluyendo las nuevas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles, que tienen una capacidad mayor para suprimir una o más respuestas inmunológicas (por ejemplo, respuestas inmunológicas dependientes de los linfocitos T) que Orenicia® (Abatacept). Se espera que las moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación que tienen una o más propiedades mejoradas en comparación con el dímero Orenicia® sean más potentes y por lo tanto más eficaces, útiles, y ventajosas que el dímero Orenicia® para el tratamiento de enfermedades, trastornos, o afecciones en las que es deseable la inmunosupresión, incluyendo esas enfermedades, trastornos, o afecciones para los que el dímero Orenicia® está aprobado y/o se ha mostrado que proporciona beneficio clínico, tales como enfermedades autoinmunes, incluyendo, por ejemplo, artritis reumatoide y psoriasis.

También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, incluyendo las nuevas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles que se describen en el presente documento, que tienen una avidéz de unión hacia CD86 que es mayor de la avidéz de unión de Belatacept (LEA29Y-Ig) hacia CD86. También se desvelan moléculas de CTLA-4 mutantes, incluyendo las nuevas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutantes recombinantes solubles que se describen en el presente documento, que tienen una capacidad mayor para suprimir una o más respuestas inmunológicas (por ejemplo, respuestas inmunológicas dependientes de los linfocitos T) que Belatacept. Se espera que las moléculas de CTLA-4 mutantes de la divulgación que tienen una o más propiedades mejoradas en comparación con Belatacept sean más potentes que Belatacept y por lo tanto más eficaces, útiles, y ventajosas que Belatacept para el tratamiento de enfermedades, trastornos, o afecciones en las que es deseable la inmunosupresión, incluyendo esas enfermedades, trastornos, o afecciones para los que se ha mostrado que la proteína de fusión Belatacept proporciona beneficio clínico, tales como supervivencia al aloinjerto renal en primates no humanos.

La seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, inmunogenicidad, y eficacia clínica de una molécula de la divulgación, tal como una molécula de CTLA-4 mutante de la divulgación, (por ejemplo, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble como se describe con detalle a continuación) en un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno inmunológico (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, etc.) a los que se administra una dosis particular de la molécula de una manera particular (por ejemplo, administración parenteral, intravenosa, o subcutánea) se puede determinar usando metodologías comparables a las usadas en ensayos clínicos para Orenicia® que implican sujetos similares. Véase, por ejemplo, las direcciones de la página web mundial en bms.com y orenicia.com. Por ejemplo, el grado en el que una molécula de CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante soluble) es eficaz para reducir en sujetos que tienen artritis reumatoide (RA) la progresión del daño en las articulaciones, para aliviar los signos y síntomas de RA, incluyendo reducción del dolor, se pueden evaluar usando metodologías similares a las usadas en los ensayos clínicos de Orenicia® que implican a pacientes con RA.

La seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, inmunogenicidad, y eficacia clínica de una molécula de la divulgación (por ejemplo, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble como se describe con detalle a continuación) en un sujeto en el que se desea la inmunosupresión (por ejemplo, un sujeto que se somete a trasplante de tejidos, célula, órgano, o injerto de un donante) y al que se administra una dosis particular de la molécula de una manera particular (por ejemplo, administración parenteral, intravenosa, o subcutánea) se puede determinar usando metodologías comparables a las usadas en ensayos clínicos para Belatacept que implican sujetos similares. Véase, por ejemplo, las direcciones de la página web mundial en bms.com. Por ejemplo, el grado

en el que una molécula de CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante soluble) es eficaz para reducir el rechazo al trasplante de riñón o renal en un paciente receptor que se sometía un trasplante de riñón o renal se puede evaluar usando metodologías similares a las usadas en el ensayo clínico de Belatacept que implica a

5 A continuación se discuten con detalles adicionales moléculas y métodos de la divulgación y otros aspectos de la divulgación.

POLIPÉPTIDOS

10 En el presente documento se desvelan nuevos polipéptidos, denominados de forma colectiva "polipéptidos de la divulgación". La expresión "polipéptidos de la divulgación" pretende incluir variantes y/o derivados de las secuencias de polipéptidos que se desvelan en el presente documento. Los polipéptidos de la divulgación incluyen polipéptidos de CTLA-4 de origen natural o mutantes recombinantes que se unen a CD80 y/o CD86 y/o que inhiben o suprimen

15 respuestas inmunológicas. Los polipéptidos de la divulgación incluyen proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación, e incluyen formas monoméricas y diméricas de tales proteínas de fusión. Los polipéptidos de la divulgación incluyen multímeros que comprenden uno o más polipéptidos de CTLA-4 mutantes de la divulgación. La divulgación también incluye conjugados que comprenden uno o más polipéptidos de CTLA-4 mutantes de la divulgación. Algunos polipéptidos de la divulgación son polipéptidos solubles.

20 Por ejemplo, como se describe con más detalle a continuación, la divulgación incluye proteínas de fusión solubles que comprenden un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante unido a un polipéptido diferente (tal como, por ejemplo, un polipéptido de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, un polipéptido de Fc de Ig) que aumenta la solubilidad del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante.

25 Como se discute con más detalle a continuación, en un aspecto de la divulgación, se usaron diversas estrategias de mutagénesis e identificación sistemática para preparar e identificar nuevos polipéptidos que se unen a CD80 y/o CD86. En particular, tales estrategias se usaron para preparar e identificar nuevos polipéptidos con un aumento de las capacidades para unirse a CD80 y/o CD86, incluyendo nuevos polipéptidos CTLA-4 mutantes con una mejora de las afinidades o avidez de unión hacia CD80 y/o CD86. Los polipéptidos de la divulgación que se unen a ligandos

30 CD80 y/o CD86 expresados en células de presentación de antígenos interfieren con o bloquean la interacción de estos ligandos con los receptores CD28 expresados en linfocitos T. como resultado, la señal coestimuladora de los linfocitos T proporcionada por la interacción del receptor CD28 de superficie de linfocitos T con las moléculas B7 (es decir, CD80 y CD86) se inhibe o se bloquea. Se cree que tales polipéptidos son útiles en el tratamiento profiláctico y terapéutico de enfermedades, trastornos, y afecciones en los que la modulación del sistema inmunológico (por

35 ejemplo, respuestas de los linfocitos T) es beneficioso.

Polipéptidos de CTLA-4 mutantes

40 En el presente documento se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11,

45 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46,

50 SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, y SEQ ID NO: 73), en las que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 o a un fragmento de polipéptido de CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera o

55 ambos), y/o modulan o regulan una respuesta inmunológica. Algunos de tales polipéptidos, tal como cada uno de los que se presentan en las SEQ ID NOS: 1-73, se describen como polipéptidos secretados o maduros de ECD de CTLA-4 mutante. Los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante que se presentan en cada una de las SEQ ID NO: 1-73 no incluyen un péptido señal; se ha escindido durante el procesamiento, produciendo de ese modo el polipéptido maduro o secretado. Un fragmento de polipéptido de CD80 puede comprender, por ejemplo, un polipéptido de dominio extracelular de un polipéptido CD80, tal como, por ejemplo, polipéptido de ECD de CD80 humano ("ECD de hCD80"). Un fragmento de polipéptido de CD86 puede comprender, por ejemplo, un polipéptido de dominio extracelular de un polipéptido CD86, tal como, por ejemplo, polipéptido de ECD de CD86 humano ("ECD de hCD86"). Algunos de tales polipéptidos se unen a un CD80 y/o CD86 de mamífero o fragmento de polipéptido del mismo, tal como, por ejemplo, un ECD de CD80 o CD86 de mamífero. Algunos de tales polipéptidos se unen a CD80

60 humano de WT ("hCD80") y/o CD86 humano de WT ("hCD86") o un fragmento de polipéptido del mismo, tal como, por ejemplo, ECD de hCD80 o ECD de hCD86. En algunos de tales métodos, al menos una respuesta inmunológica

65

se suprime o se inhibe.

Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o avidez de unión hacia hCD80 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD80) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidez de unión del polipéptido de ECD de hCTLA-4 hacia hCD80 o un fragmento del mismo, respectivamente. La secuencia de polipéptidos de hCD80 de longitud completa predicha, que incluye un péptido señal, ECD, dominio transmembrana, y dominio citoplasmático unido con enlace covalente juntos en ese orden, se presenta en la SEQ ID NO: 195. El péptido señal comprende los restos de aminoácido 1-34, el ECD comprende los restos de aminoácido 35-242, el dominio transmembrana comprende los restos de aminoácido 243-263, y el dominio citoplasmático comprende los restos de aminoácido 264-288 de la SEQ ID NO: 195. La secuencia de polipéptidos del ECD de hCD80 se muestra en la SEQ ID NO: 174. La secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID NO: 173 codifica el péptido señal de CD80 humano de WT (en el extremo N-terminal) y el ECD de CD80 humano.

Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o avidez de unión hacia hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD86) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidez de unión del polipéptido de ECD de hCTLA-4 para hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD), respectivamente. La secuencia de polipéptidos de hCD86 de longitud completa predicha, que incluye un péptido señal, ECD, dominio transmembrana, y dominio citoplasmático unido con enlace covalente juntos en ese orden, se presenta en la SEQ ID NO: 175, y un ácido nucleico modo de ejemplo que codifican la secuencia de polipéptidos de hCD86 de longitud completa predicha se muestra en la SEQ ID NO: 176. La secuencia de polipéptidos del ECD de hCD86 se muestra en la SEQ ID NO: 180. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o avidez de unión hacia hCD86 que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidez de unión del polipéptido de ECD de LEA29Y que tiene la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 168 para hCD86. Los polipéptidos de la invención a modo de ejemplo que tienen afinidades de unión o avidez de unión hacia ECD de hCD86 o hCD86 que son al menos iguales a o mayores que los del ECD de hCTLA-4 y ECD de LEA29Y (también denominados ECD de "A29YL104E" o "L104EA29Y") hacia hCD86 o ECD de hCD86, respectivamente, incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, los que comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con respecto a la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4, 10-12, 15, 17, 24, 26, 28, 35, y 61. Véase, por ejemplo, la Tabla 5 en el Ejemplo 4. Los datos que se presentan en la Tabla 5 reflejan una interacción monomérica entre un CTLA-4-Ig representativo y ECD de CD86 monomérico. El término LEA29Y (o A29YL104E o L104EA29Y), si no se indica de otro modo, se refiere a ECD de LEA29Y (o A29YL104E o ECD de L104EA29Y).

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

Algunos de tales polipéptidos que se han descrito anteriormente, incluyendo, por ejemplo, los polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73 y que se unen a CD80 y/o CD86 y/o un ECD de los mismos, tienen una capacidad para modular o regular una respuesta inmunológica. Una o más de diversas respuestas inmunológicas se pueden modular o regular con tales polipéptidos, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2, etc.), inducción de diversos marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2, etc.), síntesis o producción de moléculas inflamatorias, inflamación, hinchazón de articulación, sensibilidad de articulación, dolor, rigidez, niveles en suero de proteína C-reactiva, producción de anticuerpos anti-colágeno, y/o respuesta(s) a anticuerpo dependientes de linfocitos T). En algunos casos, un polipéptido de ese tipo tiene una capacidad más elevada para suprimir o inhibir al menos una de tales respuestas inmunológicas que hCTLA-4 o ECD de hCTLA-4.

Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos son capaces de inhibir la activación de los linfocitos T o la proliferación de los linfocitos T en ensayos *in vitro*. Los ejemplos 4-9 que se presentan a continuación, por ejemplo, demuestran la

capacidad de proteínas de fusión representativas que comprenden una secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante representativa, tal como las que se describen en el presente documento, para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro*. Algunos de tales polipéptidos son capaces de inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto *in vivo*, tal como a través de la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente cantidad eficaz de al menos uno de tales polipéptidos a un sujeto con necesidad de terapia inmunosupresora. Se espera que algunos de tales polipéptidos sean útiles en diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, pero que no se limitan a, métodos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos, y afecciones del sistema inmunológico en los que la inmunomodulación es deseable, tal como se discute con más detalle a continuación. Se espera que tales polipéptidos sean útiles en métodos profilácticos y/o terapéuticos para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunológico de mamíferos, tales como por ejemplo, seres humanos, en los que la inmunoinhibición o inmunosupresión es deseable), métodos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano), y otros métodos que se describen en cualquier parte en el presente documento.

Además o como alternativa, algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de hCTLA-4 o el ECD de hCTLA-4 para suprimir o inhibir uno o más tipos de respuestas inmunológicas. Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en ensayos y/o aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*, tales como los que se han descrito anteriormente y se describen con mayor detalle a continuación, que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de hCTLA-4 o el ECD de hCTLA-4 para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en las aplicaciones de ese tipo. Además, algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas, respuesta de anticuerpo dependiente de los linfocitos T) que es mayor que la capacidad de un polipéptido LEA29Y - un ECD de CTLA-4 mutante específico que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 168 - para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica. Los ejemplos 4-9 que se presentan a continuación, por ejemplo, comparan la capacidad de proteínas de fusión representativas de la invención que comprenden una secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante de la invención para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de una proteína de fusión que comprende el ECD de hCTLA-4 o polipéptido LEA29Y para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro*. Se espera que las moléculas de ese tipo tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones terapéuticas, incluyendo tratamiento de enfermedades y trastornos autoinmunes, y métodos profilácticos y terapéuticos para inhibir el rechazo de trasplante de órgano, célula, o injerto de tejido.

Algunos de tales polipéptidos se pueden diferenciar entre sí, por ejemplo, por una delección, adición y/o sustitución de aminoácido. Una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución conservativa o no conservativa. Véase, por ejemplo, la sección con el título "Variación de Secuencia".

En el presente documento se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en las que el polipéptido se une a un hCD80 monomérico o hCD86 monomérico o un ECD de cualquiera o ambos. Algunos de tales polipéptidos tienen (1) una afinidad de unión hacia hCD86 monomérico que es aproximadamente igual a o mayor que la afinidad de unión de hCTLA-4 monomérico o un polipéptido LEA29Y hacia hCD86 monomérico o un ECD del mismo, y (2) una afinidad de unión hacia hCD80 monomérico que es aproximadamente igual a o mayor que la afinidad de unión de hCTLA-4 monomérico hacia hCD80 monomérico. El polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 168. Además, algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad mayor para suprimir una o más respuestas inmunológicas que se describen en el presente documento (por ejemplo, activación/proliferación de linfocitos T, síntesis/producción de citoquinas, inducción de marcadores de activación, producción de moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anticelágeno, respuesta a Ab dependiente de los linfocitos T) que el hCTLA-4 monomérico, ECD de hCTLA-4 monomérico, o polipéptido LEA29Y.

En el presente documento también se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en la que el polipéptido tiene una afinidad de unión hacia un ECD de hCD86 o ECD de hCD80 que es aproximadamente igual a o mayor que la afinidad de unión de un ECD de hCTLA-4 hacia el ECD de hCD86 o ECD de hCD80, respectivamente. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad de unión hacia el ECD de hCD86 que es mayor de la afinidad de unión del ECD de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 159) o el polipéptido LEA29Y (SEQ ID NO: 168) hacia el ECD de hCD86. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad de unión hacia el ECD de hCD80 que es mayor de la afinidad de unión del ECD de hCTLA-4 hacia el ECD de hCD80. Algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad para suprimir una respuesta inmunológica, en algunos casos, la capacidad mayor para suprimir una o más respuestas inmunológicas, incluyendo los que se han descrito anteriormente y en toda el documento, que el ECD de hCTLA-4 o el polipéptido LEA29Y.

En el presente documento se desvelan polipéptidos aislados o recombinantes (por ejemplo, polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante) cada uno de los cuales comprende una secuencia de polipéptidos (a) que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 en no más de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 resto o restos de aminoácido, y (b) en la que el resto de aminoácido en la

5 secuencia de polipéptidos en la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 del resto de aminoácido es idéntico al resto de aminoácido en la posición correspondiente de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, un polipéptidos seleccionado entre las SEQ ID NOS: 1-73), en la que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera o ambos, y/o inhibe una respuesta o respuestas inmunológicas. En algunos casos, el polipéptido se diferencia del polipéptido seleccionado (por ejemplo, seleccionada entre las SEQ ID NOS: 1-

10 73) en no más de 10, 9, 8, 7, o 6 restos de aminoácido (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 restos de aminoácido), el aminoácido que ocupa una o más de las posiciones 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, y 85 del resto de aminoácidos es idéntico al resto de aminoácido incluido en esa posición en la secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, una seleccionada entre las SEQ NOS: 1-73) y no presenta delección o sustitución con otro aminoácido. Algunos de tales polipéptidos comprenden una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos seleccionada en no más de 10, 9, 8, 7, o 6 restos de aminoácido (por ejemplo, no más de

15 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 restos de aminoácido) y que incluye restos de aminoácido en una o más de las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 del resto de aminoácidos que son idénticos a los restos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la secuencia de polipéptidos seleccionada. Tales polipéptidos se pueden diferenciar de la secuencia de polipéptido seleccionada por delección(s) de aminoácido, adición(s), y/o lución(s) de aminoácido en una posición o posiciones que no especifica que tengan un aminoácido idéntico al de la secuencia seleccionada. Tales polipéptidos que tienen una afinidad o avidez de unión hacia hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD86) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidez de unión del ECD de hCTLA-4 o polipéptido LEA29Y hacia hCD86 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD), respectivamente, están incluidos. Algunos de tales polipéptidos tienen una afinidad o avidez de unión

20 hacia hCD80 o un fragmento del mismo (por ejemplo, ECD de hCD80) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidez de unión del polipéptido de ECD de hCTLA-4 hacia hCD80 o un fragmento del mismo, respectivamente. Algunos de tales polipéptidos comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud aproximadamente igual a la longitud del aminoácido del ECD de hCTLA-4, por ejemplo, una longitud de 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126, 123-125, o 124 restos de aminoácido.

Algunos de tales polipéptidos son capaces de suprimir una o más de diversas respuestas inmunológicas, que incluyen, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de moléculas inflamatorias, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta o

35 respuestas de Ab dependientes de linfocitos T). Algunos de tales polipéptidos tienen una capacidad mayor para inhibir una o más de tales respuestas inmunológicas que hCTLA-4, polipéptido de ECD de hCTLA-4, o polipéptido LEA29Y. Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos son capaces de inhibir la activación de los linfocitos T o la proliferación de los linfocitos T en ensayos *in vitro*. Los ejemplos 4-9, por ejemplo, comparan la capacidad de proteínas de fusión representativas de la invención que comprenden una secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de una proteína de fusión que comprende el ECD de hCTLA-4 o polipéptido LEA29Y para hacerlo de ese modo. Algunos de tales polipéptidos son capaces de inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto *in vivo*, tal como a través de la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente cantidad eficaz de al menos uno de tales polipéptidos a un sujeto con necesidad de terapia inmunosupresora. Se espera que tales polipéptidos sean

45 útiles en diversas aplicaciones, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, métodos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos, y afecciones del sistema inmunológico en los que es deseable una supresión de la respuesta inmunológica, incluyendo, por ejemplo, métodos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes, métodos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano), y otros métodos que se describen en cualquier parte en el presente documento.

En el presente documento también se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que comprende (i) una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a cualquier secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID

55 NOS: 1-73 y (ii) un resto de fenilalanina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 70 de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1-73, en la que el polipéptido se une a hCD80 y/o hCD86 o a un dominio extracelular de los mismos y/o inhibe una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas, inducción de marcadores de activación, producción de moléculas inflamatorias, inflamación, sensibilidad de articulación, dolor, rigidez, niveles en suero de proteína C-reactiva, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta de Ab dependiente de linfocitos T, etc.) en ensayos *in vitro* y/o métodos *in vivo*. Algunos de tales polipéptidos comprenden uno o más de los siguientes con respecto a la secuencia seleccionada: un resto de ácido glutámico en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 24; un resto de asparagina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 30; un resto de isoleucina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 32; un resto de metionina en una

60 posición de aminoácido que corresponde a la posición 50; un resto de lisina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 54; un resto de ácido glutámico en una posición de aminoácido que corresponde a la

posición 55; un resto de ácido aspártico en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 56; un resto de prolina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 64; un resto de serina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 65; y un resto de ácido glutámico en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 104. Se espera que tales polipéptidos tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones, incluyendo métodos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes, y métodos para inhibir el trasplante de órgano, célula o injerto de tejido.

En el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que comprende (i) una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % con respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 36- 46 y 55, y (ii) un resto de ácido glutámico en una posición de aminoácido 55 de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada, en la que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 o a un dominio extracelular de cualquiera o ambos y/o suprime una respuesta inmunológica. Las respuestas inmunológicas que se pueden suprimir incluyen, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de moléculas inflamatorias, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta de Ab dependiente de linfocitos T). Tal secuencia de polipéptidos puede comprender adicionalmente un resto de fenilalanina en la posición 70 del aminoácido. Tal secuencia de polipéptidos puede comprender adicionalmente un resto de prolina en la posición 64 y/o un resto de asparagina en la posición 30. Tal secuencia de polipéptidos puede comprender adicionalmente un resto de metionina en la posición 50 y/o un resto de lisina en la posición 54.

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

Cualquier polipéptido de la divulgación que se ha descrito anteriormente puede incluir adicionalmente un péptido que facilita la secreción de dicho polipéptido. Por lo tanto, en el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende (a) cualquier polipéptido como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante que se ha descrito anteriormente), y (b) un péptido que facilita la secreción del polipéptido expresado a partir de una célula hospedadora. El péptido es opcionalmente un péptido señal. El extremo C-terminal del péptido señal generalmente está unido con enlace covalente al extremo N-terminal del polipéptido. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO: 216. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácido 1-35, 1-36, o 1-37 de la SEQ ID NO: 160.

Cualquier polipéptido de la divulgación que se ha descrito anteriormente puede incluir adicionalmente un dominio transmembrana y/o dominio citoplasmático. Por lo tanto, en el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende (a) cualquier polipéptido de la divulgación que se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante que se ha descrito anteriormente), y (b) un dominio transmembrana. Tal proteína puede de forma opcional puede comprender adicionalmente un péptido señal como se ha descrito anteriormente, en el que el extremo C-terminal del péptido señal se une de forma covalente al extremo N-terminal del polipéptido de la divulgación. El extremo C-terminal del péptido señal generalmente está unido con enlace covalente al extremo N-terminal del dominio transmembrana. El extremo C-terminal del dominio transmembrana generalmente está unido con enlace covalente al extremo N-terminal del dominio citoplasmático. En algunos casos, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de aminoácidos que comprende restos de aminoácido 162-182 de la SEQ ID NO: 160. En algunos casos, el dominio citoplasmático comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de aminoácidos que comprende los restos de aminoácido 183-223 de la SEQ ID NO: 160. Cualquiera de los polipéptidos que se han descrito anteriormente puede comprender una o más de los restos de aminoácido que están glicosilados o pegilados.

En el presente documento también se desvelan multímeros de polipéptido aislado o recombinante que comprenden dos o más polipéptidos, en los que al menos uno de los polipéptidos del multímero es un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación como se describe en el presente documento (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante). Un multímero de ese tipo comprende al menos un polipéptido de la divulgación y puede comprender adicionalmente al menos un polipéptido adicional que no es necesario que sea un polipéptido de la divulgación. Por ejemplo, el multímero puede comprender al menos un polipéptido de la divulgación y al menos otro polipéptido que puede ser, por ejemplo, un polipéptido de tipo silvestre (por ejemplo, el ECD de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig) y/o al menos otro polipéptido mutante (tal como un polipéptido mutante que no es un polipéptido de la invención). Algunos o todos de los polipéptidos en el multímero (o polipéptido multimérico) pueden ser idénticos entre sí, o, en algunos casos, todos los polipéptidos en el multímero pueden ser diferentes entre sí. En algunos casos, el multímero de polipéptido es un dímero que comprende dos polipéptidos de la divulgación, que opcionalmente pueden ser polipéptidos idénticos (es decir, homodímero) o polipéptidos diferentes (es decir, heterodímero). En algunos casos, el multímero de polipéptido es un tetrámero que comprende cuatro polipéptidos de la divulgación. El tetrámero puede comprender cuatro polipéptidos idénticos (es decir, homotetrámero) o cualquier combinación de cuatro polipéptidos de la divulgación de modo que al menos un polipéptido no sea idéntico a los otros tres polipéptidos (es decir, heterotetrámero). En el presente documento también se desvela un tetrámero que comprende cuatro polipéptidos de ECD de CTLA-4 de WT idénticos (por ejemplo, el ECD de hCTLA-4) o cuatro CTLA-4-Ig de WT idénticos (por ejemplo, hCTLA-4-Ig). En algunos casos, el multímero es capaz de unirse a CD80 y/o CD86 (o a un ECD de cualquiera o ambos) y/o suprimir o inhibir una respuesta inmunológica en métodos *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, proliferación o activación de linfocitos T, producción de citoquinas, etc.). Algunos de tales multímeros tienen una capacidad mayor para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica *in vitro* y/o *in vivo* que hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig (por ejemplo, proteína hCTLA-4-IgG2 u Orenzia®). Los polipéptidos de los multímeros se pueden unir en conjunto, tal como mediante enlaces covalentes, tal como mediante enlaces disulfuros entre uno o más restos de cisteína en el uno o más polipéptidos.

Algunos de tales tetrámeros de la divulgación comprenden una estructura esquemáticamente similar a la de un anticuerpo, pero en la que cada uno de los dominios variables del anticuerpo está reemplazado con cualquier polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación que se describe en el presente documento. La cadena pesada de un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) fusionado con un dominio CH1 de inmunoglobulina (Ig) (por ejemplo, CH1 de IgG2), que está fusionado con una bisagra. La bisagra que está fusionada con un dominio CH2 de Ig (por ejemplo, CH2 de IgG2), que está fusionada con un dominio CH3 de Ig (por ejemplo, CH3 de IgG2). La cadena ligera de un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) fusionado con un dominio C kappa (C_K) o C lambda (C_λ) de Ig. Dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras se unen con enlace covalente en conjunto mediante uno o más enlaces disulfuro formados mediante restos de cisteína en las cadenas pesada y ligera. En el presente documento también se desvela un tetrámero de CTLA-4 mutante en el que cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras se reemplaza con un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación. Por lo tanto, tal tetrámero comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante fusionado a un dominio C_K o C_λ de Ig. Cada cadena pesada comprende un ECD de CTLA-4 mutante fusionado con un dominio CH1 de Ig (por ejemplo, CH1 de IgG2), que está fusionado con una bisagra. La bisagra que está fusionada con un dominio CH2 de Ig (por ejemplo, CH2 de IgG2), que está fusionada con un dominio CH3 de Ig (por ejemplo, CH3 de IgG2). Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras están unidas con enlace covalente en conjunto con una o más enlaces disulfuro formados mediante restos de cisteína en las cadenas pesada y ligera. Tal tetrámero se puede describir como un tetrámero de CTLA-4-Ig. Se conocen métodos para la construcción de tal tetrámero de CTLA-4-Ig y podrían ser comprendidos por alguien con una experiencia habitual en la materia. Una construcción de CD4-Ig tetramérica, que comprende un polipéptido CD4 y que neutraliza aislados de tipo 1 de VIH primario, se describe en Allaway, G.P. *et al.*, AIDS Res. Hum. Retroviruses 11 (5): 533-9 (1995). El tetrámero puede comprender cuatro polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante idénticos o cualquier combinación de cuatro polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación de modo que al menos un ECD de CTLA-4 mutante no es idéntico a los otros tres polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante. Algunos de tales tetrámeros son capaces de unirse a CD80 y/o CD86 con una avidez de unión más elevada que hCTLA-4 (o hCTLA-4-Ig). Algunos de tales tetrámeros son capaces de suprimir o inhibir una respuesta inmunológica; en algunos casos, uno tetrámero de ese tipo tiene una capacidad más elevada para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica en ensayos *in vitro* o aplicaciones *in vivo* (por ejemplo, proliferación o activación de linfocitos T, producción de citoquinas, etc) que hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2 u Orenzia®). Se espera que los multímeros de la divulgación tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones, incluyendo métodos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes, y métodos para inhibir el trasplante de órgano, célula o injerto de tejido.

En el presente documento también se desvelan multímeros conjugados aislados o recombinantes que comprenden dos o más conjugados, en los que al menos uno de los conjugados es un conjugado de la divulgación que comprende un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación (por ejemplo, un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante). Algunos o todos de los conjugados en el multímero pueden ser idénticos entre sí, o todos los conjugados en el multímero pueden ser diferentes entre sí. En algunos casos, el multímero de conjugado es un dímero que comprende dos conjugados o un tetrámero que comprende cuatro conjugados de la divulgación. Algunos de tales multímeros de conjugados son capaces de unirse a CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera o ambos) y/o suprimir o inhibir una respuesta inmunológica *in vitro* y/o *in vivo*. Las moléculas de conjugados en multímeros se pueden unir

en conjunto, tal como mediante enlaces covalentes, tal como mediante enlaces disulfuro entre uno o más restos de cisteína en el uno o más conjugados.

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

En el presente documento se desvelan dímeros de polipéptido aislado o recombinante que comprenden dos polipéptidos de la divulgación que se han descrito anteriormente (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante que se ha descrito anteriormente), en el que el dímero tiene una avidéz de unión hacia hCD80 o un ECD del mismo que es aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de un dímero que comprende dos polipéptidos de ECD de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 159) para hCD80 o un ECD del mismo, respectivamente.

En algunos casos, el dímero tiene una avidéz de unión hacia hCD80 o un ECD del mismo que es aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de un dímero que comprende dos polipéptidos de ECD de hCTLA-4 para hCD80 o un ECD del mismo, respectivamente. En algunos casos, el dímero tiene una avidéz de unión hacia hCD86 o un ECD del mismo que es mayor de la avidéz de unión un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y para hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 168. En algunos casos, el dímero se disocia de la unión a hCD86 o un ECD del mismo a una tasa que es inferior a la tasa a la que un dímero que comprende dos polipéptidos de ECD de hCTLA-4 se disocia de la unión a hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente. En algunos casos, el dímero se disocia de la unión a hCD86 o un ECD del mismo a una tasa que es inferior a la tasa a la que un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y se disocia de la unión a hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 168.

En algunos casos, el dímero se asocia con hCD86 o un ECD del mismo a una tasa que es mayor que la tasa a la que un dímero que comprende dos polipéptidos de ECD de hCTLA-4 se asocia con hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente. En algunos casos, el dímero se asocia con hCD86 o un ECD del mismo a una tasa que es mayor que la tasa a la que un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y se asocia con hCD86 o un ECD del mismo, respectivamente, en el que cada polipéptido LEA29Y comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 168.

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

Algunos de tales dímeros tienen una constante de disociación en equilibrio (K_D) de CD86 que es menor que la constante de disociación en equilibrio (K_D) de CD86 de un dímero que comprende dos ECD de polipéptidos hCTLA-4 o dos polipéptidos LEA29Y. Algunos de tales dímeros tienen una constante de disociación en equilibrio (K_D) de CD86 que es menor que la constante de disociación en equilibrio (K_D) de CD86 de un dímero que comprende dos polipéptidos LEA29Y, cada polipéptido LEA29Y comprendiendo la secuencia de polipéptidos que se presenta en la SEQ ID NO: 168.

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

Cualquier polipéptido de la divulgación que se ha descrito anteriormente puede incluir adicionalmente una secuencia de polipéptidos adicional que aumenta la solubilidad, tal como una secuencia de polipéptidos de inmunoglobulina (Ig), formando de ese modo, por ejemplo, una proteína de fusión soluble, tal como se discute con más detalle a continuación. Cada polipéptido de un multímero polipeptídico puede comprender adicionalmente una secuencia de polipéptidos adicional que aumenta la solubilidad, tal como una secuencia de polipéptidos de Ig, formando de ese modo, por ejemplo, una proteína de fusión soluble. Por lo tanto, por ejemplo, cada polipéptido de un dímero que comprende dos o más polipéptidos de la divulgación, como se ha descrito anteriormente, puede comprender adicionalmente una secuencia de polipéptidos adicional que aumenta la solubilidad, tal como una secuencia de polipéptidos de Ig, formando de ese modo, por ejemplo, una proteína de fusión soluble.

Se espera que tales polipéptidos y dímeros de la divulgación tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones,

incluyendo métodos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes, y métodos para inhibir el trasplante de órgano, célula o injerto de tejido.

5 Como se ha discutido anteriormente, la secuencia de proteínas de hCTLA-4 maduro generalmente comienza con el resto de metionina en la posición 38 del aminoácido de la secuencia de proteínas de hCTLA-4 de longitud completa que se muestra en la SEQ ID NO: 160, y los restos de aminoácido de la secuencia de proteínas de hCTLA-4 maduro generalmente se numeran comenzando con este resto de metionina como el primer aminoácido (es decir, ocupando la posición 1 del aminoácido).

10 Algunos polipéptidos de CTLA-4 mutante de la divulgación (incluyendo proteínas de fusión monoméricas y diméricas y polipéptidos multiméricos) incluyen al menos una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido que corresponde a una posición de aminoácido en la secuencia de proteínas de hCTLA-4 maduro que está fuera de la superficie de contacto de unión de hCTLA-4/hB7-2 clásica (véase, por ejemplo, Schwartz *et al.*, Nature 410: 604-608 (2001)), que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cualquiera de las posiciones 24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70, y 85 del aminoácido. En general, alguien con una experiencia vital en la materia no tendría que quere decir que una sustitución de aminoácido en cualquiera de las posiciones que se han mencionado anteriormente ac (24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70, y/o 85) o cualquier combinación de una o más sustituciones seleccionadas entre el grupo de posiciones 24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70, y 85 podría tener una capacidad de aumentar la afinidad o avidez de unión de hCTLA-4 hacia hB7-2, podría tener un aumento de la capacidad para inhibir la interacción de células positivas para CD28 con células positivas para B7-2, o podría proporcionar una capacidad más elevada para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica que, por ejemplo, el ECD de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas, inducción de marcadores de activación, síntesis o producción de moléculas inflamatorias, producción de anticuerpos anti-colágeno, respuesta de anticuerpo dependiente de los linfocitos T, y similares). Además, alguien con experiencia habitual en la materia podría no tener que predecir que una sustitución o sustituciones de aminoácido particular o combinación de sustituciones de aminoácido particular que se describen en el presente documento en cualquiera de las posiciones que se han mencionado anteriormente (24, 41, 54, 55, 56, 64, 65, 70, y/o 85) o cualquier combinación de tales posiciones podría tener una capacidad para aumentar la afinidad o avidez de unión de hCTLA-4 hacia hB7-2, podría tener un aumento de la capacidad para inhibir la interacción de células positivas para CD28 con células positivas para B7-2, o podría proporcionar una capacidad más elevada para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica que, por ejemplo, el ECD de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig.

Proteínas de Fusión de CTLA-4 Mutante

35 También se desvelan nuevas proteínas de fusión aisladas y recombinantes que comprenden un primer polipéptido que es al menos uno de los polipéptidos de la divulgación que se han descrito anteriormente y en lo sucesivo (tal como un polipéptido CTLA-4 mutante de la divulgación, tal como, por ejemplo, un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante) unido o fusionado a un segundo polipéptido, formando de ese modo una proteína de fusión. El segundo polipéptido generalmente facilita la secreción o expresión del primer polipéptido. Los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo incluyen los que comprenden las secuencias identificadas como las SEQ ID NOS: 1-73. También se desvelan proteínas de fusión que comprenden dominios de inmunoglobulina (Ig), tales como dominios de Fc de Ig, fusionados o unidos a restos activos biológicos, tales como polipéptidos de CTLA-4 mutante de la divulgación. Se cree que las proteínas de fusión de la divulgación son útiles como agentes profilácticos y/o terapéuticos para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de diversas enfermedades y trastornos y aflicciones del sistema inmunológico en los que la inmunomodulación y/o inmunosupresión es beneficiosa, en ensayos de diagnóstico, y para la preparación de medicamentos o agentes que tienen actividades o propiedades de inmunomodulación y/o inmunosupresión como se discute con más detalle en cualquier parte en el presente documento.

50 Las proteínas de fusión de la divulgación que comprenden un polipéptido CTLA-4 mutante y un polipéptido de Ig (por ejemplo, Fc de Ig) por lo general se denominan proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante. Cualquiera de las proteínas de fusión de la divulgación, incluyendo proteínas de fusión monoméricas y diméricas de la divulgación que se describen con mayor detalle a continuación y en los Ejemplos, pueden comprender como polipéptido de Ig, tal como, por ejemplo, un polipéptido de Fc de Ig, como se describe en el presente documento y en cualquier parte en mencionada anteriormente y a continuación. El segundo polipéptido se puede unir directamente al primer polipéptido. Por ejemplo, el extremo N-terminal del segundo polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de Ig, tal como un polipéptido de Fc de Ig) se puede fusionar con enlace covalente directamente al extremo C-terminal del primer polipéptido de la divulgación (por ejemplo, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante). Como alternativa, el segundo polipéptido se puede unir indirectamente al primer polipéptido, tal como cuando una secuencia de aminoácidos del conector que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más restos de aminoácido está incluida entre el primer y segundo polipéptidos. En los casos en los que se incluye un conector, el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos del conector por lo general se fusiona con enlace covalente con el extremo C-terminal del primer polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante), y el extremo N-terminal del segundo polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de Ig, tal como un Fc de Ig) por lo general se fusiona con enlace covalente con el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos del conector.

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

En el presente documento se desvelan nuevas proteínas de fusión aisladas y recombinantes cada una de las cuales comprende un polipéptido de CTLA-4 mutante aislado o recombinante de la divulgación que se ha descrito anteriormente (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) unido con enlace covalente o fusionado, ya sea directa o indirectamente (mediante una secuencia de conector de aminoácido), en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de Ig, es decir, el dominio Fc de un polipéptido de Ig. Cualquiera de las proteínas de fusión de la divulgación, incluyendo proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas y diméricas de la divulgación que se describen con mayor detalle a continuación y en los Ejemplos, pueden comprender cómo polipéptido de Fc de Ig como se describe en el presente documento y en cualquier parte en mencionada anteriormente y a continuación. Un polipéptido de Fc de Ig por lo general comprende la región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 del polipéptido de Ig. El polipéptido de Fc de Ig se puede obtener a partir de diversas especies, incluyendo, por ejemplo, ser humano, ratón, primate, etc., y pueden comprender un polipéptido de Fc de Ig de tipo silvestre (por ejemplo, IgG1, IgG2, o IgG4 de WT). Los polipéptidos de Fc de IgG humano a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, IgG1 humana, IgG2 humana, IgG4 humana, etc. La secuencia de polipéptidos de Fc de IgG1 humano a modo de ejemplo se presenta en la SEQ ID NO: 185. Las secuencias de polipéptidos de Fc de IgG2 humano a modo de ejemplo se presentan en las SEQ ID NOS: 184 y 218, respectivamente. Como alternativa, el polipéptido de Fc de Ig puede comprender un polipéptido de Ig mutante. Por ejemplo, un Fc de IgG1 mutante en el que uno o más restos de cisteína se han sustituido con otro aminoácido (por ejemplo, un resto de serina), eliminando de ese modo uno o más enlaces disulfuro formados entre dos cadenas de Ig, o en el que uno o más restos de prolina está sustituido con otro aminoácido (por ejemplo, prolina) para reducir la función efectora (unión al receptor Fc reducida), se puede incluir en una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante. La secuencia de polipéptidos de un polipéptido de Fc de IgG1 mutante a modo de ejemplo se muestra en la SEQ ID NO: 186. En el presente documento se desvela una proteína de fusión aislada o recombinante, tal como un dímero de CTLA-4-Ig mutante o monómero de CTLA-4-Ig mutante, que comprende al menos un polipéptido de CTLA-4 mutante recombinante que se ha descrito anteriormente unido en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de Ig recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184 (polipéptido de Fc de IgG2 humano), 185 (polipéptido de Fc de IgG1 humano), 186 (polipéptido de Fc de IgG1 mutante), y 218 (polipéptido de Fc de IgG2 humano sin resto de lisina C-terminal (K)).

En un aspecto, la secuencia de polipéptidos predicha de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación comprende los siguientes segmentos: una secuencia de péptido señal que facilita la secreción de la proteína de fusión (por ejemplo, péptido señal de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO: 216)); un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante que por lo general, pero no necesariamente, comprende de aproximadamente 118 a 130 restos de aminoácido, y normalmente una longitud de aproximadamente 124 restos de aminoácido; y un polipéptido de Fc de Ig. Los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo incluyen los que se han descrito anteriormente y que se describen a continuación. En algunos casos, ninguna secuencia de conector de aminoácido está incluida entre el extremo C-terminal del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante y el extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig humana; es decir, el extremo C-terminal de un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante se fusiona con enlace covalente directamente al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig en la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante. Si se desea, sin embargo, un CTLA-4-Ig mutante puede incluir un conector (por ejemplo, uno o más restos de aminoácido) entre el extremo C-terminal del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante y el extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig humana. El péptido señal de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante monomérica predicha de la divulgación por lo general se escinde del extremo N-terminal de la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante durante el procesamiento y por lo tanto la forma madura o secretada de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación normalmente no incluye una secuencia de péptido señal. Un dímero de proteína de fusión que comprende dos de tales proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas se forma generalmente durante el procesamiento celular mediante la creación de enlaces disulfuro covalentes entre (1) restos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y el Fc de IgG2 de una de tales proteínas de fusión monoméricas y (2) restos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y el Fc de IgG2 de la segunda (por lo general, pero no necesariamente idénticos) proteína de fusión monomérica.

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión diméricas (también denominado dímero de proteína de fusión) cada una de las cuales comprende dos proteínas de fusión monoméricas de la divulgación. El dímero puede

comprender dos proteínas de fusión monoméricas idénticas o diferentes. La proteína de fusión dimérica está formada por una unión o uniones entre las dos proteínas de fusión monoméricas. Una proteína de fusión dimérica que comprende dos de tales proteínas de fusión monoméricas por lo general se forma durante el procesamiento celular mediante la generación de enlaces disulfuro covalentes entre restos de cisteína en una proteína de fusión monomérica y restos de cisteína en la segunda proteína de fusión monomérica. Por lo tanto, en algunos casos, una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación se expresa como un dímero que comprende dos proteínas de fusión monoméricas de la divulgación.

En el presente documento se desvela una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante dimérica aislada o recombinante que comprende dos proteínas de fusión monoméricas, en la que cada proteína de fusión monomérica comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación, como se ha descrito anteriormente con detalle y con detalles adicionales a continuación, fusionada en su extremo C-terminal con un polipéptido de Fc de Ig. El dímero se forma durante el procesamiento celular mediante la generación de enlaces disulfuro covalentes entre restos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y el Fc de Ig de una proteína de fusión monomérica y restos de cisteína en el ECD de CTLA-4 mutante y el Fc de Ig de la segunda proteína de fusión monomérica. Las dos proteínas de fusión monoméricas por lo general, pero no necesariamente, comprenden secuencias idénticas. La forma secretada o madura de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante no incluye un péptido señal, ya que el péptido señal por lo general se escinde del extremo N-terminal de la proteína durante el procesamiento. La proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante predicha incluye un péptido señal, cuyo extremo C-terminal generalmente está unido con enlace covalente al extremo N-terminal de la proteína CTLA-4-Ig mutante. El extremo N-terminal de cada monómero de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante madura por lo general comprende una metionina (M).

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión diméricas que comprenden dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig monoméricas, en las que cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante monomérica comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante unido en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de Ig, en las que el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-73. En algunas de tales proteínas de fusión diméricas, las dos proteínas de fusión monoméricas se unen con enlace covalente en conjunto mediante un enlace disulfuro covalente formado durante el procesamiento celular entre un resto de cisteína en la posición 120 en cada secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante. Como alternativa, o además, las dos proteínas de fusión monoméricas se unen con enlace covalente en conjunto con un enlace disulfuro covalente formado entre uno o más restos de cisteína en el polipéptido de Fc de Ig de la primera proteína de fusión monomérica y uno o más restos de cisteína en el polipéptido de Fc de Ig de la segunda proteína de fusión monomérica. Las proteínas de fusión monoméricas se puede unir en conjunto mediante múltiples enlaces disulfuro (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, o más enlaces disulfuro) formados durante el procesamiento celular entre restos de cisteína presentes en sus respectivos polipéptidos de Fc de Ig. En algunos casos, cada proteína de fusión monomérica está formada por el mismo polipéptido de Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2 humano, tal como se muestra en, por ejemplo, la SEQ ID NO: 184 o 218), y se pueden generar enlace o enlaces disulfuro covalentes durante el procesamiento celular entre restos de cisteína en posiciones equivalentes en cada polipéptido de Fc de Ig.

Un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo es el polipéptido D3-12 de ECD de CTLA-4 mutante que comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 11. Una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo de la divulgación es el polipéptido D3-12 de ECD de CTLA-4 mutante unido con enlace covalente o fusionado directamente (sin conector) en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de IgG2 humano que se muestra en la SEQ ID NO: 218, formando de ese modo la proteína de fusión de D3-12-IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 205, o unido con enlace covalente o fusionado directamente (sin conector) en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de IgG2 humano que se muestra en la SEQ ID NO: 184, formando de ese modo la proteína de fusión de D3-12-IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 74. La secuencia de la SEQ ID NO: 74 se diferencia de la de la SEQ ID NO: 205 en un resto - es decir, un resto de lisina adicional está presente en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 74. Los inventores han encontrado por vía experimental mediante análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LCMS), o similares, de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig madura preparada en células CHO mediante transfección de un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ECD de CTLA-4 mutante, tal como, por ejemplo, la secuencia de polipéptidos de ECD de D3-12 que se muestra en la SEQ ID NO: 11, y el polipéptido de Fc de hIgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 184 por lo general no incluye el resto de lisina (K) C-terminal predicho, como se podría esperar basándose en la secuencia de Fc de hIgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 184.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 153 codifica el péptido señal de hCTLA-4 y la proteína de fusión de D3-12-IgG2 e incluye el codón de parada TAA en su extremo C-terminal. El codón AAA, que codifica un resto de lisina, precede inmediatamente al codón de parada TAA en la secuencia de la SEQ ID NO: 153. La secuencia de polipéptidos predicha de una proteína de fusión de D3-12-IgG2 madura producida por transfección de un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 153 en células CHO se muestra en la SEQ ID NO: 74. El péptido señal está ausente en la forma madura de la proteína de fusión de D3-12-IgG2, ya que se ha escindido durante el procesamiento para formar la proteína de fusión madura. Sin embargo, los inventores han encontrado, basándose en análisis de LCMS, que en tal caso la D3-12-IgG2 madura por lo general no incluye el resto de lisina C-terminal predicho, como se podría esperar basándose en la secuencia de nucleótidos

de la SEQ ID NO: 153. En su lugar, la secuencia de polipéptidos de D3-12-IgG2 madura resultante producida por un método de ese tipo es la que se muestra en la SEQ ID NO: 205. Se cree que la lisina C-terminal del polipéptido de Fc de IgG2 se escinde durante el procesamiento o antes de la secreción.

- 5 Se cree que la producción de proteína D3-12-IgG2 usando otra línea celular de mamífero mediante transfección de un vector de ese tipo que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 153 en tal célula de mamífero (por ejemplo, células COS y similares) podría producir una proteína de fusión de D3-12-IgG2 similar que careciera del resto de lisina C-terminal predicho en virtud de la maquinaria análoga de procesamiento o secreción.
- 10 La proteína de fusión de D3-12-IgG2 dimérica comprende dos de tales monómeros D3-12-IgG2 unidos en conjunto mediante uno o más enlaces disulfuro formados durante el procesamiento celular mediante la generación de enlaces disulfuro covalentes entre restos de cisteína. D3-12-IgG2 y otras proteínas de fusión de la divulgación se pueden preparar, por ejemplo, usando métodos que se presentan en el Ejemplo 3. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido D3-12 (por ejemplo, SEQ ID NO: 90) se puede clonar en el vector de fusión de
- 15 Fc de IgG2, las células de mamífero se pueden transfectar con el vector, y la proteína de fusión resultante se puede expresar (por lo general en forma dimérica), purificar y evaluar como se describe en el Ejemplo 3.

Otro polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo es el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante D3-54 que comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 36, y una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo comprende el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante D3-54 unido con enlace covalente fusionado directamente (sin conector) en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de hIgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 218 (sin la C-terminal lisina), formando de ese modo la proteína de fusión de D3-54-IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 211, o unido con enlace covalente fusionado directamente (sin conector) en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de hIgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 184 (con la C-terminal lisina), formando de ese modo la proteína de fusión de D3-54-IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 197. Como se ha discutido anteriormente, el análisis experimental indica que la proteína de fusión de D3-54-IgG2 madura preparada en células CHO por lo general no incluye el resto de lisina C-terminal predicho. Se cree que la lisina C-terminal de Fc de hIgG2 se escinde durante el procesamiento o antes de la secreción, dando como resultado la secuencia de la proteína de fusión de D3-54-IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 211. Además,

20 como se ha indicado anteriormente, D3-29-IgG2 se puede preparar usando métodos del Ejemplo 3. La proteína de fusión de D3-54-IgG2 dimérica comprende dos monómeros de D3-54-IgG2 unidos en conjunto mediante uno o más enlaces disulfuro formados durante el procesamiento celular mediante la generación de enlaces disulfuro covalentes entre restos de cisteína. La secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID NO: 201 codifica las proteínas de fusión que se muestran en las SEQ ID NOS: 197 y 211.

25

30

Otras proteínas de fusión de la divulgación del mismo modo pueden comprender un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante unido o fusionado a hIgG2 (SEQ ID NO: 218 o 184). Las proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante maduras a modo de ejemplo de la divulgación incluyen, por ejemplo, las secuencias de polipéptidos de cada una de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222. Cada una de las secuencias de polipéptidos de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 220, y 222 incluye un resto de lisina C-terminal; este resto de lisina C-terminal por lo general se escinde durante el procesamiento o antes de la secreción, dando como resultado las secuencias de polipéptidos sin la lisina C-terminal que se muestra en las SEQ ID NOS: 205-210, 211-214, 219, y 221, respectivamente.

35

40

La Figura 10 es un diagrama esquemático que muestra una configuración o estructura a modo de ejemplo de una proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante a modo de ejemplo de la divulgación. Dos proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante monoméricas idénticas se muestran de forma esquemática, cada una comprendiendo un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante maduro unido con enlace covalente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG2 humana. Cada polipéptido de IgG2 humana incluye una bisagra de IgG2 humana, dominio CH2, y dominio CH3. También se muestran restos de aminoácido a modo de ejemplo presentes en las uniones entre el ECD y polipéptidos de Fc de Ig. Los restos de aminoácido en las uniones entre estos componentes se puede diferenciar dependiendo de la secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante y/o secuencia de polipéptidos de Ig.

45

50

Esta proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante dimérica resulta de la formación de al menos un enlace disulfuro entre restos de cisteína en posiciones análogas en los dos monómeros de proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante. Los restos de cisteína (C) implicados potencialmente en la formación de enlaces disulfuro entre los dos monómeros se marcan con asteriscos. El péptido señal de cada proteína de fusión monomérica por lo general se escinde durante el procesamiento y de ese modo la proteína de fusión secretada (madura) generalmente no incluye la secuencia del péptido señal.

55

La secuencia de polipéptidos del polipéptido de IgG2 humana, que comprende la bisagra, dominio CH2, y dominio CH3 de IgG2 humana, se muestra en la SEQ ID NO: 184. En un aspecto alternativo, la secuencia de polipéptidos del polipéptido de IgG2 humana, que comprende la bisagra, dominio CH2, y dominio CH3 de IgG2 humana, se muestra en la SEQ ID NO: 218; en este caso, el polipéptido de IgG2 no incluye del resto de lisina (K) C-terminal, en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 184.

60

Las propiedades de las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación, que se describen con detalle en cualquier parte, se pueden comparar con las propiedades de una o más proteínas de fusión de Ig de referencia, tal

65

como, por ejemplo, hCTLA-4-IgG1, hCTLA-4-IgG2, proteína de fusión Orenicia®, y LEA29Y-Ig. Las propiedades que se pueden comparar incluyen, por ejemplo, capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas, etc.). La proteína de fusión de hCTLA-4-IgG1 madura por lo general existen solución como un dímero de proteína de fusión de hCTLA-4-IgG1 que comprende dos proteínas hCTLA-4-IgG1 monoméricas idénticas, cada proteína de fusión de hCTLA-4-IgG1 monomérica comprendiendo un polipéptido de ECD de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 159) unido a un polipéptido de Fc de IgG1. La proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2 madura por lo general existen solución como un dímero de proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2 que comprende dos proteínas de hCTLA-4-IgG2 monoméricas idénticas, cada proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2 monomérica (SEQ ID NO: 162) comprendiendo un polipéptido de ECD de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 159) unido a un polipéptido de Fc de IgG2. La proteína de fusión madura Orenicia® es un dímero de proteína de fusión que comprende dos proteínas de fusión de Orenicia® monoméricas idénticas, cada proteína de fusión monomérica (SEQ ID NO: 164) comprendiendo un polipéptido de ECD de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 159) unido a un polipéptido de IgG1 mutante específico (SEQ ID NO: 186). La proteína de fusión de LEA29Y-Ig madura por lo general existen solución como un dímero de proteína de fusión LEA29Y-Ig que comprende dos proteínas de fusión de LEA29Y-Ig monoméricas idénticas, cada proteína de fusión de LEA29Y-Ig monomérica (SEQ ID NO: 166) comprendiendo un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante específico (SEQ ID NO: 168) unido a un polipéptido de IgG1 mutante específico (SEQ ID NO: 186). Se cree que los dos monómeros de la proteína de fusión del dímero Orenicia® están unidos con enlace covalente en conjunto mediante un solo enlace disulfuro formado entre el resto de cisteína en la posición 120 de cada monómero de hCTLA-4-IgG1 y que no se forman enlaces disulfuro entre los dos polipéptidos de Fc de IgG1 mutante.

Algunas proteínas de fusión CTLA-4 mutantes se unen a CD80 (por ejemplo, hCD80) y/o CD86 (por ejemplo, hCD86). Algunas de tales proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante se unen a una proteína de fusión de CD80-Ig y/o una proteína de fusión de CD86-Ig. Las proteínas de fusión de CD80-Ig a modo de ejemplo incluyen la proteína de fusión de hCD80-mIg (SEQ ID NO: 225), que comprende un ECD de CD80 humano unido a un polipéptido de Fc de Ig de murino; y la proteína de fusión de hCD80-hIgG1 (SEQ ID NO: 171), que comprende la secuencia de ECD de hCD80 unido a polipéptido de Fc de IgG1 humano. Las proteínas de fusión de CD86-Ig a modo de ejemplo incluyen la proteína de fusión de hCD86-mIg (SEQ ID NO: 226), que comprende un ECD de hCD86 (SEQ ID NO: 180) unido a un polipéptido de Fc de Ig de murino; y la proteína de fusión de hCD86-hIgG1 madura (SEQ ID NO: 178), que comprende la secuencia de ECD de hCD86 (SEQ ID NO: 180) unida al polipéptido de Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO: 185). Las secuencias de ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican las proteínas de fusión de hCD86-mIg y hCD80-mIg se muestran en las SEQ ID NOS: 227 y 228, respectivamente.

En el presente documento se desvela una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, y (b) un polipéptido de Fc de Ig (por ejemplo, Fc de hIgG2), en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86, y/o CD80-Ig y/o proteína de fusión de CD86-Ig, y/o presenta una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica. El polipéptido de Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene densidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo de la SEQ ID NO: 184, 185, 186, y 218. En algunos casos, el extremo C-terminal del polipéptido de (a) se une con enlace covalente al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig de (b). Algunas de tales proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante se unen a un CD80 y/o CD86 de mamífero (por ejemplo, hCD80 y/o hCD86), y/o una proteína de fusión de CD80-Ig y/o CD86-Ig. Un CD80-Ig puede comprender, por ejemplo, un ECD de CD80 humano unido a un Fc de Ig (por ejemplo, hCD80-Ig). En una realización, un hCD80-Ig es un ECD de CD80 humano unido a un Fc de Ig humana (hCD80-hIg); en otra realización, un hCD80-Ig es un ECD de CD80 humano unido a un Fc de Ig de murino (hCD80-mIg). En una realización, un hCD86-Ig es un ECD de CD86 humano unido a un Fc de Ig humana (hCD86-hIg); en otra realización, un hCD86-Ig es un ECD de CD86 humano unido a un Fc de Ig de murino (hCD86-mIg). Algunas de tales proteínas de fusión tienen una capacidad para inhibir o suprimir una o más de diversas respuestas inmunológicas, tal como, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2) o moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta o respuestas de Ab dependientes de linfocitos T en ensayos y/o métodos *in vitro* y/o *in vivo*. Se espera que tales proteínas de fusión tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones, incluyendo métodos para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunológico (por ejemplo, enfermedades autoinmunes), y métodos para inhibir el trasplante de órgano, célula o injerto de tejido, como se discute a continuación.

En el presente documento se desvela un dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante aislada o recombinante que comprende dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas unidas mediante al menos un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína presentes en cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante monomérica. Cada monómero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante comprende: (a) un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, y (b) un polipéptido de Fc de Ig (por ejemplo, Fc de hIgG2), en el que el dímero de proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86, y/o

CD80-Ig y/o CD86-Ig, y/o presenta una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica. En algunos casos, el extremo C-terminal del polipéptido de (a) se une con enlace covalente o se fusiona al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig de (b). El polipéptido de Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 184-186 y 218. En algunos casos, el dímero de proteína de fusión se forma mediante un enlace disulfuro covalente entre un resto de cisteína en la posición 120 del aminoácido de cada secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante, o en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 120 en cada secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante con respecto a la secuencia de polipéptidos de ECD de hCTLA-4 que se muestra en la SEQ ID NO: 159. Algunos de tales dímeros de proteína de fusión tienen una capacidad para inhibir o suprimir una o más de diversas respuestas inmunológicas, tal como, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2) o moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta o respuestas de Ab dependientes de linfocitos T en ensayos y/o métodos *in vitro* y/o *in vivo*. Se espera que tales dímeros de proteína de fusión tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones, incluyendo métodos para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunológico (por ejemplo, enfermedades autoinmunes), y métodos para inhibir el trasplante de órgano, célula o injerto de tejido, como se discute a continuación.

Algunos de tales monómeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante tienen afinidades de unión hacia ECD de hCD86 o hCD86 que son al menos iguales o mayores que las del ECD de hCTLA-4 y LEA29 para ECD de hCD86 o hCD86, respectivamente. Véase, por ejemplo, la Tabla 5 en el Ejemplo 4.

El polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante presente en algunas de tales proteínas de fusión dimericas y monoméricas comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aminoácido aproximadamente igual a la longitud de aminoácido del ECD de hCTLA-4. Por ejemplo, algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aproximadamente 110 a 138, 112 a 136, 114 a 134, 116 a 132, 118 a 130, 119 a 129, 120 a 128, 121 a 127, 122 a 126, o 123 a 125 restos de aminoácido. Algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante comprenden una secuencia de 124 restos de aminoácido. Los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, los que comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en la que tal polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante se une al CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera o ambos), y/o tienen la capacidad para inhibir una respuesta inmunológica.

Algunos de tales dímeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante tienen una avidez de unión hacia hCD86 y/o hCD86-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidez de unión de un dímero de proteína de fusión de hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero de hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero de Orenicia®, y/o dímero LEA29Y-Ig para hCD86 y/o hCD86-Ig, respectivamente. Algunos de tales dímeros de proteína de fusión tienen una avidez de unión hacia hCD86 y/o hCD86-mlg que es 2-10 veces (2x-10x), 5-10 veces (5x-10x), 10-20 veces (10x-20x), 20-40 veces (20x-40x), o más de 40 veces (> 40x) > la avidez de unión del dímero de Orenicia® hacia hCD86 y/o hCD86-mlg. Véanse, por ejemplo, las proteínas de fusión dimericas de la divulgación a modo de ejemplo en la Tabla 3 que sigue a continuación. Como alternativa o adicionalmente, algunos de tales dímeros de proteína de fusión tienen una avidez de unión hacia hCD80 y/o hCD80-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidez de unión de un dímero de hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero de hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero de Orenicia®, y/o dímero LEA29Y-Ig para hCD80 y/o hCD80-Ig, respectivamente. Algunos de tales dímeros de proteína de fusión tienen una avidez de unión hacia hCD80 y/o hCD80-mlg que es 0,5-2 veces (0,5x-2x), 2-4 veces (2x-4x), o más de 2 veces (> 2x) > la avidez de unión del dímero de Orenicia® para hCD86 y/o hCD86-mlg. Véanse, por ejemplo, las proteínas de fusión dimericas de la divulgación a modo de ejemplo en la Tabla 4 que sigue a continuación.

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

Algunos de tales dímeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica (por ejemplo, inhibir la activación o proliferación de linfocitos T, inhibir la producción de citoquinas, etc.) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de un dímero de hCTLA-4-Ig (por ejemplo, dímero de hCTLA-4-IgG2 o hCTLA-4-IgG1), dímero de Orenzia®, y/o dímero LEA29Y-Ig para inhibir o suprimir dicha respuesta inmunológica, respectivamente. Por ejemplo, algunos de tales dímeros de proteína de fusión son capaces de inhibir la activación de los linfocitos T o la proliferación de los linfocitos T en ensayos *in vitro*. Los ejemplos 4-9 que se presentan a continuación, por ejemplo, demuestran la capacidad de los dímeros de proteína de fusión de la divulgación representativos que comprenden una secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante representativa para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro*. Algunos de tales dímeros son capaces de inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto *in vivo*, tal como a través de la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente cantidad eficaz de al menos uno de tal dímero a un sujeto con necesidad de terapia inmunosupresora. Se espera que algunos de tales dímeros de proteína de fusión sean útiles para diversas aplicaciones, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, métodos profilácticos y/o terapéuticos para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico en el que la inmunosupresión es deseable (por ejemplo, enfermedades autoinmunes) y métodos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula, u órgano de un donante por un receptor.

Algunos de tales dímeros tienen diversas capacidades para modular o suprimir la señalización a través de CD28, ya que tienen diferentes capacidades de avidéz comparativas para CD80 y CD86. Tales dímeros son útiles en aplicaciones en las que es deseable la manipulación diferencial de respuestas de los linfocitos T, incluyendo métodos terapéuticos y profilácticos para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunológico, tales como, por ejemplo, enfermedades y trastornos por inmunodeficiencia (por ejemplo, RA, MS, psoriasis, etc.). Las proteínas de fusión diméricas a modo de ejemplo que comprenden polipéptidos de la divulgación que tienen algunas de las capacidades de avidéz y propiedades inmunoinhibitorias de CD80/CD86 que se han descrito anteriormente se muestran en el Ejemplo 4.

Algunos de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de la proteína hCTLA-4 o un dímero de hCTLA-4-Ig para suprimir o inhibir uno o más tipos de respuestas inmunológicas. Por ejemplo, algunos de tales dímeros tienen una capacidad para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en ensayos y/o aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*, tal tales como las que se han descrito anteriormente y se describen a continuación, que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la capacidad de la proteína hCTLA-4 o un dímero de hCTLA-4-Ig (por ejemplo, Orenzia®, dímero de hCTLA-4-IgG2, o dímero de hCTLA-4-IgG1) para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T en las aplicaciones de ese tipo. Además, algunos de tales dímeros tienen una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas, respuesta de anticuerpo dependiente de los linfocitos T) que es mayor que la capacidad de un dímero LEA29Y-Ig para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica. Los ejemplos 4-9, por ejemplo, comparan la capacidad de proteínas de fusión de la divulgación diméricas representativas que comprenden una secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de hCTLA-4-IgG2 dimérica, Orenzia®, y LEA29Y-Ig para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro*. Véanse, por ejemplo, las Tablas 6-9 que siguen a continuación. Algunos de tales dímeros tienen tanto una capacidad para unirse a hCD80 y/o hCD86 (o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig) como una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en ensayos y/o aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*, tales como los que se han descrito anteriormente y se describen con mayor detalle a continuación (por ejemplo, un método *in vivo* en el que se administra una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de al menos uno de tales dímeros). Algunos de tales dímeros tienen una avidéz de unión hacia hCD80 y/o hCD86 (o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig) que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de la proteína hCTLA-4, una hCTLA-4-Ig dimérica (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2, Orenzia®) o LEA29Y-Ig dimérica para hCD80 y/o hCD86 (o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), respectivamente, y una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica que es al menos igual a o mayor que la capacidad de la proteína hCTLA-4, una hCTLA-4-Ig dimérica (por ejemplo, hCTLA-4-IgG2, Orenzia®) o LEA29Y-Ig dimérica para inhibir una respuesta inmunológica. Se espera que tales dímeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante sean útiles en diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, métodos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos, y afecciones del sistema inmunológico, tal como se discute con más detalle a continuación.

En el presente documento se desvela un dímero de proteína de fusión aislado o recombinante (por ejemplo, dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas (por ejemplo, dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas), en el que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222, en el que el dímero se une a CD80 y/o CD86 (y/o un CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mlg y/o hCD86-mlg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica, incluyendo los que se han descrito anteriormente y que se describen a continuación. Cada una de las secuencias de polipéptidos que se presentan en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222 es un ECD de CTLA-4 mutante maduro fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-

terminal de un polipéptido de Fc de IgG2, y cada una de tales secuencias se pueden denominar una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante. La secuencia de polipéptidos de cada una de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 220, y 222 es idéntica a las SEQ ID NOS: 205-214, 219, y 221, excepto porque cada una de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 220, y 222 incluye una lisina en el extremo C-terminal.

5 En el presente documento se desvela un monómero de proteína de fusión aislada o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 %, 10
o un 100 % con una secuencia de polipéptidos que comprende restos de aminoácido 1-351 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222, en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o un CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica, incluyendo los que se han descrito anteriormente y que se describen a continuación.

15 En el presente documento se desvela un dímero de proteína de fusión aislado o recombinante que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas, en el que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con una secuencia de polipéptidos que comprende restos de aminoácido 1-351 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222, en el que dicho dímero de proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o un CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica, incluyendo los que se han descrito anteriormente y que se describen a continuación.

25 En el presente documento se desvela una proteína de fusión de CTLA-4-Ig monomérica mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222, en el que dicha proteína de fusión monomérica se une a CD80 y/o CD86 (y/o un CD80-Ig y/o CD86-Ig, tal como hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, respectivamente), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica. Algunos de tales monómeros y dímeros de proteína de fusión tienen una capacidad para inhibir o suprimir una o más respuestas inmunológicas, incluyendo, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta o respuestas de Ab dependientes de linfocitos T) en ensayos y/o métodos *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, *in vivo* en un sujeto que padece una enfermedad, trastorno, o afección en el que una terapia inmunosupresora podría ser beneficiosa y al que se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de tal proteína de fusión dimerica como se discute con mayor detalle a continuación). Se espera que tales monómeros y dímeros de proteína de fusión sean útiles en diversas aplicaciones, incluyendo métodos terapéuticos y/o profilácticos para tratar enfermedades del sistema inmunológico, incluyendo los que se discuten a continuación.

40 En el presente documento se desvela un dímero de proteína de fusión aislado o recombinante (por ejemplo, dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante monomérica), en el que cada una de tal proteína de fusión monomérica comprende: (1) un polipéptido (por ejemplo, polipéptido de dominio extracelular de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 en no más de 6 restos de aminoácido (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5 o 6
45 restos de aminoácido), y en el que el resto de aminoácido en la secuencia de polipéptidos en la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 es idéntico al resto de aminoácido en la posición correspondiente de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, un polipéptido seleccionada entre las SEQ ID NOS: 1-73), y (2) un polipéptido de Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2), en el que el dímero de proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas, inducción de marcadores de activación o moléculas inflamatorias, producción de Ab anti-colágeno, respuesta de Ab dependiente de linfocitos T, etc.) en ensayos y/o métodos *in vitro* y/o *in vivo* como se discute con detalle a continuación. En el presente documento también se desvela una proteína de fusión monomérica una aislada o recombinante como se ha descrito anteriormente que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o induce una respuesta inmunológica *in vitro* o *in vivo*. En el dímero de proteína de fusión,
55 las dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, monómero de CTLA-4-Ig mutante) están opcionalmente unidas con enlace covalente en conjunto mediante uno o más enlaces disulfuro a través de restos de cisteína en cada monómero, y los dos monómeros generalmente son idénticos entre sí. En algunos casos, el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante en tal dímero o monómero de proteína de fusión se diferencia del polipéptido seleccionado (por ejemplo, seleccionado entre las SEQ ID NOS: 1-73) en no más de 6 restos de aminoácido, pero el aminoácido que ocupa la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 es idéntico al resto de aminoácido incluido en esa posición
60 en la secuencia de polipéptidos seleccionada; es decir, un resto de aminoácido en tal posición no puede sufrir delección o sustitución. Algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante en una proteína de fusión de ese tipo comprenden una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos seleccionada by no más de 6 restos de aminoácido y que incluye restos de aminoácido en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55,
65 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los restos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la secuencia de polipéptidos seleccionada. Tal polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante se puede diferenciar de la

secuencia de polipéptidos seleccionada por delección(s) de aminoácido, adición(s), y/o sustitución(s) de aminoácido. Una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución conservativa o no conservativa. Véase, por ejemplo, la sección "Variación de Secuencia". Algunas de tales proteínas de fusión diméricas tienen una avidéz de unión hacia hCD86 o hCD86-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de unión de hCTLA-4, hCTLA-4-Ig dimérica, LEA29Y-Ig dimérica, o proteína Orenicia® para hCD86 o hCD86-Ig, respectivamente. Algunas de tales proteínas de fusión monoméricas tienen una afinidad o avidéz de unión hacia hCD86, hCD86-Ig, o ECD de hCD86 que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidéz de unión del hCTLA-4 monomérico, hCTLA-4-Ig monomérica, o LEA29Y-Ig monomérico para hCD86, hCD86-Ig, o ECD de hCD86, respectivamente. Como alternativa o adicionalmente, algunas de tales proteínas de fusión diméricas tienen una avidéz de unión hacia hCD80 o hCD80-Ig que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la avidéz de hCTLA-4 o hCTLA-4-Ig hacia hCD80, respectivamente. Como alternativa o adicionalmente, algunas de tales proteínas de fusión monoméricas tienen una afinidad o avidéz de unión hacia hCD80, hCD80-Ig, o ECD de hCD80 que es al menos aproximadamente igual a o mayor que la afinidad o avidéz de unión de hCTLA-4 monomérico o hCTLA-4-Ig monomérica hacia hCD80, hCD80-Ig, o ECD de hCD80, respectivamente. En algunos casos, el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante en tal dímero o monómero de proteína de fusión comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud aproximadamente igual a la longitud del aminoácido del ECD de hCTLA-4, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126, 123-125, o 124 restos de aminoácido. El extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2, Fc de IgG1, Fc de IgG4, o un Fc de IgG mutante que reduce la función efectora o unión al receptor Fc) se puede unir con enlace covalente fusionar directa o indirectamente (a través de un conector que comprende, por ejemplo, de 1-10 restos de aminoácido) al extremo C-terminal del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante. El polipéptido de Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184-186 y 218, por ejemplo, cualquiera de la SEQ ID NO: 184, 185, 186, y 218.

Algunos de tales dímeros y monómeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante son capaces de suprimir una o más de diversas respuestas inmunológicas, incluyendo, por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2) o moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta o respuestas de Ab dependientes de linfocitos T. Algunos de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad mayor para inhibir una o más de tales respuestas inmunológicas que hCTLA-4, hCTLA-4-Ig dimérica, o LEA29Y-Ig dimérica. Los ejemplos 4-9, por ejemplo, proporcionan datos que comparan la capacidad de proteínas de fusión diméricas representativas de la divulgación que comprenden un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la invención para inhibir la proliferación de los linfocitos T *in vitro* con respecto a la capacidad de a hCTLA-4-Ig dimérica o LEA29Y-Ig dimérica para hacerlo de ese modo. Algunos de tales monómeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad mayor para inhibir una o más de tales respuestas inmunológicas que hCTLA-4 monomérico, hCTLA-4-Ig monomérica, o LEA29Y-Ig monomérica. Algunos de tales monómeros y dímeros son capaces de inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto *in vivo*, tal como a través de la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente cantidad eficaz de al menos uno de tales polipéptidos a un sujeto con necesidad de terapia inmunosupresora. Se espera que tales proteínas de fusión tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones, incluyendo métodos para tratar una enfermedad, trastorno, o afección en los que la terapia inmunosupresora podría ser beneficiosa, tal como métodos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes, y métodos para inhibir el trasplante de órgano, célula o injerto de tejido.

En el presente documento se desvela un dímero de proteína aislado o recombinante (por ejemplo, dímero de proteína fusión de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas), en el que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende: (1) un polipéptido de dominio extracelular (ECD) de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que (a) se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 en no más de 6 restos de aminoácido (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos de aminoácido), y (b) comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 con respecto a la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 159; y (2) un polipéptido de Fc de Ig, en el que el dímero de proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas, inducción de marcadores de activación, inflamación, producción de anticuerpo anticolágeno, respuesta de anticuerpo dependiente de los linfocitos T, etc.) en ensayos y/o métodos *in vitro* y/o *in vivo* como se describe con mayor detalle a continuación. En el presente documento también se desvela una proteína de fusión monomérica una aislada o recombinante, como se ha descrito anteriormente, que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o induce una respuesta inmunológica *in vitro* o *in vivo*. En algunos casos, CD80 es hCD80 y CD86 es hCD86. En el dímero de proteína de fusión, las dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, monómero de CTLA-4-Ig mutante) se unen opcionalmente con enlace covalente en conjunto mediante uno o más enlaces disulfuro mediante restos de cisteína en cada monómero, y los dos monómeros generalmente son idénticos entre sí. El extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2, Fc de IgG1, Fc de IgG4, o un Fc de IgG mutante que reduce la función efectora o unión al receptor Fc) se puede unir con enlace covalente o fusionar directa o indirectamente (mediante un conector que comprende, por ejemplo, de 1-10 restos de

aminoácido) al extremo C-terminal del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante. El polipéptido de Fc de Ig puede comprender una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184-186 y 218.

5 Algunos de tales dímeros o monómeros de proteína de fusión comprenden un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud aproximadamente igual a la longitud del aminoácido del ECD de hCTLA-4, por ejemplo, una longitud de 118-130, 119-129, 120-128, 121- 127, 122- 126, o 123-125 restos de aminoácido. Algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante en tal dímero o monómero de proteína de fusión comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de 124 restos de aminoácido. Algunos de tales polipéptidos de CTLA-4-ECD mutante comprenden 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácido en posiciones relativas a la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 159 seleccionadas entre el grupo que consiste en las posiciones 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, y 85. Algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante comprenden adicionalmente una sustitución de aminoácido en una posición que corresponde a la posición 104 y/o 30 con respecto a la SEQ ID NO: 159. Algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante comprenden al menos una sustitución de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 159 en la posición 70 (opcionalmente S70F), posición 64 (opcionalmente S64P), posición 50 (opcionalmente A50M), posición 54 (opcionalmente M54K/V, por ejemplo, M54K), posición 65 (opcionalmente I65S), posición 56 (opcionalmente N56D), posición 55 (opcionalmente G55E), posición 85 (opcionalmente M85A), y/o posición 24 (opcionalmente A24E/S, por ejemplo, A24E). Cualquiera de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante puede comprender adicionalmente una sustitución de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 159 en la posición 104 (opcionalmente L104E/D, por ejemplo, L104E), posición 30 (opcionalmente T30N/D/A, por ejemplo, T30N, T30D, o T30A), y/o posición 32 (opcionalmente V32I). Algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante comprenden al menos una sustitución en una posición de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 159 seleccionada entre el grupo que consiste en A50M, M54K, G55E, N56D, S64P, I65S, y S70F. Algunos de tales polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante comprenden 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones en las posiciones del aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 159 seleccionadas entre el grupo que consiste en A50M, M54K, G55E, N56D, S64P, I65S, y S70F.

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

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

45 Algunos de tales dímeros y monómeros de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad para suprimir o inhibir una o más respuestas inmunológicas, incluyendo las que se han descrito anteriormente y en lo sucesivo (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas, inducción de marcadores de activación, inflamación, producción de anticuerpos anti-colágeno, respuestas de anticuerpo dependiente de los linfocitos T), en ensayos y/o métodos *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, *in vivo* en un sujeto que padece una enfermedad, trastorno, o afección en el que una terapia inmunosupresora podría ser beneficiosa y al que se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante). Algunos de tales dímeros de CTLA-4-Ig mutante inhiben una o más metales respuestas inmunológicas en mayor medida que hCTLA-4, una hCTLA-4-Ig dimérica (por ejemplo, CTLA-4-IgG1 o CTLA-4-IgG2 dimérica), proteína Orencia®, y/o LEA29Y-Ig dimérica. Algunos de tales monómeros de CTLA-4-Ig mutante inhiben una o más de tales respuestas inmunológicas en mayor medida que hCTLA-4 monomérico, hCTLA-4-Ig monomérica, y/o LEA29Y-Ig monomérica. Se espera que tales dímeros y monómeros de CTLA-4-Ig mutante tengan un uso beneficioso en diversas aplicaciones, incluyendo métodos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes, y métodos para inhibir el trasplante de órgano, célula o injerto de tejido.

60 Cualquiera de tal dímero o monómero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica que se ha descrito anteriormente puede incluir adicionalmente un péptido que facilita la secreción de la proteína de fusión de una célula hospedadora. El péptido es opcionalmente un péptido señal. El extremo C-terminal del péptido señal generalmente está unido con enlace covalente al extremo N-terminal de una proteína de fusión. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 182 o SEQ ID NO: 216. El péptido señal puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una

identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de aminoácidos que comprende restos de aminoácido 1-35, 1-36, o 1- 37 de la SEQ ID NO: 160. Además, como se discute a continuación, cualquiera de tales proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monomérica o dimérica que se ha descrito anteriormente puede comprender una o más de los restos de aminoácido que están glicosilados o pegilados.

En el presente documento también se desvela una proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante madura/secretada que tiene una longitud de 352 aminoácidos y que comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante que comprende 124 restos de aminoácido y un polipéptido de Fc de IgG2 humano que comprende 228 restos de aminoácido. Los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo incluyen los polipéptidos que comprenden secuencias identificadas por cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-73. Las proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante a modo de ejemplo incluyen las que comprenden una secuencia de polipéptidos identificada por cualquiera de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222. Si se desea, los aminoácidos de una proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante madura se pueden numerar comenzando con el primer resto de aminoácido de la CTLA-4-IgG2 mutante (es decir, el primer resto del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante). En algunos aspectos, el primer resto de la proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante (o ECD de CTLA-4 mutante) es metionina y por lo tanto la numeración de los aminoácidos de la proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante (o ECD de CTLA-4 mutante) podría comenzar con metionina (designada como resto 1 de aminoácido).

También se desvelan proteínas de fusión multiméricas aisladas o recombinantes que comprenden dos o más proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante y se han descrito anteriormente. En algunos casos, el multímero es un dímero de proteína de fusión que comprende dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante, que pueden ser proteínas de fusión idénticas (es decir, homodiméricas) o proteínas de fusión diferentes (es decir, heterodiméricas). En algunos casos, el multímero es una proteína de fusión tetramérica, que comprende cuatro polipéptidos de CTLA-4-ECD mutantes de la divulgación. El tetrámero puede comprender cuatro polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante idénticos(es decir, homotetrámero) o cualquier combinación de cuatro polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación de modo que los cuatro polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante no son idénticos (es decir, heterotetrámero). Algunos de tales multímeros se unen a CD80 y/o CD86 (y/o hCD80-Ig y/o hCD86-Ig) y/o suprimen o inhiben una respuesta inmunológica.

En el presente documento se desvelan formas solubles de cualquiera de los polipéptidos, las proteínas de fusión, y multímeros que se han descrito anteriormente. También se incluyen formas solubles del conjugado que se describe a continuación. Las moléculas solubles de la divulgación - por ejemplo, polipéptidos solubles, las proteínas de fusión diméricas, las proteínas de fusión monoméricas, multímeros, y conjugados de la divulgación - no se enlazan o unen o relacionan con una célula. Algunas de tales moléculas solubles pueden estar en solución no son capaces de circulación, por ejemplo, en un fluido (por ejemplo, en un organismo de un sujeto). Un péptido señal se puede usar generalmente para facilitar la secreción de una molécula de ese tipo, pero el péptido señal se escinde durante la secreción de la molécula de una célula hospedadora. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, una molécula soluble, tal como un polipéptido soluble, proteína de fusión dimérica, proteína de fusión monomérica, o multímero, no incluye un péptido señal. Como se ha discutido anteriormente, un polipéptido de dominio extracelular de CTLA-4 mutante de la divulgación se puede unir a una molécula de Ig, que incluye, por ejemplo, una parte de un polipéptido de Ig, tal como, por ejemplo, un polipéptido de Fc de Ig, que da como resultado una proteína de fusión soluble. Por lo tanto, en el presente documento se desvelan proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante solubles que comprende en cualquiera de los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante como se describe en el presente documento fusionados o unidos a al menos una parte de un polipéptido de Ig, tal como, por ejemplo, un Fc de Ig de tipo silvestre (por ejemplo, Fc de IgG2 humano) o polipéptido de Fc de Ig mutante. Tales proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutantes solubles pueden ser proteínas de fusión monoméricas o diméricas e incluyen los monómeros y dímeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se han descrito con detalle anteriormente en cualquier parte, incluyendo en los Ejemplos que siguen a continuación. Como se ha descrito con detalle anteriormente y en cualquier parte del presente documento, algunas de tales proteínas de fusión monoméricas y diméricas solubles pueden tener una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 y/o una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T) en aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*.

Se espera que algunas de tales moléculas solubles de la divulgación tengan un beneficio particular en diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, métodos terapéuticos y profilácticos para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunológico (por ejemplo, enfermedades autoinmunes) y métodos profilácticos y terapéuticos para inhibir el trasplante de células, órgano o injerto de tejido. Las moléculas solubles de la divulgación - por ejemplo, polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante recombinantes solubles, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas y diméricas, conjugados de ECD de CTLA-4 mutante, conjugados de CTLA-4-Ig mutante, multímeros que comprenden polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante, multímeros que comprenden conjugados de CTLA-4 mutante o conjugados de CTLA-4-Ig mutante de la divulgación - que se unen a CD80 y/o CD86, cuando se administran a un sujeto en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz, inhiben la interacción entre CD80 y/o CD86 endógenos y CD28 endógeno, suprimiendo de ese modo en el sujeto una respuesta del sistema inmunológico o ataque al sistema inmunológico en tejidos, órganos y/o células del organismo sano del sujeto. En casos en los que un sujeto es el receptor de tejidos, órganos, y/o células de organismo sano de un donante (por ejemplo, tal como cuando el sujeto receptor ha recibido un injerto de tejido o célula o trasplante de órgano de donante), tales moléculas

solubles inhiben la interacción entre CD80 y/o CD86 endógenos y CD28 endógeno, inhibiendo de ese modo una respuesta o ataque nocivos por el sistema inmunológico del sujeto sobre los tejidos, órganos, o células de organismos sanos donados al sujeto por el donante. Mediante la supresión de una respuesta o ataque del sistema inmunológico sobre tejidos de organismos sano, los efectos secundarios (por ejemplo, dolor, inflamación de articulación, etc.) asociados con tal respuesta o ataque del sistema inmune sobre tejidos, órganos, o células sanos en el sujeto puede disminuir, y el daño resultante de una respuesta o ataque de ese tipo se puede retrasar o prevenir.

Los métodos para medir las afinidades o capacidades de avidez de unión de polipéptidos de la invención que se han descrito anteriormente, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante diméricas y monoméricas, y multímeros de la divulgación podrían ser conocidos por las personas con una experiencia habitual en la materia e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, tecnología de Biacore™ (GE Healthcare), microcalorimetría de valoración isotérmica (MicroCal LLC, Northampton, MA), ELISA, métodos de acción de fagos por afinidad de unión, y métodos de FACS. Los métodos de Biacore se describen con detalle en el Ejemplo 4 que sigue a continuación. FACS u otros métodos de separación se han descrito anteriormente con mayor detalle y en cualquier parte en el presente documento. Con los métodos para medir las capacidades de avidez de los polipéptidos de la divulgación con respecto a hCD80 y/o hCD86 mediante ELISA de fagos se describen en el Ejemplo 2 que sigue a continuación.

Los métodos para detectar y medir respuestas de los linfocitos T inducidos por moléculas de la divulgación (incluyendo, por ejemplo, polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante diméricas y monoméricas, y multímeros de la invención) son bien conocidos por las personas con experiencia en la materia. La activación de los linfocitos T se caracteriza normalmente por sucesos fisiológicos que incluyen, por ejemplo, síntesis de citoquinas asociadas a linfocitos T (por ejemplo, producción de IFN- γ) e inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2). Los linfocitos T CD4⁺ reconocen sus péptidos inmunogénico sin el contexto de moléculas de clase II de MHC, mientras que los linfocitos T CD8⁺ reconocen sus péptidos inmunogénico son el contexto de moléculas de clase I de MHC.

Los métodos a modo de ejemplo para evaluar y medir la capacidad de moléculas de la divulgación que se han descrito anteriormente para inhibir o suprimir la activación de linfocitos T y/o proliferación de linfocitos T o para bloquear la señalización a través de CD86 y/o CD80 se describen en los Ejemplos 5-8 y en cualquier parte en el presente documento.

Los polipéptidos, las proteínas de fusión monoméricas y diméricas, y multímeros de la divulgación, incluyendo los que se han discutido anteriormente, de forma opcional comprenden adicionalmente un aminoácido adicional, tal como una metionina, añadida al extremo N-terminal y/o una etiqueta peptídica para purificación o identificación. Los polipéptidos de la divulgación, incluyendo los que se han discutido anteriormente, de forma opcional comprenden adicionalmente una secuencia de purificación de polipéptido, tal como, por ejemplo, una subsecuencia se selecciona entre una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una secuencia de polihistidina, y una fusión de GST.

Además, como se discute con mayor detalle a continuación, la divulgación incluye ácidos nucleicos aislados, recombinantes, o sintéticos que codifican todos los polipéptidos, las proteínas de fusión, y multímeros de la divulgación que se han descrito anteriormente que se describen a continuación con detalle adicional.

45 Identidad de Secuencia

Como se ha discutido anteriormente, en el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en la que el polipéptido se une a CD80 o CD86 o a un dominio extracelular de cualquiera y/o tiene una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica. A continuación también se describe con detalle un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en la que el polipéptido tiene una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 y/o un ECD del mismo, y/o tiene una capacidad para suprimir una respuesta inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo.

El grado en el que una secuencia (polipéptido o ácido nucleico) es similar a otra proporciona una indicación de propiedades estructurales y funcionales similares para las dos secuencias. Por consiguiente, en el contexto de la presente divulgación, la secuencias que tienen una secuencia similar a cualquier secuencia a modo de ejemplo dada son una característica de la presente divulgación. Las secuencias que tienen un porcentaje de identidades de secuencia como se define a continuación son una característica de la divulgación. Se pueden usar diversos métodos para determinar relaciones de secuencias, incluyendo alineamiento manual y alineamiento y análisis de secuencias asistido por ordenador. Diversos programas informáticos para realizar alineamiento de secuencias están disponibles,

o los puede producir alguien con experiencia.

Como se ha indicado anteriormente, no es necesario que las secuencias de los ácidos nucleicos y polipéptidos usados en la invención objeto sean idénticas, pero pueden ser sustancialmente idénticas a la secuencia correspondiente de un ácido nucleico de la invención o polipéptido de la invención, respectivamente. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención se pueden someter a diversos cambios, tales como una o más inserciones, delecciones, y/o sustituciones de aminoácido, ya sea conservativas o no conservativas, incluyendo cuando, por ejemplo, tales cambios puedan proporcionar ciertas ventajas en su uso, tal como, en su uso terapéutico o profiláctico o administración o aplicación de diagnóstico. Los ácidos nucleicos de la invención también se pueden someter a diversos cambios, tales como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones de modo que un codón particular codifica el mismo aminoácido o uno diferente, dando como resultado ya sea una variación silenciosa (por ejemplo, la mutación en una secuencia de nucleótidos da como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, cuando el aminoácido codificado no se altera por la mutación del ácido nucleico) o variación no silenciosa, una o más delecciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, una o más adiciones o inserciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, escisión de o uno o más truncamientos de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Los ácidos nucleicos también se puede modificar para que incluyan uno o más codones que proporcionen una expresión óptima en un sistema de expresión (por ejemplo, bacteriano o mamífero), mientras que, si se desea, dicho uno o más codones aún codifican el mismo aminoácido(s). Tales cambios de ácido nucleico podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso o administración, terapéuticos o profilácticos, o aplicación de diagnóstico. Los ácidos nucleicos y los polipéptidos se pueden modificar el número de formas siempre y cuando comprendan una secuencia sustancialmente idéntica (como se define a continuación) a una secuencia en un respectivo ácido nucleico o polipéptido de la invención.

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

El porcentaje de identidad de secuencia ("% de identidad de secuencia" o "% de identidad") de una secuencia objeto con respecto a una secuencia de consulta se puede calcular como sigue a continuación. En primer lugar, el alineamiento óptimo de las dos secuencias se determina usando un algoritmo de comparación de secuencias con parámetros de alineamiento específicos. Esta determinación del alineamiento óptimo se puede realizar usando un ordenador, o se puede calcular de forma manual, como se describe a continuación. A continuación, las dos secuencias óptimamente alineadas se comparan con respecto a la longitud de la comparación, y se determinan el número de posiciones en el alineamiento óptimo en el que se producen los restos idénticos en ambas secuencias, que proporciona el número de posiciones emparejadas. El número de posiciones emparejadas a continuación se divide entre el número total de posiciones de la longitud de comparación (que, a menos que se indique de otro modo, es la longitud de la secuencia de consulta), y a continuación multiplicando el resultado por 100, para producir el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia objeto con respecto a secuencia de consulta.

Con respecto a las secuencias de polipéptidos, por lo general una secuencia se contempla como una "secuencia de consulta" (por ejemplo, una secuencia de polipéptidos de la invención) a la que se comparan una u otras secuencias más, es decir, "secuencia(s) objeto" (por ejemplo, secuencias presentes en una base de datos de secuencias). El algoritmo de comparación de secuencias usa los parámetros de alineamiento designados para determinar el alineamiento óptimo entre la secuencia de consulta y la secuencia(s) objeto. Cuando se compara una secuencia de consulta contra una base de datos de secuencias, tal como, por ejemplo, la base de datos GENBANK® (Genetic Sequence Data Bank; Department of Health and Human Services) o la base de datos GENESEQ® (Thomson Derwent; también disponible como base de datos DGENE® en STN), normalmente solo se introducen en el ordenador la secuencia de consulta y los parámetros de alineamiento; los alineamientos óptimos entre la secuencia de consulta y a la secuencia objeto se devuelven hasta un número especificado de secuencias objeto.

1. Determinación del Alineamiento Óptimo

Dos secuencias de polipéptidos están "óptimamente alineadas" cuando se alinean usando parámetros definidos, es decir, una matriz de sustitución de aminoácido definida, penalización por existencia de hueco (también denominada penalización por hueco abierto), y penalización por extensión de hueco, con el fin de llegar a la puntuación de similitud más elevada para ese par de secuencias. La matriz BLOSUM62 (Henik_{dis} y Henik_{dis} (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (22): 10915-10919) a menudo se usa como una matriz de sustitución de puntuación por defecto en algoritmos de alineamiento de secuencia de polipéptidos (tal como BLASTP, que se describe a continuación). La puntuación por existencia de hueco se impone para la introducción de un solo hueco de aminoácido en una de las

secuencias alineadas, and the penalización por extensión de espacio se impone para cada posición del resto en el hueco. A menos que se indique de otro modo, los parámetros de alineamiento usados en el presente documento son: matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por existencia de hueco = 11, y penalización por extensión de espacio = 1. La puntuación de alineamiento se define por las posiciones del aminoácido de cada secuencia en la que el alineamiento comienza y termina (por ejemplo, la ventana de alineamiento), y opcionalmente mediante la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias, con el fin de llegar a la puntuación de similitud más elevada posible.

Aunque el alineamiento óptimo entre dos o más secuencias se puede determinar de forma manual (como se describe a continuación), el proceso se facilita mediante el uso de un algoritmo de alineamiento implementado por ordenador tal como BLAST® (National Library of Medicine), por ejemplo, BLASTP para secuencias de polipéptidos y BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos, que se describen en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, y se hacen disponibles al público a través de diversas fuentes, tales como la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Cuando se usa una interfaz de BLAST computarizada, si existe la opción de usar un “filtro de baja complejidad”, esta opción se debería desactivar (es decir, sin filtro).

El alineamiento óptimo entre dos secuencias de polipéptidos también se puede determinar mediante un cálculo manual del algoritmo BLASTP (es decir, sin ayuda de un ordenador) usando los mismos parámetros de alineamiento que se han especificado anteriormente (matriz = BLOSUM62, penalización por hueco abierto = 11, y penalización por extensión de espacio = 1). Para comenzar, las secuencias inicialmente se alinean mediante inspección visual. A continuación se calcula una puntuación de alineamiento inicial como sigue a continuación: para cada posición individual del alineamiento (es decir, para cada par de restos alineados), un valor numérico se asigna de acuerdo con la matriz BLOSUM62 (Figura 13). La suma de los valores asignados a cada par de restos en el alineamiento es la puntuación de alineamiento. Si las dos secuencias que se están alineando son muy similares, a menudo este alineamiento inicial proporciona la puntuación de alineamiento más elevada posible. El alineamiento con la puntuación de alineamiento más elevada posible es el alineamiento activo basándose en los parámetros de alineamiento usados.

Los ejemplos de cálculo manual de las puntuaciones de alineamiento para dos secuencias se proporcionan en las Figuras 14A-14D. La Figura 14A muestra el cálculo de una puntuación de alineamiento para un alineamiento arbitrario (alineamiento 14A) de una secuencia de “consulta”, identificado en el presente documento como los restos 39-53 de la secuencia de ECD de CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 159), y una secuencia “objeto”, identificada en el presente documento como los restos 40-54 de D3 (SEQ ID NO: 61). El valor numérico asignado por la matriz BLOSUM62 para cada par de aminoácidos alineados se muestra bajo cada posición en el alineamiento.

La Figura 14B muestra la puntuación de alineamiento para el alineamiento *óptimo* de las mismas dos secuencias. Para ayudar en la visualización, cada par de aminoácidos idénticos en el alineamiento se muestran letra negrita. El alineamiento en la Figura 14B (alineamiento 14B) que sigue a continuación da como resultado la puntuación de alineamiento más elevada posible (la suma de los valores que se muestran bajo de cada posición alineada) de estas dos secuencias; cualquier otro alineamiento de estas dos secuencias, con o sin huecos, podría dar como resultado una puntuación de alineamiento menor.

En algunos casos, una puntuación de alineamiento más elevada se podría obtener introduciendo uno o más huecos en el alineamiento. Siempre que se introduce un hueco en un alineamiento, se asigna una penalización por hueco abierto, y además una penalización por extensión de espacio se evalúa para cada posición del resto dentro de ese hueco. Por lo tanto, usando los parámetros de alineamiento que se han descrito anteriormente (incluyendo penalización por hueco abierto = 11 y penalización por extensión de espacio = 1), un hueco de un resto en el alineamiento podría corresponder a un valor de $-(11+(1 \times 1)) = -12$ asignado al hueco; un hueco de dos restos podría corresponder a un valor de $-(11+(2 \times 1)) = -13$ asignado al hueco, y así sucesivamente. Este cálculo se repite para cada nuevo cuerpo introducido en el alineamiento.

Lo siguiente es un ejemplo, que demuestra cómo la introducción de un cuerpo en un alineamiento puede dar como resultado una puntuación de alineamiento más elevada, a pesar de la penalización por hueco. La Figura 14C muestra un alineamiento (alineamiento 14C) de una secuencia de “consulta”, identificado en el presente documento como los restos 39-53 de la secuencia de ECD de CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 159), y una secuencia “objeto”, identificada en el presente documento como los restos 41-55 de D3 (SEQ ID NO: 61), pero en este caso con los aminoácidos 49-50 sometidos a delección. El alineamiento 14C, que es el mejor alineamiento posible sin introducción de cualquier hueco, da como resultado una puntuación de alineamiento de 34.

El alineamiento en la Figura 14D (alineamiento 14D) muestra el efecto de la introducción de un hueco de dos restos en la secuencia más baja en la puntuación de alineamiento. A pesar de la penalización por un hueco total de 13 (la penalización por hueco abierto de 11, y 2 veces la penalización por extensión de espacio de 1), la puntuación de alineamiento total de las secuencias aumenta a 43. El alineamiento D que sigue a continuación da como resultado la puntuación de alineamiento más elevada posible, y por lo tanto es el alineamiento óptimo de estas dos secuencias; cualquier otro alineamiento de estas dos secuencias (con o sin huecos) podría dar como resultado una puntuación de alineamiento menor.

Se debe observar que los ejemplos de cálculos de alineamiento de secuencias que se han descrito anteriormente, que usan secuencias relativamente cortas, se proporcionan solamente con fines ilustrativos. En la práctica, los parámetros de alineamiento usados (matriz BLOSUM62, penalización por hueco abierto = 11, y penalización por extensión de espacio = 1) generalmente están destinados a secuencias de polipéptidos con una longitud de 85 aminoácidos o más larga. La página web del NCBI proporciona los siguientes parámetros de alineamiento para secuencias de otras longitudes, que son adecuados para cálculo de alineamiento asistido por ordenador así como manual, usando el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. Para secuencias con una longitud de 50-85 aminoácidos, los parámetros óptimos son la matriz BLOSUM80 (Henik_{dis} y Henik_{dis}, mencionado anteriormente), penalización por hueco abierto = 10, y penalización por extensión de espacio = 1. Para secuencias con una longitud de 35-50 aminoácidos, los parámetros óptimos son la matriz PAM70 (Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. y Orcutt, B.C. (1978) "A model of evolutionary change in proteins" en *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supl. 3, M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC.), penalización por hueco abierto = 10, y penalización por extensión de espacio = 1. Para secuencias con una longitud de menos de 35 aminoácidos, los parámetros óptimos son la matriz PAM30 (Dayhoff, M.O., mencionado anteriormente), penalización por hueco abierto = 9, y penalización por extensión de espacio = 1.

2. Cálculo del Porcentaje de Identidad

Una vez que las secuencias están alineadas de forma óptima, el porcentaje de identidad de la secuencia objeto con respecto a la secuencia de consulta se calcula haciendo el recuento del número de posiciones en el alineamiento óptimo que contiene pares de restos idénticos, se divide entre el número de restos en la longitud de comparación (también denominada la ventana de comparación), que, a menos que se indique de otro modo, es el número de restos en la secuencia de consulta, y multiplicando el número resultante por 100. Haciendo de nuevo referencia a los alineamientos que se han mencionado anteriormente, en cada ejemplo la secuencia designada como la secuencia de consulta (parte superior) tiene una longitud de 15 aminoácidos. En el alineamiento B, 12 pares de restos de aminoácido alineados (mostrados en letra negrita) son idénticos en el alineamiento óptimo de la secuencia de consulta (parte superior) con la secuencia objeto (parte inferior). Por lo tanto, esta secuencia objeto particular tiene una identidad de $(12/15) \times 100 = 80\%$ con respecto a *toda la longitud* de la secuencia de consulta de 15 restos; en otras palabras, la secuencia objeto en el alineamiento B tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la secuencia de consulta. En el alineamiento D, 11 pares de restos de aminoácido (mostrados en letra negrita) en el alineamiento óptimo son idénticos; por lo tanto esta secuencia objeto particular tiene una identidad de $(11/15) \times 100 = 73,3\%$ con respecto a *toda la longitud* de la secuencia de consulta de 15 restos; en otras palabras, la secuencia objeto en el alineamiento D tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de un 73% con respecto a la secuencia de consulta.

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

De forma análoga, como se aplica en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos, la expresión identidad sustancial (o sustancialmente idéntico) se refiere a que cuando dos secuencias de ácidos nucleicos (es decir, una secuencia de consulta y una secuencia objeto) se alinean de forma óptima usando el algoritmo BLASTN (manualmente o a través de ordenador) usando los parámetros apropiados que se han descrito anteriormente, la secuencia objeto tiene una identidad de secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o un 100% con respecto a la secuencia de consulta. Los parámetros usados para alineamientos de secuencia de ácidos nucleicos son: recompensa de emparejamiento 1, penalización por falta de coincidencia -3, penalización por existencia de hueco 5, penalización por extensión de espacio 2 (en el algoritmo BLASTN no se usan matrices de sustitución). En algunos casos, la identidad sustancial existe con respecto a una longitud de comparación de al menos 300 restos de nucleótido, por ejemplo, al menos 330, 345, 354, 357, 360, 363, 366, 369, 362, 365, 375, 390, 405, 420, 435, 450, 600, 750, 900, 1035, 1038, 1041, 1044, 1047, 1050, 1053, 1056, 1059, 1062, 1065, 1068, 1071, 1074, 1077, 1080, 1200, 1350, o 1500 restos de nucleótido.

Se pueden usar otros programas de alineamiento de secuencia conocidos en la técnica. El programa ALIGN produce un alineamiento global óptimo (general) de las dos secuencias de proteínas o ácidos nucleicos elegidas usando una modificación del algoritmo de programación dinámica descrito por Myers y Miller CABIOS 4: 11-17 (1988). El programa ALIGN generalmente, pero no necesariamente, se usa con huecos finales ponderados. Si las penalizaciones por apertura de hueco y extensión de hueco están disponibles, a menudo se ajustan entre aproximadamente -5 y -15 y entre 0 y -3, respectivamente, más preferentemente entre aproximadamente -12 y -0,5 y

-2, respectivamente, para alineamientos de secuencia de aminoácidos, y de -10 a -20 y de -3 a -5, respectivamente, más comúnmente entre aproximadamente -16 y -4, respectivamente, para alineamientos de secuencia de ácidos nucleicos. El programa ALIGN se describe adicionalmente en Pearson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-48 (1988), y en Pearson *et al.*, Meth. Enzymol. 18: 63-98 (1990).

5 Como alternativa, y particularmente para análisis de múltiples secuencias (es decir, comparación de más de tres secuencias), se puede usar el programa CLUSTALW (que se describe, por ejemplo, en Thompson *et al.*, Nucl. Acids Res. 22: 4673-4680 (1994)). El programa CLUSTALW es un algoritmo adecuado para múltiples alineamientos de secuencias de ADN y aminoácidos (Thompson *et al.*, Nucl. Acids Res. 22: 4673-4680 (1994)). CLUSTALW realiza
10 múltiples comparaciones por parejas entre grupos de secuencias y las une en un alineamiento múltiple basado en la homología. En un aspecto, las penalizaciones por hueco Abierto y Extensión de hueco se establecen en 10 y 0,05, respectivamente. Como alternativa o adicionalmente, el programa CLUSTALW se ejecuta usando ajustes "dinámicos" (con respecto a "rápido"). Generalmente, el análisis de secuencia de nucleótidos con CLUSTALW se realiza usando la matriz BESTFIT, mientras que las secuencias de aminoácidos se evalúan usando un conjunto
15 variable de matrices BLOSUM dependiendo del nivel de identidad entre las secuencias (por ejemplo, como se usa mediante la versión 1.6 del programa CLUSTALW disponible a través del San Diego Supercomputer Center (SDSC) o la versión W 1.8 disponible en European Bioinformatics Institute, Cambridge, Reino Unido). Preferentemente, los ajustes de CLUSTALW se establecen como los ajustes por defecto de CLUSTALW del SDSC (por ejemplo, con respecto a las penalizaciones especiales por hueco hidrófilo en análisis de secuencia de aminoácidos). El programa CLUSTALW se describe adicionalmente en, por ejemplo, Higgins *et al.*, CABIOS 8 (2): 189-91 (1992), Thompson *et al.*, Nucleic Acids Res. 22: 4673-80 (1994), y Jeanmougin *et al.*, Trends Biochem. Sci. 2: 403-07 (1998).

En un formato alternativo, la identidad o porcentaje de identidad entre un par en particular de secuencias de aminoácidos alineados se refiere al porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos que se o tiene mediante
25 análisis CLUSTALW (por ejemplo, versión W 1.8), haciendo el recuento del número de coincidencias idénticas en el alineamiento y dividiendo tal número de coincidencias idénticas entre la mayor de (i) la longitud de las secuencias alineadas, y (ii) 96, y usando los siguientes parámetros de ClustalW por defecto para conseguir alineamientos por pares lentos/precisos - Penalización por Hueco Abierto: 10; Penalización por Extensión de Hueco: 0,10; Matriz de ponderación de proteína: serie Gonnet; matriz de ponderación de ADN: IUB; alineamientos por pares Lento/Rápido
30 de Toggle = Alineamiento LENTO o TOTAL

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

Otros algoritmos adecuados incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que facilitan el análisis de al menos dos secuencias de aminoácidos son nucleótidos, alineando una secuencia seleccionada contra múltiples secuencias en
40 una base de datos (por ejemplo, GenSequiv.), o, cuando se modifica con un algoritmo adicional tal como BL2SEQ, entre dos secuencias seleccionadas. El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (dirección de la página web mundial ncbi.nlm.nih.gov). El algoritmo BLAST implica en primer lugar la identificación de pares de secuencias con puntuación elevada (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que o coinciden o satisfacen alguna
45 puntuación T de umbral con valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T hace referencia al umbral de puntuación de palabra en las cercanías (Altschul *et al.*, mencionado anteriormente). Estos aciertos de palabra de cercanía inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar las HSP más largas que las contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineamiento acumulativa se pueda
50 aumentar. Las puntuaciones acumulativa se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos que coinciden; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos con falta de coincidencia; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se usa para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo conseguido;
55 la puntuación acumulativa disminuye a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T, y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) se puede usar con una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP (por ejemplo, BLASTP
60 2.0.14; 29 de junio de 2000) se puede usar con una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henik_{dis} y Henik_{dis}, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) usa alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras. De nuevo, al igual que con otros algoritmos adecuados, la rigurosidad de la comparación se puede aumentar hasta aquel programa identifique solamente secuencias que estén lo más cercanamente relacionadas con las que se encuentran
65 en el listado de secuencias en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tienen la identidad de al menos un 85, 90, 91, 92, 93, 49, 95, 96, 97, 98, 99 %, o un 100 % con

respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222; o ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos un 85, 90, 91, 92, 93, 49, 95, 96, 97, 98, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de nucleótidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NOS: 80- 158, 201-204, 223, y 224, o una secuencia de nucleótidos complementaria de las mismas.

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

15 El análisis con el programa BLAST también o como alternativa se puede modificar mediante programas de filtro de baja complejidad tales como los programas DUST o SEG, que se integran preferentemente en las operaciones del programa BLAST (véase, por ejemplo, Wootton *et al.*, Comput. Chem. 17: 149-63 (1993), Altschul *et al.*, Nat. Genet. 6: 119-29 (1991), Hancock *et al.*, Comput. Appl. Biosci. 10: 67-70 (1991), y Wootton *et al.*, Meth. Enzymol. 266: 554-71 (1996)). En tales aspectos, si se usó una proporción lambda, los ajustes útiles para la proporción están entre 0,75
20 y 0,95, incluyendo entre 0,8 y 0,9. Si se usan costes de existencia de hueco (o puntuaciones de hueco) en tales aspectos, el coste de la existencia de hueco por lo general se establece entre aproximadamente -5 y -15, más generalmente aproximadamente -10, y el costo de por hueco de resto generalmente se establece entre aproximadamente 0 y -5, tal como entre 0 y -3 (por ejemplo, -0,5). Se pueden usar parámetros de hueco similares usados con otros programas si es apropiado. Los programas BLAST y los principios que les subyacen se describen
25 adicionalmente en, por ejemplo, Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990), Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68 (199) (tal como se modifica por Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77 (1993)), y Altschul *et al.*, Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997).

Otro ejemplo de un algoritmo útil se incorpora en el software PILEUP. El programa PILEUP crea un alineamiento de
30 múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos por pares, progresivos, para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencias o porcentaje de similitud de secuencias. PILEUP usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-360, que es similar al método que describen Higgins y Sharp (1989) en CABIOS 5: 151-153. El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una con una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de
35 alineamiento múltiple comienza con el alineamiento por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo a continuación se alinea con la siguiente secuencia o grupos de secuencias las más relacionadas. Dos grupos de secuencia se alinean por una simple extensión del alineamiento por pares de dos secuencias individuales. El alineamiento final se consigue mediante una serie de alineamientos por padres, progresivos. El programa se desarrolla designando secuencias específicas sus coordenadas de aminoácido o nucleótido para regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros del programa. Usando
40 PILEUP, una secuencia de referencia se compara con otras secuencias de ensayo para determinar la relación del porcentaje de identidad de secuencia (o porcentaje de similitud de secuencia) usando parámetros especificados. Los parámetros a modo de ejemplo para el programa PILEUP son: ponderación del hueco por efecto (3,00), ponderación de la longitud del hueco por defecto (0,10), y huecos finales ponderados. PILEUP es un componente del paquete de software de análisis de secuencia GCG, por ejemplo, la versión 7.0 (Devereaux *et al.*, (1984) Nucl. Acids Res. 12: 387-395).

Otros algoritmos útiles para realizar análisis de identidad incluyen el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch
50 (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, y la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444. Las implementaciones informáticas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA) se proporcionan en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI.

55 Variación de Secuencia

Como se ha discutido anteriormente, en el presente documento se desvela un polipéptido de dominio extracelular de CTLA-4 mutante aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que (a) se diferencia de una
60 secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1 - 73 en no más de 6 restos de aminoácido (por ejemplo, no más de 1,2, 3, 4, 5 o 6 restos de aminoácido), en el que el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera o ambos, y/o inhibe una respuesta inmunológica. Tal sustitución o sustituciones de aminoácido incluyen sustitución o sustituciones de aminoácido conservativas.

65 Como un ejemplo no limitante, un polipéptido de la divulgación puede tener una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la SEQ ID NO: 1 en un total de hasta 6 aminoácidos (que puede ser una combinación de sustituciones,

deleciones, y/o inserciones de aminoácido incluyendo las que se han descrito anteriormente). En algunos casos, ninguna, alguna, o todas las sustituciones son sustituciones de acuerdo con un grupo de sustitución que se define a continuación.

- 5 Las sustituciones de aminoácido de acuerdo con la invención pueden incluir, pero no se limitan a, una o más sustituciones de aminoácido conservativas. Una sustitución de resto de aminoácido conservativa por lo general implica el intercambio de un miembro dentro de una clase funcional de restos de aminoácido para un residuo que pertenece a la misma clase funcional (los restos de aminoácido idénticos se consideran funcionalmente homólogos o conservados para calcular el porcentaje de homología funcional). Las tablas de sustitución conservativa que
10 proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Un ejemplo se proporciona en la Tabla 1, que presenta seis grupos a modo de ejemplo que contienen aminoácidos que se pueden considerar "sustituciones conservativas" para otro.

Tabla 1. Grupos de Sustitución de Resto de Aminoácido Conservativa

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

- 15 Se pueden concebir otros grupos de sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden agrupar por función o estructura o composición química similares (por ejemplo, ácido, básico, alifático, aromático, que contiene azufre). Por ejemplo, un grupo Alifático puede comprender: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas para otro
20 incluyen: Aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); Que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C); Básicos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácido: Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); Restos sin carga no polares, Cisteína (C), Metionina (M), y Prolina (P); Restos Sin Carga Hidrófilos: Serina (S), Treonina (T), Asparagina (N), y Glutamina (Q). Véase también Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company, para grupos adicionales de aminoácidos. En el presente documento el listado de una secuencia de polipéptidos, en conjunto con los grupos de sustitución mencionados anteriormente, proporciona un listado expreso de todas las
25 secuencias de polipéptidos sustituidas de forma conservativa.

- Existen sustituciones más conservativas dentro de las clases de resto de aminoácido que se han descrito anteriormente, que también o como alternativa pueden ser adecuadas. Los grupos de conservación para sustitución
30 que son más conservar tipos incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Por lo tanto, por ejemplo, en un aspecto particular, en el presente documento se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencias de al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o un 99 % con la SEQ ID NO: 1 (o cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222) y que se diferencia de la secuencia de la SEQ ID NO: 1
35 principalmente (por ejemplo, al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, un 90 %), si no totalmente, por tales sustituciones de aminoácido más conservativas.

- Los grupos de situaciones de aminoácidos adicionales que también pueden ser adecuados se pueden determinar usando los principios que se describen, por ejemplo, en Creighton (1984) *PROTEINS: STRUCTURE AND
40 MOLECULAR PROPERTIES* (2ª Ed. 1993), W.H. Freeman and Company. En algunos aspectos, al menos un 33 %, 50 %, 60 %, un 70 %, o más (por ejemplo, al menos un 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, un 97 % o más) de las sustituciones en una variante de secuencia de aminoácidos comprenden sustituciones de uno o más restos de aminoácido en una secuencia de polipéptidos de la invención con restos que están dentro de la misma clase de homología funcional (tal como se determina mediante cualquier sistema de clasificación adecuado, tales como los
45 que se han descrito anteriormente) como los restos de aminoácido de la secuencia de polipéptidos que reemplazan.

- Las variaciones conservativa mentes sustituidas de una secuencia de polipéptidos de la presente invención incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, por lo general menos de un 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, o un 6 % de los aminoácidos de la secuencia de polipéptidos, o más generalmente menos de un 5 %, 4 %, 3 %, un 2 %, o un 1 %, de
50 los aminoácidos de la secuencia de polipéptidos, con un aminoácido seleccionado de forma conservativa del mismo grupo de sustitución conservativa.

- En el presente documento se desvelan polipéptidos que comprenden variaciones de aminoácido de una secuencia de polipéptidos que se describe en el presente documento. Como se ha discutido anteriormente, en un aspecto, la divulgación incluye polipéptidos aislados o recombinantes (por ejemplo, polipéptidos de CTLA-4 mutante, tales como, por ejemplo, polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante) cada uno de los cuales comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de
55

- polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, y que se unen a CD80 y/o CD86 o un fragmento de polipéptido de CD80 y/o CD86 (o un ECD de cualquiera o ambos), y/o suprime una respuesta inmunológica. Tales polipéptidos pueden variar en una o más deleciones, adiciones, o sustituciones de aminoácido, incluyendo una o más sustituciones conservativas o no conservativas, con la condición de que, sin embargo, los
- 5 polipéptidos posean las propiedades funcionales descritas. En el presente documento se desvelan variantes de polipéptido que comprenden variaciones conservativamente modificadas de cualquiera de tal polipéptido que se describe en el presente documento, tal como, por ejemplo, uno que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73.
- 10 Como también se ha discutido anteriormente, en el presente documento se desvelan proteínas de fusión aisladas o recombinantes (por ejemplo, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante) cada una de las cuales comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una
- 15 secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222, en la que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o suprime una respuesta inmunológica se desvelan en el presente documento. Tales proteínas de fusión pueden variar en una o más deleciones, adiciones, o sustituciones de aminoácido, incluyendo una o más sustituciones conservativas o no conservativas, con la condición de que, sin embargo, las proteínas de fusión o sean las propiedades funcionales
- 20 conservativa mente modificadas de cualquiera de tal proteína de fusión que se describe en el presente documento, tal como, por ejemplo, una que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222.
- También se desvelan variantes de polipéptido de cualquier polipéptido aislado o recombinante de la divulgación que
- 25 se ha descrito anteriormente o en cualquier parte en el presente documento, en las que la secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido se diferencia de la respectiva secuencia de polipéptidos del polipéptido de referencia en una o más sustituciones de resto de aminoácido conservativas, aunque en ocasiones se pueden permitir sustituciones no conservativas o incluso pueden ser preferentes (en el presente documento se discuten
- 30 adicionalmente ejemplos de tales sustituciones no conservativas). Por ejemplo, la secuencia de la variante de polipéptido puede variar de una secuencia de polipéptidos de CTLA-4 mutante en una o más sustituciones de restos de aminoácido en la secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante con uno o más restos de aminoácido que tienen un peso similar (es decir, un resto que tiene una homología de peso con respecto al residuo en la respectiva secuencia de polipéptidos a la que reemplaza). El peso (y de forma correspondiente del tamaño) de los
- 35 restos de aminoácido de un polipéptido puede influir de forma significativa en la estructura del polipéptido. La conservación u homología basada en el peso se basa en sí un aminoácido correspondiente no idénticos se asocia con una contracción positiva en una de las matrices basadas en el peso que se describen en el presente documento (por ejemplo, matriz BLOSUM50; matriz PAM250).
- Del mismo modo que las clases de aminoácido funcional que se han descrito anteriormente, los restos de
- 40 aminoácido de origen natural se pueden dividir con grupos de conservaciones basadas en el peso (que se divide en entre grupos de conservación "fuerte" y "débil"). Los ocho grupos de conservación fuerte, basados en el peso, usados comúnmente son Ser Thr Ala, Asn Glu Gln Lys, Asn His Gln Lys, Asn Asp Glu Gln, Gln His Arg Lys, Met Ile Leu Val, Met Ile Leu Phe, His Tyr, y Phe Tyr Trp. Los grupos de conservación débiles basados en el peso incluyen Cys Ser Ala, Ala Thr Val, Ser Ala Gly, Ser Thr Asn Lys, Ser Thr Pro Ala, Ser Gly Asn Asp, Ser Asn Asp Glu Gln Lys,
- 45 Asn Asp Glu Gln His Lys, Asn Glu Gln His Arg Lys, Phe Val Leu Ile Met, y His Phe Tyr. Algunas versiones del programa de análisis de secuencias CLUSTAL W proporcionan un análisis de grupos de conservación fuerte y grupos de conservación débil basados en el peso en el rendimiento de un alineamiento, ofreciendo de ese modo una técnica conveniente para determinar la conservación basada en el peso (por ejemplo, CLUSTAL W proporcionado por el SDSC, que generalmente se usa con los ajustes por defecto de SDSC). En algunos aspectos, al menos un
- 50 33 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o un 90 % de la sustituciones en tal variante de polipéptido comprenden sustituciones en las que un resto dentro de la conservación basada en el peso reemplaza un resto de aminoácido de la secuencia de polipéptidos que está en el mismo grupo de conservación basada en el peso. En otras palabras, al porcentaje de sustituciones se conservan en términos de características de peso de resto de aminoácido.
- 55 La secuencia de una variante de polipéptido se puede diferenciar de un polipéptido CTLA-4 mutante de la invención en una o más sustituciones de aminoácido con uno o más restos de aminoácido que tienen un perfil de hidropatía similar (es decir, que presentan hidropatía similar) con respecto a los restos sustituidos (originales) del polipéptido de CTLA-4 mutante. Un perfil de hidropatía se puede determinar usando el índice de Kyte & Doolittle, las puntuaciones para cada aminoácido de origen natural en el índice siendo como siguen a continuación: I (+4,5), V (+4,2), L (+3,8), F (+2,8), C (+2,5), M (+1,9); A (+1,8), G (-0,4), T (-0,7), S (-0,8), W (-0,9), Y (-1,3), P (- 1,6), H (-3,2); E (-3,5), Q (-3,5), D (-3,5), N (-3,5), K (-3,9), y R (-4,5) (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.554.101 y Kyte & Doolittle, J. Molec. Biol. 157: 105-32 (1982) para discusión adicional). Al menos un 75 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % 98 %, 99 %, o un 100 % de los restos de aminoácido en la
- 60 secuencia de polipéptidos variante que no son idénticos a los restos correspondientes en la secuencia de polipéptidos de CTLA-4 mutante idéntico o funcionalmente homólogo que se desvela en el presente documento ("el homólogo más relacionado"), homólogo que se puede seleccionar entre cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-73,
- 65

presentan menos de +/-2 cambio en la hidrofilia, incluyendo menos de +/-1 cambio en la hidrofilia y menos de +/-0,5 cambio en la hidrofilia con respecto al resto de aminoácido no idéntico en la posición correspondiente en el homólogo más relacionado. El polipéptido variante puede presentar un cambio total de hidrofilia con respecto a su homólogo más relacionado seleccionado entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73, de menos de aproximadamente 150, menos de aproximadamente 100, y/o menos de aproximadamente 50 (por ejemplo, menos de aproximadamente 30, 20, o 10).

Los ejemplos de sustituciones de aminoácido habituales que retienen hidrofilia similar o idéntica incluyen sustituciones de arginina-lisina, sustituciones de glutamato-aspartato, sustituciones de serina-treonina, sustituciones de glutamina-asparagina, y sustituciones de valina-leucina-isoleucina. Los algoritmos y el software, tales como del programa GREASE disponible a través del SDSC, proporcionan una forma conveniente para evaluar rápidamente el perfil de hidropatía de una secuencia de aminoácidos. Dado que una proporción sustancial (por ejemplo, al menos aproximadamente un 33 %), si no la mayor parte (al menos un 50 %) o casi toda (por ejemplo, aproximadamente un 65, 80, 90, 95, 96, 97, 98, un 99 %) de las sustituciones de aminoácido en la secuencia de una variante de polipéptido a menudo tendrán una puntuación de hidropatía similar que el resto de aminoácido al que reemplazan en la secuencia de polipéptidos (referencia), se espera que la secuencia de la variante de polipéptidos presente un rendimiento del programa GREASE similar al de la secuencia de polipéptidos. Por ejemplo, en un aspecto particular, se puede esperar que una variante de polipéptido de la SEQ ID NO: 61 tenga un rendimiento del programa GREASE (o programa similar) que es más probable que el rendimiento de GREASE obtenido por la entrada de la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 61 que la obtenida usando un polipéptido CTLA-4 de WT (por ejemplo, hCTLA-4), que se puede determinar mediante inspección visual o comparación asistida por ordenador del rendimiento gráfico (por ejemplo, superposición/alineamiento gráficos) y/o rendimiento numérico proporcionado al someter la secuencia variante de ensayo y la SEQ ID NO: 1 al programa.

La conservación de restos de aminoácido en términos de homología funcional, homología de peso, y características de hidropatía, también se aplican a otras variantes de secuencia de polipéptidos proporcionadas por la divulgación, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, variantes de secuencia de polipéptidos de una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222.

En el presente documento se desvela al menos una de tales variantes de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una secuencia de polipéptidos recombinante seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222, en la que la secuencia de aminoácidos de la variante tiene al menos una de tal sustitución de resto de aminoácidos seleccionada de acuerdo con conservación basada en el peso u homología o patrón de hidropatía similar como se ha discutido anteriormente. Tales variantes de polipéptido que se han descrito anteriormente por lo general tienen una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86 y/o una capacidad para suprimir al menos un tipo de respuesta inmunológica como se ha descrito anteriormente y como se describe con más detalle a continuación en los Ejemplos.

Secuencias de Péptido Señal

Los polipéptidos de la invención también pueden comprender adicionalmente cualquier número y tipo adecuados de secuencias de aminoácidos adicionales, tales como uno o más fragmentos peptídicos. En una realización, tal polipéptido de la invención comprende adicionalmente un péptido señal. Generalmente, el péptido señal dirige el polipéptido recombinante al retículo endoplasmático cuando el polipéptido recombinante se expresa en una célula animal. Se puede incluir una secuencia señal que dirige el tráfico y/o secreción de orgánulos de al menos una parte del polipéptido después de expresión en una célula. Tales secuencias por lo general están presentes en la forma inmadura (es decir, no totalmente procesada) del polipéptido, y posteriormente se retiran/degradan mediante proteasas celulares para llegar a la forma madura de la proteína. Por ejemplo, un polipéptido o proteína de fusión de CTLA-4 mutante de la invención puede incluir cualquier secuencia señal o combinaciones de secuencias señal adecuadas que dirigen el polipéptido a compartimentos intracelulares, tal como una secuencia que dirige el polipéptido a transportar (por ejemplo, translocar) en (por ejemplo, de modo que la proteína se procesa mediante y se libera de) el retículo endoplasmático o ruta secretora (por ejemplo, el ER, Golgi, y otros orgánulos y compartimentos celulares relacionados secretores), el núcleo, y/o que dirige el polipéptido a secretar desde la célula, translocado en una membrana celular, o dirige una segunda célula separada de la célula aparte de la que se secreta la proteína. En este sentido, el polipéptido puede incluir una secuencia de dirección intracelular (o "señal de separación") que dirige polipéptido a un compartimento o compartimentos endosómicos y/o lisosómicos u otro compartimento rico en MHC II para estimular la presentación y respuesta de linfocitos CD4⁺ y/o T CD8⁺, tal como una señal de separación de dirección lisosómica/endosómica obtenida a partir de la proteína 1 de membrana asociada con lisosomas (por ejemplo, LAMP-1 - véase, por ejemplo, Wu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1161-75 (1995) y Raviprakash *et al.*, Virology 290: 74-82 (2001)), una parte u homólogo del mismo (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.633.234), u otra secuencia de dirección lisosómica, endosómica, y/o ER adecuada (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.248.565). En algunos aspectos, puede ser deseable que la secuencia de dirección intracelular se sitúe cerca o adyacente a una secuencia o secuencias de epítipo demostrada/identificada dentro del polipéptido, que se puede identificar mediante técnicas conocidas en la técnica, aumentando de ese modo la probabilidad de presentación de linfocitos T de fragmentos de polipéptido que comprenden tal epítipo(s). Tales polipéptidos se pueden expresar a partir de ADN o ARN aislado,

recombinante, o sintético suministrado a una célula hospedadora mediante uno o más de los vectores de transferencia de nucleótidos, incluyendo, por ejemplo, uno o más de los vectores de transferencia genética, que se describen adicionalmente en el presente documento.

5 El polipéptido puede comprender una secuencia señal que dirige el polipéptido al retículo endoplasmático (ER) (por ejemplo, facilita la translocación del ER del polipéptido) cuando el polipéptido se expresa en una célula de mamífero. El polipéptido puede comprender cualquier secuencia de dirección de ER. En la técnica se conocen muchas secuencias de dirección de ER. Los ejemplos de tales secuencias señal se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.846.540.

10 Las secuencias señal de ER/secreción usadas comúnmente incluyen la secuencia señal del factor alfa de levadura, y secuencia señal virales de mamífero tal como secuencia señal de gD del virus del herpes. Los péptido señal a modo de ejemplo para producción de *E. coli* incluyen la secuencia señal STII o Ipp de *E. coli*. Los ejemplos adicionales de secuencias señal se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.690.898, 5.284.768, 5.580.758, 5.652.139, y 5.932.445. Las secuencias señal adecuadas se pueden identificar usando la experiencia conocida en la materia. Por ejemplo, se puede usar del programa SignalP (que se describe, por ejemplo, en Nielsen *et al.*, (1997) Protein Engineering 10: 1-6), que está disponible al público a través del Center for Biological Sequence Analysis en el sitio web mundial denominado cbs.dtu.dk/services/SignalP, o software de análisis de secuencia similar capaz de identificar dominios similares a secuencia señal. En Nielsen *et al.*, Protein Eng. 10 (1): 1-6 (1997) se proporcionan técnicas relacionadas a identificar péptidos señal adecuados. La secuencia se pueden analizar de forma manual para características comúnmente asociadas con secuencias señal, tal como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Europea (Sol) N.º 0 621 337, Zheng y Nicchitta (1999) J. Biol. Chem. 274 (51): 36623-30, y Ng *et al.*, (1996) J. Cell Biol. 134 (2): 269-78.

25 Aspectos Adicionales

Cualquier polipéptido de la invención (incluyendo cualquier proteína de fusión de la invención) puede estar presente como parte de una secuencia de polipéptidos más grande, tal como sucede después de la adición de uno o más dominios o subsecuencias a la estabilización o detección o purificación del polipéptido. Tales dominios o subsecuencias se pueden fusionar, covalente al polipéptido de la invención, tal como alguien con experiencia podría entender fácilmente y ser capaz de construir. Una subsecuencia de purificación de polipéptidos puede incluir, por ejemplo, una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina, una fusión de GST, o cualquier otra subsecuencia de detección/purificación o "etiqueta" conocida en la técnica. Estos dominios o subsecuencias adicionales tienen poco o ningún efecto en la actividad del polipéptido de la invención, o se pueden retirar mediante etapas de procesamiento de síntesis posteriores tal como por tratamiento con una proteasa, inclusión de una inteína, o Similares.

Cualquier polipéptido de la invención (incluyendo cualquier proteína de fusión de la invención) también puede comprender uno o más aminoácidos modificados. El aminoácido modificado puede ser, por ejemplo, un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico, y/o un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico. La presencia de aminoácidos modificados puede ser ventajosa, por ejemplo, para (a) aumentar la semivida en suero del polipéptido y/o semivida *in vivo* funcional, (b) reducir la antigenicidad o inmunogenicidad del polipéptido, (c) aumentar la estabilidad de almacenamiento del polipéptido, (d) aumentar la biodisponibilidad, (e) disminuir la función efectora, y/o (f) disminuir o inhibir la autoasociación no deseada (por ejemplo, formación de agregados) entre dos o más moléculas de la invención (tal como entre dos o más dímeros de proteína de fusión de la invención). El aminoácido o aminoácidos se modifican, por ejemplo, de forma simultánea a la traducción o posterior a la traducción durante producción recombinante (por ejemplo, glicosilación unida a N en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se pueden modificar por medios de síntesis.

50 Los polipéptidos de la invención (incluyendo proteínas de fusión de la invención) que se describen en el presente documento se pueden modificar adicionalmente en diversas formas, por ejemplo, mediante modificación después de la traducción y/o modificación o variación sintética. Por ejemplo, los polipéptidos o proteínas de fusión de la invención se pueden glicosilar de forma adecuada, generalmente mediante expresión en una célula de mamífero. Por ejemplo, la divulgación incluye polipéptidos glicosilados que son capaces de unirse a CD86 y/o CD80, y/o tienen una capacidad para suprimir una respuesta inmunológica (por ejemplo, proliferación o activación de linfocitos T) como se describe en cualquier parte en el presente documento, en los que cada uno de dicho polipéptido glicosilado comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222.

65 Los polipéptidos de la invención se pueden someter a cualquier número de formas adicionales adecuadas de modificación o variación después de la traducción y/o sintética. Por ejemplo, la invención proporciona miméticos de proteína del polipéptido de la invención. Los miméticos de péptido se describen, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.668.110 y las referencias que se citan en ese documento.

En otro aspecto, un polipéptido o proteína de fusión de la invención se puede modificar mediante la adición de grupos protectores a las cadenas laterales de uno o más de los aminoácidos del polipéptido o proteína de fusión. Dichos grupos protectores pueden facilitar el transporte del polipéptido o proteína de fusión a través de membrana(s), si se desea, o a través de cierto tejido(s), por ejemplo, reduciendo la hidrofilia y aumentando la lipofilia del polipéptido o proteína de fusión. Los ejemplos de grupos protectores adecuados incluyen grupos protectores de éster, grupos protectores de amino, grupos protectores de acilo, y grupos protectores de ácido carboxílico, que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.121.236). Las proteínas de fusión sintéticas de la invención pueden tomar cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la proteína de fusión se puede modificar estructuralmente a partir de su configuración de origen natural para formar un péptido cíclico u otro péptido estructuralmente modificado.

Los polipéptidos de la invención también se pueden unir a uno o más polímeros no proteicos, generalmente un polímero sintético hidrófilo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquileno, usando técnicas bien conocidas en la técnica, tal como describe en, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.179.337, 4.301.144, 4.496.689, 4.640.835, 4.670.417, y 4.791.192, o un polímero similar tal como alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona (PVP).

La invención incluye conjugados que comprenden al menos un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante, CTLA-4-Ig mutante dimérico o monomérico, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante multimérico, CTLA-4-Ig mutante multimérico) y un resto no polipeptídico. El término "conjugado" (o indistintamente "polipéptido conjugado") pretende indicar una molécula heterogénea (en el sentido de compuesta o quimérica) formada por la unión covalente de uno o más polipéptido(s) a uno o más restos no polipeptídicos. La expresión "unión covalente" se refiere a que el polipéptido y el resto no polipeptídico se unen directamente de forma covalente entre sí, o también se unen indirectamente de forma covalente entre sí a través de un resto o restos de intervención, tales como un puente, espaciador, o resto por estos de unión usando un grupo de unión presente en el polipéptido. Preferentemente, el conjugado es soluble a concentraciones y condiciones pertinentes, es decir, soluble en fluidos fisiológicos, tal como sangre. Los ejemplos de polipéptidos conjugados de la invención incluyen polipéptidos glicosilados y/o PEGilados. La expresión "polipéptido no conjugado" se puede usar con respecto a la parte polipeptídica del conjugado. Un conjugado de ese tipo generalmente se une a CD80 (por ejemplo, hCD80) y/o CD86 (por ejemplo, hCD86) y/o un dominio extracelular de cualquiera o ambos (incluyendo hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica. Una respuesta inmunológica de ese tipo puede comprender, pero no se limita a, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis/producción de citoquina, inducción de marcadores de activación, producción de moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno, y/o respuesta a dependiente de linfocitos T. Los polipéptidos a modo de ejemplo incluyen los que tienen una identidad de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222.

La expresión "resto no polipeptídico" pretende indicar una molécula que escapa de conjugarse a un grupo de unión de un polipéptido de la invención. Los ejemplos preferentes de tal molécula incluyen moléculas del polímero, restos de azúcar, compuestos lipófilos, o agentes de derivatización orgánicos. Cuando se usa en el contexto de un conjugado como se describe en el presente documento se entenderá que el resto no polipeptídico se une a la parte polipeptídica del conjugado a través de un grupo de unión del polipéptido.

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

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

Un "sitio de O-glicosilación" comprende el grupo OH de un resto de serina o treonina.

La expresión "grupo de unión" pretende indicar un grupo de resto de aminoácidos del polipéptido capaz de acoplarse al resto no polipeptídico pertinente, tal como una molécula de polímero o resto de azúcar. Los ejemplos no limitantes de grupos de unión útiles y algunos restos no polipeptídicos correspondientes se proporcionan en la Tabla 2 que sigue a continuación.

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

Grupo de unión	Aminoácido	Ejemplos de restos no polipeptídicos	Ejemplos de método de conjugación / PEG activado	Referencia

-NH ₂	N-terminal, Lys	Polímero, por ejemplo, PEG	mPEG-SPA mPEG2-NHS mPEG2-butirAL D	Nektar Inc. Catálogo de 2003; véase también Nektar Therapeutics, Catálogo de 2005-06
-COOH	C-terminal, Asp, Glu	Polímero, por ejemplo, Resto de azúcar PEG	mPEG-Hz Acoplamiento <i>in vitro</i>	Nektar, Inc. Catálogo de 2003; véase también Nektar Therapeutics Catálogo de 2005-06
-SH	Cys	Polímero, por ejemplo, Resto de azúcar PEG	mPEG-VS mPEG2-MAL (mPEG-maleimida) Acoplamiento <i>in vitro</i>	Nektar Inc. Catálogo de 2003; Nektar Therapeutics 2005-2006 Catálogo; Delgado <i>et al.</i> , Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9 (3.4): 249-304 (1992)
-OH	Ser, Thr, OH-	Resto de azúcar	Glicosilación unida a O <i>in vivo</i>	
-CONH ₂	Asn como parte de un sitio de N-glicosilación	Resto de azúcar	N-glicosilación <i>in vivo</i>	
Resto aromático	Phe, Tyr, Trp	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	
-CONH ₂	Gln	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Yan y Wold, Biochemistry, 1984, 31 Jul; 23 (16): 3759-65
Aldehído Cetona	Carbohidrato oxidado	Polímero, por ejemplo, PEG, PEG-hidrazida	PEGilación	Andresz <i>et al.</i> , 1978, Makromol. Chem. 179: 301; WO 92/16555, WO 00/23114
Guanidino	Arg	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Lundblad y Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, FI
Anillo de imidazol	His	Resto de azúcar	Acoplamiento <i>in vitro</i>	Al igual que para guanidina

5 Para N-glicosilación *in vivo*, la expresión “grupo de unión” se usa de una forma no convencional para indicar los restos de aminoácido que constituyen un sitio de N-glicosilación (con la secuencia N-X-S/T/C, en la que X es cualquier resto de aminoácido excepto prolina, N es asparagina y S/T/C es cualquiera de serina, treonina o cisteína, preferentemente serina o treonina, y lo más preferentemente treonina). Aunque el resto de asparagina del sitio de N-glicosilación es uno al que según el resto de azúcar durante la glicosilación, tal unión no se puede conseguir a menos que los otros restos de aminoácido del sitio de N-glicosilación estén presentes. Por consiguiente, cuando el resto no polipeptídico es un resto de azúcar y la conjugación se va a conseguir mediante N-glicosilación, la expresión “resto de aminoácido que comprende un grupo de unión para el resto no polipeptídico” como se usa en relación con alteraciones de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención se va a entender que uno, dos o todos los restos de aminoácido que constituyen un sitio de N-glicosilación se va/se van a ver alterados en de un modo tal que cualquiera de un sitio de N-glicosilación funcional se introduce en la secuencia de aminoácidos, se retira de dicha secuencia o un sitio de N-glicosilación funcional se retiene en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, por sustitución de un resto de serina, que ya forma parte de un sitio de N-glicosilación, con un resto de treonina y viceversa).

20 El término “introducir” (es decir, un resto de aminoácido “introducido”, “introducción” de un resto de aminoácido) principalmente pretende hacer referencia a la sustitución de un resto de aminoácido existente por otro resto de aminoácido, pero también puede hacer referencia a inserción de un resto de aminoácido adicional.

El término “retirar” (es decir, un resto de aminoácido “retirado”, “retirada” de un resto de aminoácido) principalmente pretende hacer referencia a la sustitución del resto de aminoácido a retirar por otro resto de aminoácido, pero también puede hacer referencia a la delección (sin sustitución) del resto de aminoácido a retirar.

25 La expresión “resto de aminoácido que comprende un grupo de unión para el resto no polipeptídico” pretende indicar que el resto de aminoácido es uno al que se une el resto no polipeptídico (en el caso de un resto de aminoácido introducido) o a que se podría haber unido (en el caso de un resto de aminoácido retirado).

30 Por retirada y/o introducción de restos de aminoácido que comprenden un grupo de unión para el resto no polipeptídico es posible adaptar de forma específica el polipéptido de la invención con el fin de hacer que la molécula sea más susceptible de conjugación con el resto no polipeptídico de elección, para optimizar el padrón de conjugación (por ejemplo, para asegurar una distribución óptima de restos no polipeptídicos en la superficie del polipéptido y de ese modo, por ejemplo, proteger de forma eficaz los epítopos y otras partes de la superficie del

- polipéptidos sin alterar de forma significativa la función del mismo). Por ejemplo, mediante la introducción de grupos de unión, el polipéptido se altera en el contenido de los restos de aminoácido específicos a los que se une el resto no polipeptídico pertinente, de modo que se consigue una conjugación más eficaz, específica y/o extensa. Mediante la retirada de uno o más grupos de unión es posible evitar la conjugación al resto no polipeptídico en partes del
- 5 polipéptido en las que tal conjugación no es ventajosa, por ejemplo, a un resto de aminoácido situado en un cerca de un sitio funcional del polipéptido (porque la conjugación en tal sitio puede dar como resultado la inactivación o la reducción de la unión a CD80 o CD86 o reducción de la actividad inmunosupresora del conjugado resultante). Además, puede ser ventajoso retirar un grupo de unión situado cerca de otro grupo de unión.
- 10 El resto de aminoácido que comprende un grupo de unión para un resto no polipeptídico, ya sea un resto existente o un resto retirado o introducido, se selecciona basándose en la naturaleza del resto no polipeptídico y, en algunos casos, basándose en el método de conjugación a usar. Por ejemplo, cuando el resto no polipeptídico es una molécula de polímero, tal como una molécula obtenida a partir de polietilenglicol (PEG) u óxido de polialquileno (POA), los restos de aminoácido capaces de funcionar como un grupo de unión se pueden seleccionar entre el grupo
- 15 que consiste en cisteína, lisina (y/o el grupo amino N-terminal del polipéptido), ácido aspártico, ácido glutámico, histidina y arginina. Cuando el resto no polipeptídico es un resto de azúcar, el grupo de unión es un sitio de N- u glicosilación *in vivo* o *in vitro*, preferentemente un sitio de N-glicosilación.
- 20 En algunos casos, en la parte del polipéptido de CTLA-4 mutante de un conjugado de la invención, los grupos de unión situados en o cerca de los sitios de unión al receptor se retiran, tal como mediante sustitución del resto de aminoácido que comprende al grupo. En algunos casos, los restos de aminoácido que comprenden un grupo de unión para un resto no polipeptídico, tales como cisteína o lisina, a menudo nos introducen en un cerca del sitio de unión al receptor del polipéptido de CTLA-4 mutante.
- 25 Un polipéptido de CTLA-4 mutante de la invención se puede modificar con el fin de proteger y de ese modo modificar o destruir o de otro modo inactivar un epítipo presente en el polipéptido de CTLA-4 mutante, mediante conjugación a un resto no polipeptídico. Los epítipos de polipéptidos de CTLA-4 mutante se pueden identificar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, también conocidos como formación de mapas de epítipo, véase por ejemplo, Romagnoli *et al.*, J. Biol. Chem. 380 (5): 553-9 (1999), DeLisser HM, Methods Mol Biol, 1999, 96: 11-20, Van de
- 30 Water *et al.*, Clin. Immunol. Immunopathol. 85 (3): 229-35 (1997), Saint-Remy JM, Toxicology 119 (1): 77-81 (1997).
- El número exacto de grupos de unión disponibles para conjugación y presentes en el polipéptido de CTLA-4 mutante depende del efecto deseado a conseguir mediante la conjugación. El efecto a obtener, por ejemplo, depende de la naturaleza y el grado de conjugación (por ejemplo, la identidad del resto no polipeptídico, el número de restos no
- 35 politécnicos deseables o posibles para conjugar al polipéptido, cuando se deberían conjugar o cuando la conjugación se debería evitar, etc.). Por ejemplo, si se desea una reducción de la inmunogenicidad, el número (situación de) los grupos de unión debería ser suficiente para proteger la mayor parte de todos los epítipos. Esto normalmente se obtiene cuando se protege una proporción más elevada del polipéptido de CTLA-4 mutante. La protección eficaz de los epítipos normalmente se consigue cuando el número total de grupos de unión disponibles para conjugación está en el intervalo de 1-6 grupos de unión, por ejemplo, 1-5, tal como en el intervalo de 1-3, tal como 1, 2 o 3 grupos de
- 40 unión.
- La semivida *in vivo* funcional puede depender del peso molecular del conjugado, y el número de grupos de unión necesarios para proporcionar un aumento de la semivida depende de ese modo del peso molecular del resto no
- 45 polipeptídico en cuestión. Algunos de tales conjugados comprenden 1-6, por ejemplo, 1-5, tal como 1-3, por ejemplo, 1, 2 o 3 restos no polipeptídicos cada uno con un peso molecular de aproximadamente 100-2000 Daltons (Da), tal como de aproximadamente 200 Da, de aproximadamente 300 Da, de aproximadamente 400 Da, de aproximadamente 600 Da, de aproximadamente 900 Da, de aproximadamente 1000 Da, o de aproximadamente 2-
- 50 40 kDa, tal como de aproximadamente 2 kDa, de aproximadamente 5 kDa, de aproximadamente 12 kDa, de aproximadamente 15 kDa, de aproximadamente 20 kDa, de aproximadamente 30 kDa, de aproximadamente 40 kDa, o de aproximadamente 60 kDa.
- En el conjugado de la invención, algunos, la mayoría, o esencialmente todos los grupos de unión que se pueden conjugar están ocupados por el resto no polipeptídico pertinente.
- 55 El conjugado de la invención puede presentar una o más de las siguientes propiedades mejoradas: (a) aumento de la semivida en suero y/o semivida *in vivo* funcional, (b) reducción de antigenicidad o inmunogenicidad, (c) aumento de la estabilidad durante el almacenamiento, (d) aumento de la biodisponibilidad, (e) disminución de la función efectora, o (f) disminución o inhibición de la auto-asociación (por ejemplo, disminución de la formación de
- 60 agregados) entre dos o más moléculas de la invención. Por ejemplo, el conjugado puede presentar una reducción de la inmunogenicidad en comparación con hCTLA-4 o en comparación con el polipéptido no conjugado correspondiente, por ejemplo, una reducción de al menos un 10 %, tal como una reducción de al menos un 25 %, tal como una reducción de al menos un 50 %, por ejemplo, una reducción de al menos un 75 % en comparación con el polipéptido no conjugado o en comparación con un hCTLA-4. El conjugado puede presentar un aumento de la
- 65 semivida *in vivo* funcional y/o aumento de la semivida en suero en comparación con una molécula de referencia, tal como hCTLA-4 o en comparación con el polipéptido no conjugado correspondiente. Los conjugados precedentes en

- particular son los conjugados en los que la proporción entre la semivida *in vivo* funcional (o semivida en suero) de dicho conjugado y la semivida *in vivo* funcional (o semivida en suero) de dicha molécula de referencia es al menos 1,25, tal como al menos 1,50, tal como al menos 1,75, tal como al menos 2, tal como al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7, tal como al menos 8. La semivida se determina de forma conveniente en un animal experimental, tal como rata o mono, y se puede basar en administración por vía intravenosa o por vía subcutánea. En un aspecto adicional, el conjugado puede presentar un aumento de la biodisponibilidad en comparación con una molécula de referencia tal como un hCTLA-4 o un polipéptido no conjugado correspondiente.
- La molécula de polímero a acoplar al polipéptido puede ser cualquier molécula de polímero adecuada, tal como un homopolímero o heteropolímero natural o sintético o, generalmente con un peso molecular en el intervalo de 300-100.000 Da, tal como 300-20.000 Da, más preferentemente en el intervalo de 500-10.000 Da, incluso más preferentemente en el intervalo de 500-5000 Da.
- Los ejemplos de homopolímeros incluyen un polioli (es decir poli-OH), una poliamina (es decir poli-NH₂) y un ácido policarboxílico (es decir, poli-COOH). Un heteropolímero es un polímero, que comprende uno o más grupos de acoplamiento diferentes, tales como, por ejemplo, un grupo hidroxilo y un grupo amino. Los ejemplos de moléculas del polímero adecuadas incluyen moléculas del polímero seleccionadas entre el grupo que consiste en óxido de polialquileno (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, alcohol poli-vinílico (PVA), poli-carboxilato, poli-(vinilpirrolidona), polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido málico, dextrano incluyendo carboximetil-dextrano, o cualquier otro biopolímero adecuado para reducir la inmunogenicidad y/o aumentar la semivida *in vivo* funcional y/o semivida en suelo. Otro ejemplo de una molécula de polímero es la albúmina humana u otra proteína del plasma abundante. Generalmente, los polímeros obtenidos a partir de polialquilenglicol son biocompatibles, no tóxicos, no antigénicos, no inmunogénicos, tienen diversas propiedades de solubilidad en agua, y son fácilmente excretados por los organismos vivos.

El PEG es la molécula de polímero preferente a usar, ya que solamente tiene pocos grupos reactivos capaces de reticulación en comparación, por ejemplo, con polisacáridos tales como dextrano, y similares. En particular, el PEG mono funcional, por ejemplo, monometoxipolietilenglicol (mPEG), es de interés ya que su química de acoplamientos relativamente sencilla (solamente un grupo reactivo está disponible para conjugación con grupos de unión en el polipéptido). En consecuencia, el riesgo de reticulación se elimina, los conjugados de polipéptido resultantes son más homogéneos y la reacción de las moléculas del polímero con el polipéptido es más fácil de controlar. Cuando la molécula está PEGilada, normalmente comprende 1, 2, 3, 4 o 5 moléculas de polietilenglicol (PEG). Cada molécula de molécula de PEG puede tener un peso molecular de aproximadamente 5 kDa (kilo Dalton) a 100 kDa, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 40 kDa. Las moléculas de PEG adecuadas están disponibles en Shearwater Polymers, Inc. y Enzon, Inc. y se pueden seleccionar entre SS-PEG, NPC-PEG, aldehído-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC, SC-PEG, mPEG tresilado (Documento US 5.880.255), un oxicarbonil-oxi-N-dicarboxiimida-PEG (documento US 5.122.614).

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado aislado o sintético que comprende: (a) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante, CTLA-4-Ig mutante dimérico o monomérico, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante multimérico, CTLA-4-Ig mutante multimérico); y (b) al menos un resto no polipeptídico, tal como, por ejemplo, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1, 2 o 3 restos no polipeptídicos unidos al polipéptido, en el que el conjugado se une a CD80 (por ejemplo, hCD80) y/o CD86 (por ejemplo, hCD86) y/o un dominio extracelular de cualquiera o ambos (incluyendo hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inducir una respuesta inmunológica (por ejemplo, respuesta inmunológica dependiente de linfocitos T). Los polipéptidos a modo de ejemplo incluyen los que tienen una identidad de secuencia de al menos un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222. En algunos casos, el conjugado comprende un resto no polipeptídico. En algunos casos, el conjugado comprende dos, tres, cuatro o más restos no polipeptídicos. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos del polipéptido del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones cada una de las cuales introduce un grupo de unión para el resto no polipeptídico (por ejemplo, mediante sustitución de un resto de aminoácido de la secuencia de polipéptidos con un resto diferente que comprende un grupo de unión para el resto no polipeptídico, o mediante inserción en la secuencia de polipéptidos de un resto de aminoácido adicional que comprende un grupo de unión para el resto no polipeptídico).

Un conjugado puede comprender dos o más polipéptidos de la invención. En algunos casos, un resto no polipeptídico se une de forma covalente a cualquiera o ambos de tales polipéptidos. Si el conjugado comprende dos o más polipéptidos idénticos de la invención, el mismo tipo y número de restos no polipeptídicos generalmente se unen a cada uno de tales polipéptidos, normalmente de la misma manera al grupo de unión(s) correspondiente en cada polipéptido. Como se ha indicado anteriormente, el resto no polipeptídico puede comprender, por ejemplo, una molécula de azúcar, que opcionalmente se puede unir a un sitio de N-glicosilación, o un polímero, tal como, por ejemplo, un resto de polietilenglicol. El resto de polietilenglicol se puede unir de forma covalente a un resto de cisteína o resto de lisina del polipéptido de la invención. En algunos casos, el resto de polietilenglicol se une de forma covalente al grupo amino N-terminal del polipéptido. Un conjugado que comprende un CTLA-4-Ig mutante de

la invención se puede describir como un conjugado de CTLA-4-Ig mutante de la invención. También se incluyen multímeros de conjugados. Los conjugados multiméricos incluyen dos o más conjugados, en los que al menos un conjugado es un conjugado de la invención que comprende al menos un polipéptido de la invención. Los conjugados en un conjugado multimérico pueden ser, pero no es necesario que sean, idénticos entre sí.

5 Como se ha discutido anteriormente, los polipéptidos de la invención, incluyendo proteínas de fusión de la invención, Comúnmente se pueden someter a glicosilación. Los polipéptidos y proteínas de fusión de la invención se pueden someter adicionalmente a (o modificar de modo que se sometan a) otras formas de modificación posterior a la traducción incluyendo, por ejemplo, hidroxilación, unión a lípido o derivado lipídico, metilación, miristilación, pegilación, fosforilación, y sulfatación. Otras modificaciones después de la traducción a las que se puede someter un polipéptido o proteína de fusión de la invención incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de fosotidilinositol, reticulación, ciclado, formación de enlace disulfuro, desmetilación, racemización, Formación de ancla de GPI, yodación, oxidación, procesamiento proteolítico, prenilación, racemización, selenoilación, arginilación, y ubiquitinación. Otras modificaciones de proteína comunes se describen en, por ejemplo, Creighton, mencionado anteriormente, Seifter *et al.*, Meth. Enzymol. 18: 626-646 (1990), y Rattan *et al.*, Ann. NY Acad. Sci. 663: 48-62 (1992). Las modificaciones después de la traducción para polipéptidos o proteínas de fusión expresadas a partir de ácidos nucleicos en células hospedadoras varían dependiendo del tipo de hospedador o tipo de célula hospedadora en la que se expresa. Por ejemplo, la glicosilación a menudo no se produce en hospedadores bacterianos tales como *E. coli* y varía considerablemente en sistemas de baculovirus en comparación con sistemas de célula de mamífero. Por consiguiente, cuando se desea la glicosilación (que normalmente es el caso para la mayoría de los polipéptidos de la presente invención), un polipéptido o proteína de fusión se debería expresar (producir) en un hospedador de glicosilación, generalmente una célula eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero o una célula de insecto). Las modificaciones para el polipéptido o proteína de fusión en términos de modificación después la traducción se pueden verificar mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo, por ejemplo, difracción de rayos X, formación de imágenes por RMN, espectrometría de masas, y/o cromatografía (por ejemplo, cromatografía en fase inversa, cromatografía por afinidad, o GLC).

El polipéptido o proteína de fusión también o como alternativa puede comprender cualquier número adecuado de aminoácidos de origen no natural (por ejemplo, β aminoácidos) y/o aminoácidos alternativos (por ejemplo, selenocisteína), o análogos de aminoácido, tales como los que se enumeran en el MANUAL OF PATENT EXAMINING PROCEDURE § 2422 (7^a Revisión - 2000), que can se pueden incorporar mediante síntesis de proteínas, tal como a través de síntesis de proteínas en fase sólida (como se describe en, por ejemplo, Merrifield, Adv. Enzymol. 32: 221-296 (1969) y otras referencias citadas en el presente documento). Un polipéptido o proteína de fusión de la invención se puede modificar adicionalmente mediante la inclusión de al menos un aminoácido modificado. La inclusión de una o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, (a) aumento De la semivida en suero del polipéptido o proteína de fusión, (b) reducción de la antigenicidad del polipéptido o proteína de fusión, o (c) aumento de la estabilidad durante el almacenamiento del polipéptido o proteína de fusión. El aminoácido o aminoácidos se modifican, por ejemplo, por vía simultánea a la traducción o después de la traducción durante la producción recombinante (por ejemplo, sitio de glicosilación unido a N en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifica mediante medios de síntesis. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranilgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado, y similares. Hay multitud de referencias adecuadas para dirigir a alguien con experiencia en la modificación de aminoácidos en la bibliografía. Los protocolos a modo de ejemplo se encuentran en Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, Towata, NJ. El aminoácido modificado se puede seleccionar a partir de un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico, y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.

La invención también proporciona polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) que tienen las características que se han descrito anteriormente que comprenden adicionalmente secuencias de aminoácidos adicionales que influyen en la función biológica (por ejemplo, inmunogenicidad, dirección, y/o semivida) del polipéptido (o proteína de fusión).

55 Un polipéptido o proteína de fusión de la invención puede incluir adicionalmente una secuencia de dirección distinta de, o además de, una señal secuencia. Por ejemplo, el polipéptido o proteína de fusión puede comprender la secuencia que se dirige a un receptor en un tipo de célula en particular (por ejemplo, un monocito, célula dendrítica, o célula asociada) para proporcionar administración dirigida del polipéptido a tales células y/o tejidos relacionados. Las secuencias señal se han descrito anteriormente, e incluyen secuencias de localización/ancla de membrana (por ejemplo, secuencia de transferencia de parada, secuencias de ancla de GPI), y similares.

Un asociado de fusión particularmente útil para un polipéptido de la invención (incluyendo una proteína de fusión de la invención) es una secuencia peptídica que facilita la purificación del polipéptido, por ejemplo, una subsecuencia de purificación de polipéptido. Un polinucleótido de la invención puede comprender una secuencia codificante fusionada en marco a una secuencia de aminoácidos marcadora que, por ejemplo, facilita la purificación del polipéptido codificado. Tales dominios peptídicos que facilitan la purificación o subsecuencias de purificación de polipéptido

incluyen, pero no se limitan a, péptidos de quelación de metal, tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, tal como un péptido de hexa-histidina u otra secuencia de polihistidina, una secuencia que codifica una etiqueta de ese tipo se incorpora en el vector pQE disponible en QIAGEN, Inc. (Chatsworth, California), una secuencia que se une al glutatión (por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST)), una etiqueta de hemaglutinina (HA) (que corresponde a un epítipo obtenido a partir de la proteína hemaglutinina de la gripe; Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984)), secuencias de proteína de unión a maltosa, el epítipo FLAG usado en el sistema de purificación de extensión/afinidad de FLAGS (Immunex Corp, Seattle, WA) (los epítipos de FLAG disponibles en el mercado también están disponibles a través de Kodak (New Haven, Connecticut)), una etiqueta de epítipo E (etiqueta de E), tiorredoxina (TRX), avidina, y similares. En la técnica se han descrito etiquetas de epítipo que facilitan la codificación (véase, por ejemplo, Whitehorn *et al.*, Biotechnology 13: 1215-19 (1995)). Un polipéptido puede incluir una etiqueta e-his, que puede comprender una secuencia de polihistidina y una secuencia anti-e-epítipo (Pharmacia Biotech Catalog); las etiquetas de e-his se pueden preparar mediante técnicas convencionales. La inclusión de una secuencia conectora de polipéptidos que se pueden escindir con proteasa entre el dominio de purificación y el polipéptido es útil para facilitar la purificación. Los restos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad de metales iónicos inmovilizados (IMAC), como se describe en Porath *et al.*, Protein Expression and Purification 3: 263-281 (1992)), mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un método para separar el polipéptido de la proteína de fusión. Los vectores pGEX (Promega; Madison, WI) también se pueden usar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción a perlas de ligando-agarosa (por ejemplo, glutatión-agarosa en el caso de fusión de GST) seguido de elución en presencia de ligando libre. Los ejemplos adicionales de subsecuencias que facilitan la codificación de polipéptidos y el uso de las mismas para purificación de proteínas se describen en, por ejemplo, Publ. de Sol. de Patente Internacional N.º WO 00/15823. Después de expresión del polipéptido de interés y aislamiento del mismo mediante tales asociados de fusión o de otro modo como se ha descrito anteriormente, se pueden usar etapas de repliegamiento de proteínas, si se desea, para completar la configuración del polipéptido maduro.

Una proteína de fusión de la invención también puede incluir uno o más fragmentos peptídicos adicionales o porciones de péptido que estimulan la detección de la proteína de fusión. Por ejemplo, un fragmento o porción de péptido indicador (por ejemplo, proteína fluorescente de color verde (GFP), β -galactosidasa, o un dominio detectable de la misma) se puede incorporar en la proteína de fusión. Las moléculas marcadas adicionales que se pueden conjugar con el polipéptido de la invención incluyen radionúclidos, enzimas, fluoróforos, ligandos de molécula pequeña, y similares. Tales asociados de fusión que estimulan la detección son particularmente útiles en proteínas de fusión usadas en técnicas de diagnóstico que se discuten en cualquier parte en el presente documento.

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

Los fragmentos peptídicos de proteína de fusión o porciones de péptido se pueden asociar en cualquier manera adecuada. Los diversos fragmentos o porciones de polipeptídicos de la proteína de fusión se pueden asociar de forma covalente (por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o disulfuro). Los fragmentos o porciones de polipéptido se pueden fusionar directamente (por ejemplo, el extremo C-terminal de una secuencia antigénica o inmunogénica de la invención se puede fusionar al extremo N-terminal de una secuencia de purificación o secuencia inmunogénica heteróloga). La proteína de fusión puede incluir cualquier número adecuado de enlaces modificados, por ejemplo, isósteros, dentro o entre las porciones peptídicas. Como alternativa o adicionalmente, la proteína de fusión puede incluir un conector peptídico entre uno o más fragmentos o porciones de polipéptido que incluye una o más secuencias de aminoácidos que no forman parte de las porciones del péptido biológicamente activas. Se puede usar cualquier conector peptídico. Un conector de ese tipo puede ser de cualquier tamaño adecuado. Generalmente, el conector es inferior a aproximadamente 30 restos de aminoácido, inferior a aproximadamente 20 restos de aminoácido, y/o menos de 10 restos de aminoácido. Predominantemente el conector puede comprender o consistir en restos de aminoácido neutros. Los conectores adecuados generalmente se describen en, por ejemplo, documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.990.275, 6.010.883, 6.197.946, y en la Solicitud de Patente Europea 0 035 384. Si se desea la separación de fragmentos peptídicos o porciones peptídicas se puede usar un conector que facilite la separación. Un ejemplo de un conector de ese tipo se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.719.326. Pueden ser ventajosos los conectores "flexibles", que generalmente están formados por combinaciones de restos de glicina y/o serina. Los ejemplos de tales conectores se describen en, por ejemplo, McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-554 (1990), Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988), Glockshuber *et al.*, Biochemistry 29: 1362-1367 (1990), y Cheadle *et al.*, Molecular Immunol. 29: 21-30 (1992), Bird *et al.*, Science 242: 423-26 (1988), y documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.672.683, 6.165.476, y 6.132.992.

El uso de un conector también puede reducir la respuesta inmunológica no deseada para la proteína de fusión creada por la fusión de los dos fragmentos peptídicos o porciones peptídicas, que puede dar como resultado un epítipo de MHC I y/o MHC II no pretendido presente en la proteína de fusión. Además del uso de un conector, las

secuencias de epítomos no deseadas identificadas o secuencias adyacentes se pueden PEGilar (por ejemplo, mediante inserción de restos de lisina para estimular la unión a PEG) para proteger los epítomos identificados de la exposición. Otras técnicas para reducir la inmunogenicidad de la proteína de fusión de la invención que se pueden usar en asociación con la administración de la proteína de fusión incluyen las técnicas que se proporcionan en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.093.699.

Preparación de Polipéptidos

A continuación se describen métodos recombinantes para producir y aislar polipéptidos de la invención (incluyendo proteínas de fusión de la invención). Además de producción recombinante, los polipéptidos se pueden producir mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co, San Francisco; Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc 85: 2149-2154). La síntesis peptídica se puede realizar usando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Por ejemplo, las subsecuencias se pueden sintetizar por vía química por separado y se pueden combinar usando métodos químicos para proporcionar polipéptidos de CTLA-4 mutante o fragmentos funcionales de los mismos. Como alternativa, tales secuencias pueden pedir a cualquier número de compañías que están especializadas en la producción de polipéptidos. Lo más comúnmente, los polipéptidos de la invención se producen mediante expresión de ácidos nucleicos codificantes y recuperación de polipéptidos, por ejemplo, como se describe a continuación.

La invención proporciona métodos para producir polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) de la invención. Uno de tales métodos comprende introducir, en una población de células, de cualquier ácido nucleico que se describe en el presente documento, que está unido de forma operativa a una secuencia reguladora eficaz para producir el polipéptido codificado, cultivar las células en un medio de cultivo para producir el polipéptido, y aislar el polipéptido de las células o del medio de cultivo. Se usa una cantidad de ácido nucleico suficiente para facilitar la absorción por las células (transfección) y/o expresión del polipéptido. El medio de cultivo puede ser cualquiera que se describe en el presente documento y en los Ejemplos. Las personas con experiencia en la materia conocen medios adicionales. El ácido nucleico se introduce en tales células mediante cualquier método de suministro que se describe en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, inyección, dispositivo de inyección sin aguja, pistola genética, electroporación (por ejemplo, dispositivo de electroporación de ADN, Inovio Biomedical Corp. (San Diego)), administración transdérmica, absorción pasiva, etc. El ácido nucleico de la invención puede ser parte de un vector, tal como un vector de expresión recombinante, incluyendo un vector plásmido de ADN, vector viral, o cualquier vector que se describe en el presente documento. El ácido nucleico o vector que comprende un ácido nucleico de la invención se puede preparar y formular como se ha descrito en el presente documento, anteriormente, y en los Ejemplos que siguen a continuación. Tal ácido nucleico o vector de expresión se puede introducir en una población de células de un mamífero *in vivo*, o se pueden retirar de mamífero células seleccionadas del mamífero (por ejemplo, células tumorales) y el vector de expresión de ácido nucleico se puede introducir *ex vivo* en la población de tales células en la cándida suficiente de modo que se produce esa absorción y expresión del polipéptido codificado. O, un ácido nucleico o vector que comprende un ácido nucleico de la invención se produce usando células cultivadas *in vitro*. En un aspecto, el método para producir un polipéptido de la invención comprende introducir en una población de células un vector de expresión recombinante que comprende cualquier ácido nucleico que se describe en el presente documento en una cantidad y fórmula de modo que se producirá esa absorción del vector y expresión del polipéptido; administrar el vector de expresión en un mamífero mediante cualquier formato de introducción/suministro que se describe en el presente documento; y aislar el polipéptido de mamífero o de un producto secundario de mamífero. A continuación se describen con detalle en la sección titulada "Ácidos Nucleicos de la Invención" células hospedadoras adecuadas, vectores de expresión, métodos para transfección de células hospedadoras con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la invención, cultivos celulares, y procedimientos para producir y recuperar al polipéptido de un cultivo celular. En los Ejemplos, que siguen a continuación, se discuten métodos de producción adicionales.

Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos de la invención (que incluyen proteínas de fusión de la invención) se puede someter a diversos cambios, tales como una o más inserciones, deleciones, y sustituciones de aminoácido o ácido nucleico, ya sea conservativas o no conservativas, incluyendo cuando, por ejemplo, tales cambios pudieran proporcionar ciertas ventajas en su uso, por ejemplo, en uso terapéutico o profiláctico o administración o aplicación de diagnóstico. Los procedimientos para preparar variantes de polipéptidos usando sustituciones, deleciones, inserciones, y adiciones de aminoácido son algo rutinario en la técnica. Los polipéptidos y variantes de los mismos que tienen la capacidad deseada para unirse a CD80 y/o CD86, o un fragmento de los mismos (por ejemplo, ECD) o una capacidad para suprimir una respuesta inmunológica *in vitro* o *in vivo* como se describe en detalle en cualquier parte en el presente documento se identifican fácilmente mediante ensayos conocidos por las personas con experiencia en la materia y con los ensayos que se describen en el presente documento. Véanse, por ejemplo, los ensayos que se presentan en los Ejemplos que siguen a continuación.

Los ácidos nucleicos de la invención, que se discuten con mayor detalle a continuación, también se pueden someter a diversos cambios, tales como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones de modo que un codón en particular codifica el mismo aminoácido o uno diferente, dando como resultado una

sustitución ya sea conservativa o no conservativa, o una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos en la secuencia. Los ácidos nucleicos también se pueden modificar para que incluyan uno o más codones que proporcionan una expresión óptima en un sistema de expresión (por ejemplo, células de mamífero o sistema de expresión de mamífero), mientras, si se desea, dicho uno o más codones aún codifican el mismo aminoácido(s). Los procedimientos para preparar variantes de ácidos nucleicos usando instituciones, deleciones, inserciones, y adiciones de ácido nucleico, y de generar codones, son de rutina en la técnica, y las variantes de ácido nucleico que codifican polipéptidos que tienen las propiedades deseadas que se describen en el presente documento (por ejemplo, una capacidad para unirse a CD80 y/o CD86, y/o suprimir una respuesta inmunológica *in vitro* o *in vivo*) se identifican fácilmente usando los ensayos que se describen en el presente documento. Tales cambios en el ácido nucleico podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso o administración, terapéuticos o profilácticos, o aplicación del diagnóstico. En un aspecto, los ácidos nucleicos y polipéptidos se pueden modificar en un número de formas siempre y cuando comprendan una secuencia de ácidos nucleicos o polipéptidos esencialmente idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos del respectivo ácido nucleico que codifica polipéptido de CTLA-4 mutante o polipéptido de CTLA-4 mutante de la invención, respectivamente.

ÁCIDOS NUCLEICOS

En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos aislados o recombinantes (en el presente documento también denominados polinucleótidos), denominados de forma colectiva "ácidos nucleicos de la divulgación" ("polinucleótidos de la divulgación"), que codifican polipéptidos de la divulgación.

Los ácidos nucleicos de la divulgación, incluyendo todos los que se describen a continuación, son útiles en producción recombinante (por ejemplo, expresión) de polipéptidos de la divulgación, por lo general a través de expresión de un vector de expresión de plásmido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido o fragmento del mismo; como agentes terapéuticos; como agentes profilácticos; como herramientas de diagnóstico; como sondas de diagnóstico para la presencia de ácidos nucleicos complementarios o parcialmente complementarios (incluyendo para detección de un ácido nucleico de CTLA-4 de tipo silvestre). Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la divulgación, incluyendo los que se describen a continuación, son útiles porque codifican polipéptidos que son útiles para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica (por ejemplo, activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2), inducción de marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2), inflamación, producción de anticuerpos anti-colágeno, y/o respuesta de anticuerpo dependiente de los linfocitos T) aplicaciones *in vitro* y/o *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, métodos profilácticos y/o terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos, y afecciones del sistema inmunológico en los que es deseable la supresión de una respuesta inmunológica (por ejemplo, métodos para tratar enfermedades y trastornos autoinmunes y métodos para inhibir el rechazo de un tejido, célula, o trasplante de órgano de un donante por un receptor). Los ácidos nucleicos de la divulgación también se prevén incorporar en vectores de expresión útiles para terapia genética, vacuna de ADN, y terapia inmunosupresora. Los usos adicionales de los ácidos nucleicos y vectores de la divulgación que comprenden tales ácidos nucleicos se describen en cualquier parte en el presente documento.

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

Por ejemplo, en el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo, en el que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 o un fragmento de polipéptido de CD80 y/o CD86 (por ejemplo, un dominio extracelular de CD80 y/o CD86), y/o suprime una respuesta inmunológica *in vitro* y/o *in vivo*, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. Los detalles adicionales con respecto a las propiedades funcionales y características de tales polipéptidos se han discutido anteriormente en "Polipéptidos de la divulgación". Algunos de tales ácidos nucleicos codifican un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aminoácidos aproximadamente igual a la longitud de aminoácidos del ECD de hCTLA-4; tal como, por ejemplo, 110-138, 112-132, 118-130, 119-129, 120-128, 121-127, 122-126, 123-125, o 124 restos de aminoácido. Los ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante que comprenden Las secuencias que se presentan en las SEQ ID NOS: 1-73, pero no se limitan a, por ejemplo, ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos que se presentan en las SEQ ID NOS: 80-152, respectivamente. Por ejemplo, un ácido nucleico modo de ejemplo que codifica el polipéptido que se muestra en la

SEQ ID NO: 1 (clon D3-1) es el ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID:80. También se incluyen fragmentos de cualquiera de tales ácidos nucleicos, en los que tal fragmento codifica un polipéptido que se une a CD80 y/o CD86 y/o un ECD de cualquiera o ambos, y/o tiene una capacidad para suprimir una respuesta inmunológica.

5 En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido (por ejemplo, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos (a) que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 en no más de 6 restos de aminoácido (por ejemplo, no más de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 restos de aminoácido), y (b) en el que el resto de aminoácido en la secuencia de polipéptidos en la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 es idéntico al resto de aminoácido en la posición correspondiente de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en el que el polipéptido se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera o ambos, y/o inhibe una respuesta inmunológica *in vitro* y/o *in vivo*, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. Es decir, el resto de aminoácido en tal posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 en tal secuencia de polipéptidos seleccionada no sufre delección o sustitución. Algunos de tales ácidos nucleicos codifican polipéptidos que comprenden una secuencia que se diferencia de la secuencia de polipéptidos seleccionada en no más de 6 restos de aminoácido y que incluye restos de aminoácido en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, y/o 14 seleccionadas entre las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 del aminoácido que son idénticos a los restos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la secuencia de polipéptidos seleccionada. Tales polipéptidos se pueden diferenciar de la secuencia de polipéptidos seleccionada por delección(s) de aminoácido, adición(s), y/o sustitución(s) de aminoácido. Una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución conservativa o no conservativa. Las sustituciones conservativas a modo de ejemplo se discuten en la sección titulada "Variación de Secuencia". Algunos de tales polipéptidos comprenden una secuencia que tiene una longitud de aproximadamente 118-130, 119-129, 120-128, 121- 127, 122-126, 123-125, o 124 restos de aminoácido. Los detalles adicionales de las propiedades funcionales y características de tales polipéptidos se han discutido anteriormente. Los ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los que comprenden las secuencias de nucleótidos que se presentan en las SEQ ID NOS: 80-152.

30 En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que comprende (i) una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a cualquier secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 y (ii) un resto de fenilalanina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 70 de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-73, en el que el polipéptido se une a hCD80 y/o hCD86 o un ECD del mismo y/o inhibe una respuesta inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. Algunos de tales ácidos nucleicos codifican polipéptidos que comprende uno o más de los siguientes con respecto a las secuencias seleccionadas: un resto de ácido glutámico en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 24; un resto de asparagina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 30; un resto de isoleucina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 32; un resto de metionina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 50; un resto de lisina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 54; un resto de ácido glutámico en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 55; un resto de ácido aspártico en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 56; un resto de prolina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 64; un resto de serina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 65; y un resto de ácido glutámico en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 104. Algunos de tales ácidos nucleicos codifican polipéptidos que comprenden una secuencia de polipéptidos que tiene una longitud de aproximadamente 118-130, 119-129, 120-128, 121- 127, 122-126, 123- 125, o 124 restos de aminoácido. Los detalles adicionales de las propiedades funcionales y características de tales polipéptidos se han discutido anteriormente.

50 En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica cualquier multímero de cualquier polipéptido que se ha descrito anteriormente (por ejemplo, dímero, tetrámero, etc.). Como se discute con mayor detalle en cualquier parte, un dímero que comprende dos polipéptidos de la divulgación (incluyendo dos proteínas de fusión) generalmente se forma durante el procesamiento celular mediante la generación de uno o más enlaces disulfuro covalentes entre resto(s) de cisteína en un polipéptido y resto(s) de cisteína en el segundo polipéptido. Otros multímeros se pueden formar del mismo modo. Por ejemplo, en el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de polipéptido recombinante que comprende dos polipéptidos, en el que cada uno de tales polipéptidos comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en el que el dímero se unía hCD80 y/o hCD86 y/o inhibe una respuesta inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica cualquier proteína de fusión de la invención, incluyendo cualquier proteína de fusión multimérica de la divulgación (por ejemplo, dímeros, tetrámeros, etc.). En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que

tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con respecto a al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, y (b) un polipéptido de Ig, en el que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para suprimir una respuesta inmunológica, o una
 5 secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. El polipéptido de Ig puede comprender un polipéptido de Fc de Ig, incluyendo, por ejemplo, un polipéptido de Fc de Ig que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184-186 y 218. Una proteína de fusión dimerica que comprende dos de tales proteínas de fusión monoméricas generalmente se forma
 10 durante el procesamiento celular mediante la generación de enlaces disulfuro covalentes entre restos de cisteína en una proteína de fusión monomérica y restos de cisteína en la segunda proteína de fusión monomérica. Otros multímeros se pueden formar del mismo modo. Los detalles adicionales de las propiedades funcionales y características de tales proteínas de fusión se han discutido anteriormente.

15 En el presente documento también se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de proteína (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante monomérico), cada proteína de fusión monomérica que comprende: (a) un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, y (b) un polipéptido de Ig, en el que el dímero de proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir o suprimir una respuesta
 20 inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. Las dos proteínas de fusión monoméricas, después de expresión, se unen en conjunto mediante al menos un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína presentes en cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante monomérica. El polipéptido de Ig puede comprender un polipéptido de Fc de Ig, incluyendo, por ejemplo, un polipéptido de Fc de Ig que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184-186 y 218. En algunos casos, el extremo C-terminal del polipéptido de (a) se une con enlace covalente o se fusiona con el extremo N-terminal del polipéptido de Fc de Ig de (b). Los detalles adicionales de las propiedades funcionales y características de tales dímeros se han discutido anteriormente.

Un codón de parada (por ejemplo, tga) por lo general se incluye en el extremo C-terminal de cada secuencia de ácidos nucleicos cuando la secuencia se incluye en un vector de expresión para expresión de una proteína de interés. Por ejemplo, cada una de las secuencias de nucleótidos de la invención que codifican un polipéptido CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4 mutante de forma opcional puede incluir adicionalmente un codón de parada en el extremo C-terminal, tal como TAA. Un codón de parada diferente se puede sustituir por el TAA, tal como un codón de parada de TGA. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión de tipo silvestre (por ejemplo, hCTLA-4-Ig, hCD86-Ig, etc.) también puede incluir un codón de parada en su extremo C-terminal. Cada una de las secuencias de nucleótidos además puede incluir opcionalmente en el extremo N-terminal una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal para facilitar la secreción de un polipéptido de CTLA-4 mutante o proteína de fusión.

Los dímeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo incluyen los que comprenden secuencias de polipéptidos que se muestran en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222. Los ácidos nucleicos a modo de ejemplo que codifican las proteínas de fusión de CTLA-4 Ig mutante de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 220 y 222 se presentan en la SEQ ID NO: 153-158, 201-204, y 223-224, respectivamente. Las secuencias de proteínas de fusión de las SEQ ID NOS: 205-210, 211-214, 219, y 221 son idénticas a las secuencias de proteínas de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 220, y 222, respectivamente, excepto porque las secuencias de proteínas de las SEQ ID NOS: 205-210 no incluyen el resto de lisina (K) C-terminal; como se ha explicado anteriormente, se cree que el resto de lisina C-terminal predicho, que está codificado por el codón AAA que precede inmediatamente al codón de parada de TAA de cada una de tales secuencias de polinucleótidos, se escinde de la proteína de fusión resultante durante el procesamiento o la secreción. Las secuencias de ácidos nucleicos de las SEQ ID NOS: 153-158, 201-204, y 223-224 codifican las secuencias de proteínas de fusión de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 220, y 222, respectivamente, cada una de las cuales después de escisión/pérdida del resto de K C-terminal da como resultado las secuencias de proteínas de fusión que se muestran en las SEQ ID NOS: 205-210, 211-214, 219, y 221, respectivamente.

Cada una de las secuencias de polinucleótidos SEQ ID NOS: 153-158, 201-204, y 223-224 también incluye en su extremo N-terminal una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal que se muestra en la SEQ ID NO: 181 o 215, péptido señal que por último se escinde para formar la proteína de fusión madura. Los restos de nucleótidos 1-111 de cada una de las secuencias de polinucleótidos de las SEQ ID NOS: 153-158, 201-204, y 223-224, tal como se hace el recuento desde el extremo N-terminal de cada una de tales secuencias de polinucleótidos (los restos de nucleótido 1-111 se presentan en la SEQ ID NO: 215), codifican el péptido señal de hCTLA-4 de WT de 37 restos de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 216, péptido señal que por último se escinde después de expresión del monómero o dímero de la proteína de fusión de CTLA-4 mutante o maduro; de ese modo,

para cada una de las secuencias de ácidos nucleicos de las SEQ ID NOS: 153-158, 201-204, y 223-224, el primer codón que codifica el primer resto de aminoácido (metionina) de la proteína de fusión de IgG2 madura está formado por los restos de nucleótido 112- 114 de dicha secuencia de nucleótidos. Como se ha indicado anteriormente, en algunos casos, la secuencia del péptido señal puede comprender solamente los restos de aminoácido 1-35 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 182 y la secuencia de nucleótidos que codifica este péptido señal de 35 restos de aminoácido se muestra en la SEQ ID NO: 181. Sin embargo, los restos de lisina (K) y alanina (A) codificados en las posiciones 36 y 37, respectivamente (codificados por los dos codones AAA-GCC), no están presentes en la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante madura resultante y se cree que se escinden de la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante madura durante el procesamiento. La secuencia de proteínas de CTLA-4 mutante madura generalmente comienza con el resto de metionina presente en el resto de aminoácido en la posición 38 de la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante codificada.

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

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

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % con respecto a una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 153-158, 201-204, y 223-224, en el que tal ácido nucleico que codifica un dímero de proteína de CTLA-4-Ig mutante se une a CD80 y/o CD86 (y/o un CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de proteína de fusión (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante monomérico), en el que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende: (1) un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 en no más de 6 restos de aminoácido, y en el que el resto de aminoácido en la secuencia de polipéptidos en la posición 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 es idéntico al resto de aminoácido en la posición correspondiente de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada (por ejemplo, un polipéptido seleccionado entre las SEQ ID NOS: 1-73), y (2) un polipéptido de Fc de Ig, en el que el dímero se une a CD80 y/o CD86 (y/o un CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. Los detalles adicionales de las propiedades funcionales y características de tales dímeros se han discutido anteriormente. También se desvela un ácido nucleico recombinante o aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión monomérica de ese tipo que se une a CD80 y/o CD86 (y/o un CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dímero de proteína de fusión (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que

comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, dos CTLA-4-Ig mutantes monoméricos), en el que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende: (1) un polipéptido de dominio extracelular de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que (a) se diferencia de una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 en no más de 6 restos de aminoácido, y (b) comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, o 85 con respecto a la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 159; y (2) un polipéptido de Ig, en el que el dímero de proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o inhibe una respuesta inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. Los detalles adicionales de las propiedades funcionales y características de tales dímeros se han discutido anteriormente. El polipéptido de Ig puede comprender un polipéptido de Fc de Ig, que incluye, por ejemplo, un polipéptido de Fc de Ig que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184-186 y 218. Algunos de tales polipéptidos de (a) comprenden al menos una sustitución en una posición de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 159 seleccionada entre el grupo que consiste en A50M, M54K, G55E, N56D, S64P, I65S, y S70F. Algunos de tales polipéptidos de (a) comprenden adicionalmente una sustitución de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 159 en la posición 104 (por ejemplo, L104E/D), posición 30 (por ejemplo, T30N/D/A), y/o posición 32 (por ejemplo, V32I). También se desvela un ácido nucleico recombinante o aislado que codifica tal proteína de fusión monomérica que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica.

En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un dímero de proteína de fusión (por ejemplo, dímero de CTLA-4-Ig mutante) que comprende dos proteínas de fusión monoméricas (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante monomérico), en el que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende: (1) un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante) que comprende una secuencia de polipéptidos que (i) tiene una identidad de secuencia de al menos un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73 y (ii) incluye un resto de fenilalanina en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 70 de dicha secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-73; y (2) un polipéptido de Ig, en el que el dímero de proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig), y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo. El polipéptido de Ig codificado puede comprender un polipéptido de Fc de Ig que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 184-186 y 218. Algunos de tales dímeros codificados comprenden uno o más de los siguientes con respecto a dicha secuencia de polipéptidos seleccionada de (1)(i): un resto de Glu en una posición que corresponde a la posición 24; un resto de Asn en una posición que corresponde a la posición 30; un resto de Ile en una posición que corresponde a la posición 32; un resto de Met en una posición que corresponde a la posición 50; un resto de Lys en una posición que corresponde a la posición 54; un resto de Glu en una posición que corresponde a la posición 55; un resto de Asp en una posición que corresponde a la posición 56; un resto de Pro en una posición que corresponde a la posición 64; un resto de Ser en una posición de aminoácido que corresponde a la posición 65; y un resto de Glu en una posición que corresponde a la posición 104. Los detalles adicionales de las propiedades funcionales y características de tales dímeros se han discutido anteriormente. También se proporciona un ácido nucleico recombinante o aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión monomérica de ese tipo que se une a CD80 y/o CD86 (y/o CD80-Ig y/o CD86-Ig) y/o tiene una capacidad para inhibir una respuesta inmunológica.

También se desvelan fragmentos de cualquiera de tales ácidos nucleicos de la divulgación que se han descrito anteriormente, en los que tales fragmentos codifican un polipéptido que se une a hCD80 y/o hCD86 y/o un ECD de cualquiera o ambos, y/o tiene una capacidad para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica. Muchos fragmentos de estos ácidos nucleicos expresarán polipéptidos que se unen a hCD80 and/hCD86 o un ECD del mismo, o suprimen una respuesta inmunológica, propiedades que se pueden identificar fácilmente con una experimentación razonable. Los gametos de nucleótidos por lo general comprenden al menos 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 950, 1000 o más bases de nucleótidos.

La divulgación incluye un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una proteína que comprende un péptido señal y un polipéptido que se desvela en el presente documento (que incluye una proteína de fusión dimerica o monomérica), tal como un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, que se une a CD80 y/o CD86 y/o suprime una respuesta inmunológica en ensayos y/o métodos *in vitro* o *in vivo* y/o como se describe con detalle en cualquier parte en el presente documento. La secuencia de péptido señal codificada, que dirige la secreción del polipéptido maduro a través de una membrana celular procariota o eucariota, generalmente está unida con enlace covalente al extremo amino terminal de dicho polipéptido. Se pueden usar diversos péptidos señal, incluyendo, por ejemplo, la secuencia del péptido señal que se presenta en la SEQ ID NO: 182, que está codificada, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 181, o la secuencia del péptido señal que se presenta en la SEQ ID NO: 216, que está codificada, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 215. La divulgación también incluye un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una proteína que comprende un péptido señal, polipéptido de ECD de CTLA-4

mutante, dominio transmembrana, y/o dominio citoplasmático como se ha discutido con más detalle anteriormente.

5 La secuencia del péptido señal de la proteína de CTLA-4 humana de longitud completa se puede usar para dirigir la expresión o secreción de un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante recombinante o proteína de fusión CTLA-4-Ig mutante de la invención. En un aspecto, el péptido señal (SP) de la proteína hCTLA-4 comprende los restos de aminoácido 1-37 de la proteína hCTLA-4; esta secuencia del péptido señal se muestra en la SEQ ID NO: 216. En este caso, la proteína hCTLA-4 generalmente comienza con el resto de metionina en la posición 38, y los restos de aminoácido de la proteína hCTLA-4 madura se numeran en consecuencia comenzando con este resto de metionina que se designa como el primer aminoácido (es decir, preocupa la posición 1). Por lo tanto, un péptido señal que
10 comprende la secuencia peptídica que se muestra en la SEQ ID NO: 216 se puede fusionar o unir al extremo amino (N) terminal de un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención, tal como mediante un enlace covalente, con el fin de facilitar la expresión o secreción del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, respectivamente. Un ácido nucleico modo de ejemplo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal de la secuencia de hCTLA-4 de la SEQ ID NO: 216 se presenta en la SEQ ID NO: 215.

20 Cuando la secuencia del péptido señal de la SEQ ID NO: 216 que está fusionada o unida al extremo N-terminal de un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, después de expresión o secreción de dicho polipéptido o proteína de fusión, el péptido señal se escinde; el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante maduro resultante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante madura generalmente comienza con el resto de metionina en la posición 38, y los restos de aminoácido del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante maduro o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante madurase numeran en consecuencia comenzando con este resto de metionina siendo designado como el primer aminoácido (es decir, que ocupa la posición 1).

25 La divulgación incluye un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEQ ID NO: 216) y un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73), en el que el péptido señal se une de forma covalente al extremo N-terminal del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante. También se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEQ ID NO: 216) y un CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el
30 grupo de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222), en el que el péptido señal se une de forma covalente al extremo N-terminal del CTLA-4-Ig mutante. También se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 215) que codifica un péptido señal (por ejemplo, SEQ NO: 216) y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73) o una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 74- 79, 197-200, 205-214, y 219-222).

40 En un aspecto alternativo, el péptido señal de la proteína hCTLA-4 de longitud completa comprende los restos 1-35 de la proteína hCTLA-4 de longitud completa; este péptido señal comprende la secuencia peptídica que se muestra en la SEQ ID NO: 182. Sin embargo en este caso, los dos restos de aminoácido lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 generalmente están ausentes de la proteína hCTLA-4 secretada madura tal como se determina mediante secuenciación de proteínas. Por lo tanto, la proteína hCTLA-4 madura resultante del mismo modo comienza con el resto de metionina en la posición 38, y los restos de aminoácido de la proteína hCTLA-4 madura se numeran en consecuencia comenzando con este resto de metionina en la posición 38 de la proteína hCTLA-4 que se designa como el primer aminoácido de la proteína hCTLA-4 madura. Dado que los restos de aminoácido lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 de longitud completa no están presentes en la proteína hCTLA-4 madura resultante, se cree que se han escindido de la proteína hCTLA-4 madura durante el procesamiento. Un ácido nucleico a modo de ejemplo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del péptido señal de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 182)
50 se muestra en la SEQ ID NO: 181.

Un péptido señal que comprende la secuencia peptídica que se muestra en la SEQ ID NO: 182 se puede fusionar o unir al extremo N-terminal de un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención, tal como mediante un enlace covalente, con el fin de facilitar la expresión o secreción del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, respectivamente. Cuando la secuencia del péptido señal de la SEQ ID NO: 182 fusiona o se une al extremo N-terminal de un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, después de expresión o secreción del polipéptido o proteína de fusión, el péptido señal se escinde; el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante maduro resultante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante maduras sin embargo comienza generalmente con el resto de metionina en la posición 38, Y los restos de aminoácido del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante maduro o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante madura se numeran en consecuencia comenzando con este resto de metionina que se designa como el primer aminoácido (es decir, que ocupa la posición 1). Dado que los restos de aminoácido lisina (K) y alanina (A) en las posiciones 36 y 37, respectivamente, de la proteína hCTLA-4 de longitud completa no están presentes en el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante maduro resultante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante madura, se cree que se han escindido de dicho polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante durante el procesamiento.
65

La divulgación incluye un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEQ ID NO: 182) y un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73), en el que el péptido señal se une de forma covalente al extremo N-terminal del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante. También se desvela un polipéptido aislado o recombinante que comprende un péptido señal (por ejemplo, SEQ ID NO: 182) y un CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222), en el que el péptido señal se une de forma covalente al extremo N-terminal del CTLA-4-Ig mutante. También se desvela un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 181) que codifica un péptido señal (por ejemplo, SEQ NO: 182) y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73) o una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, una secuencia seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 74- 79, 197-200, 205-214, y 219-222).

Un ácido nucleico como se desvela en el presente documento puede comprender adicionalmente una o más secuencias de nucleótidos adicionales adecuadas. Por ejemplo, dado que un polipéptido de la divulgación (que incluye una proteína de fusión de la invención) puede comprender una o más secuencias de polipéptidos adicionales, tal como, por ejemplo, una subsecuencia de purificación de polipéptido (tal como, por ejemplo, una subsecuencia seleccionada entre una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una secuencia de polihistidina, y una fusión de GST), secuencia de péptido señal, etc., la divulgación incluye ácidos nucleicos que codifican todos esos polipéptidos que comprenden tales secuencias adicionales. Los péptidos señal a modo de ejemplo, que después de expresión por lo general se unen con enlace covalente al extremo N-terminal de un polipéptido de la invención, se han discutido anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-79, 197-200, 205-214, y 219-222 puede comprender adicionalmente un ácido nucleico que codifica un péptido señal, tal como la secuencia del péptido señal de la SEQ ID NO: 182, tal como, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que se presenta en la SEQ ID NO: 181, o la secuencia del péptido señal que se presenta en la SEQ ID NO: 216, que está codificada, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 215. Tales secuencias de nucleótidos se pueden fusionar directamente en conjunto, en marco de lectura apropiado, de modo que el ácido nucleico resultante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

Un ácido nucleico de la invención se puede aislar mediante cualquier técnica adecuada, de las cuales en la técnica se conocen varias. Un ácido nucleico aislado de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que se prepara en una célula hospedadora y que posteriormente se purifica sustancialmente mediante cualquier técnica de purificación de ácido nucleico) se puede volver a introducir en una célula hospedadora o se puede volver a introducir en un entorno celular u otro entorno biológico o composición en el que ya no es la especie de ácido nucleico dominante y ya no se separa de cualquier otro ácido nucleico.

Casi cualquier ácido nucleico aislado o recombinante de la invención se puede insertar en o fusión a una molécula de ácido nucleico más grande adecuada (que incluye por ejemplo, pero no se limita a, un cromosoma, un plásmido, un vector o casete de expresión, un genoma viral, una secuencia genética, un elemento de expresión lineal, un genoma bacteriano, un genoma de planta, o un cromosoma artificial, tal como un cromosoma artificial de mamífero (MAC), o los homólogos de levadura y bacterianos del mismo (es decir, un YAC o un BAC) para formar un ácido nucleico recombinante usando técnicas convencionales. Con otro ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención se puede fusionar a secuencias de nucleótidos más pequeñas, tales como secuencias promotoras, secuencias inmunoestimuladoras, y/o secuencias que codifican otros aminoácidos, tales como otros epítopos antigénicos y/o secuencias de coectores para formar un ácido nucleico recombinante.

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

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) de la invención pueden tener cualquier composición química adecuada que permita la expresión de un polipéptido de la invención u otra actividad biológica deseada (por ejemplo, hibridación con los ácidos nucleicos). Los polinucleótidos de la invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, es incluyen ARNm, ARNc, ARN y ADN recombinante o sintético, y ADNc. Los ácidos nucleicos de la invención generalmente son moléculas de ADN, y normalmente moléculas de ADN bicatenario. Sin embargo, también se proporciona ADN monocatenario, ARN monocatenario, ARN bicatenario, y ácidos nucleicos de ADN/ARN híbridos o combinaciones de los mismos que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la invención. Un ácido nucleico de la invención puede incluir cualquier base de nucleótido adecuada, análogo de base, y/o cultura principal (por ejemplo, una estructura principal formada por, o que incluye, un fosfotioato, en lugar de fosfodiéster, unión, por ejemplo, ADN que comprende una estructura principal de fosfotioato o fosfotioato). Un ácido nucleico de la invención, si es monocatenario, puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (es decir, anti sentido o complementaria). Además de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia codificante de un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante), el polinucleótido de la invención

puede comprender una o más secuencias de nucleótidos codificantes adicionales, con el fin de codificar, por ejemplo, una proteína de fusión, secuencia de dirección (otra distinta a una secuencia señal), o similar (cuyos ejemplos más particulares se discuten adicionalmente en el presente documento), y/o puede comprender secuencias de nucleótidos no codificantes, tal como intrones, secuencia terminadora, o regiones sin traducir en la posición 5' y/o 3', regiones que pueden ser eficaces para la expresión de la secuencia codificante en un hospedador adecuado, y/o elementos de control, tales como un promotor (por ejemplo, promotor de origen natural o recombinante o barajado).

Las modificaciones para un ácido nucleico son particularmente tolerables en la 3ª posición de una secuencia de codón de ARNm que codifica un polipéptido de ese tipo. En aspectos particulares, al menos una porción del ácido nucleico comprende una estructura principal de fosforotioato, que incorpora al menos un análogo de nucleótido sintético en lugar de o además de los nucleótidos de origen natural en la secuencia de ácidos nucleico. Además o como alternativa, el ácido nucleico puede comprender la adición de bases distintas a la guanina, adenina, uracilo, timina, y citosina. Las modificaciones de ese tipo se pueden asociar con una semivida más larga, y por lo tanto pueden ser deseables en vectores de ácidos nucleicos de la invención. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos recombinantes y vectores de ácido nucleico (que se discuten adicionalmente a continuación), ácidos nucleicos o vectores que comprenden al menos una de las modificaciones mencionadas anteriormente, o cualquier combinación adecuada de los mismos, en los que el ácido nucleico persiste más tiempo en un hospedador mamífero que un ácido nucleico sustancialmente idénticos sin una modificación o modificaciones de ese tipo. Los ejemplos de nucleótidos modificados y/o no citosina, no adenina, no guanina, no timina que se pueden incorporar en una secuencia de nucleótidos de la invención se proporcionan en, por ejemplo, el MANUAL OF PATENT EXAMINING PROCEDURE § 2422 (7ª Revisión - 2000).

Se debe entender que un ácido nucleico que codifica al menos uno de los polipéptidos de la invención (que incluye una proteína de fusión de la invención), incluyendo los que se han descrito anteriormente y en cualquier parte en el presente documento, no se limita a una secuencia que codifica directamente la expresión o producción de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que da como resultado un polipéptido de la invención a través de expresión similar a inteína (como se describe, por ejemplo, en Colson y Davis (1994) *Mol. Microbiol.* 12 (3): 959-63, Duan *et al.*, (1997) *Cell* 89 (4): 555-64, Perler (1998) *Cell* 92 (1): 1-4, Evans *et al.*, (1999) *Biopolymers* 51 (5): 333-42, y de Grey, *Trends Biotechnol.* 18 (9): 394-99 (2000)), o una secuencia de nucleótidos que comprende intrones de auto-corte y empalme (u otras transcripciones de ARN de auto-corte y empalme), que forman una secuencia que codifica polipéptido recombinante intermedio (como se describe en, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.010.884). El ácido nucleico también o como alternativa puede comprender secuencias que dan como resultado otras modificaciones de corte y empalme a nivel del ARN para producir una transcripción de ARNm que codifica el polipéptido y/o a nivel del ADN por medio de mecanismos de trans-corte y empalme antes de la transcripción (los principios relacionados con tales mecanismos se describen en, por ejemplo, Chabot, *Trends Genet.* (1996) 12 (11): 472-78, Cooper (1997) *Am. J. Hum. Genet.* 61 (2): 259-66, y Hertel *et al.*, (1997) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9 (3): 350-57). Debido a la degeneración inherente del código genético, varios ácidos nucleicos pueden codificar cualquier polipéptido particular de la invención. Por lo tanto, por ejemplo, cualquiera de los ácidos nucleicos particulares que se describen en el presente documento se pueden modificar mediante reemplazo de uno o más codones con un codón equivalente (con respecto al aminoácido denominado requerido por el codón) basándose en la degeneración del código genético. También se pueden usar otras secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene en la misma secuencia o una funcionalmente equivalente como una secuencia de polipéptidos de la invención para sintetizar, clonar y expresar tal polipéptido.

En general, cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención se puede modificar para aumentar la expresión en un hospedador particular, usando las técnicas que se usan a modo de ejemplo en el presente documento con respecto a los ácidos nucleicos que se han descrito anteriormente que codifican un polipéptido de la invención (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante). Cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención como se describe en el presente documento se pueden optimizar con codón para expresión en un mamífero en particular (normalmente seres humanos). En la técnica se conocen diversas técnicas para optimización con codón. Los codones que se usa nomás a menudo en un hospedador en particular se denominan codones óptimos, y los que no se utilizan muy a menudo se clasifican como codones raros o de bajo uso (véase, por ejemplo, Zhang, S. P. *et al.*, (1991) *Gene* 105: 61-72). Los codones se pueden sustituir para reflejar el uso del codón preferente del hospedador, un proceso denominado "optimización con codón" o "control para sesgos de codón de especies". La secuencia codificante optimizada que comprende codones preferentes para un hospedador procarionta o eucariota en particular se puede usar para aumentar la tasa de traducción o para producir transcripciones de ARN recombinante que tienen propiedades deseables, tales como una semivida más larga, en comparación con transcripciones producidas a partir de una secuencia no optimizada. Se conocen técnicas para producir secuencias optimizadas con codón (véase, por ejemplo, E. *et al.*, (1989) *Nuc. Acids Res.* 17: 477-508). Los codones de parada de traducción también se pueden modificar para reflejar la preferencia del hospedador. Por ejemplo, los codones de parada preferentes para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA respectivamente. El codón de parada preferente para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* prefieren usar UAA como el codón de parada (véase, por ejemplo, Dalphin, M.E. *et al.*, (1996) *Nuc. Acids Res.* 24: 216-218). La colocación de los codones en el contexto con respecto a otros codones también puede influir en las propiedades biológicas de secuencias de ácidos nucleicos, y los inventores también contemplan modificaciones de ácidos nucleicos para proporcionar una colocación de contexto de codón común para un hospedador en particular. Por lo tanto, una secuencia de ácidos

nucleicos de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos optimizada por codón, es decir, frecuencia de codón optimizada y/o par de codón (es decir, contexto de codón) optimizado para una especie en particular (por ejemplo, el polipéptido se puede expresar a partir de una secuencia de polinucleótidos optimizada para expresión en seres humanos mediante sustitución de codones humanos "raros" basándose en frecuencia de
 5 codón, o contexto de codón, tal como mediante el uso de técnicas tales como las que se describen en Buckingham *et al.*, (1994) *Biochimie* 76 (5): 351-54 y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.082.767, 5.786.464, y 6.114.148).

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden modificar mediante truncamiento con uno o más restos de la porción
 10 del extremo C-terminal de la secuencia. Además, en el extremo de la secuencia de nucleótidos se pueden incluir diversos codones de parada o terminación como se discute adicionalmente a continuación.

Uno o más ácidos nucleicos de la invención se pueden incluir en un vector, célula, o entorno hospedador en el que la
 15 secuencia de nucleótidos codificante de la invención es un gen heterólogo.

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

Los ácidos nucleicos de la invención también se pueden encontrar en combinación con formulaciones de
 30 composición habitual de ácidos nucleicos, incluyendo en presencia de vehículos, tampones, adyuvantes,
 excipientes, diluyentes, y similares, como conocen las personas con una experiencia habitual en la materia.

A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos en particular que se describe en el
 presente documento también incluye de forma implícita variantes conservativamente modificadas de la misma (por
 ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias y así como la secuencia que se indica
 35 de forma explícita. De forma específica, las sustituciones de codón degenerado se pueden conseguir generando
 secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones (o todos) seleccionados está sustituida con restos
 de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, (1991) *Nucl. Acid Res.* 19: 5081; Ohtsuka *et al.*, (1985) *J. Biol. Chem.*
 260: 2605-2608; Cassol *et al.*, (1992); Rossolini *et al.*, (1994) *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98).

40 Preparación y Modificación de Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener y/o general mediante aplicación de cualquier técnica
 adecuada de síntesis, manipulación, y/o aislamiento, o combinaciones de las mismas. Los procedimientos a modo
 de ejemplo se describen a continuación. Por ejemplo, los polinucleótidos de la invención generalmente se producen
 45 mediante técnicas convencionales de síntesis de ácidos nucleicos, tales como técnicas de síntesis en fase sólida
 conocidas en la técnica. En tales técnicas, normalmente se sintetizan fragmentos de hasta aproximadamente
 100 bases de forma individual, a continuación se unen (por ejemplo, mediante métodos de ligadura enzimática o
 química, o métodos de recombinación mediados por polimerasa) para formar esencialmente cualquier secuencia de
 ácidos nucleicos continua deseada. La síntesis de los ácidos nucleicos de la invención también se puede facilitar (o
 50 como alternativa conseguir), mediante síntesis química usando, por ejemplo, el método clásico de fosforamidita, que
 se describe en, por ejemplo, Beaucage *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* 22: 1859-69, o el método descrito por
 Matthes *et al.*, (1984) en *EMBO J.* 3: 801-05, por ejemplo, como generalmente se pone en práctica en métodos de
 síntesis automatizados. El ácido nucleico de la invención también se puede producir mediante el uso de un
 sintetizador de ADN automático. Otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados se
 55 describen en, por ejemplo, Itakura *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323 (1984), Itakura *et al.*, *Science* 198: 1056
 (1984), e Ike *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 11: 477 (1983).

De forma conveniente, los ácidos nucleicos hechos a medida se pueden adquirir en diversas fuentes comerciales,
 tales como la Midland Certified Reagent Company (mrcr@oligos.com), la Great American Gene Company (dirección
 60 de la página web mundial genco.com), ExpressGen Inc. (dirección de la página web mundial expressgen.com),
 Operon Technologies Inc. (Alameda, CA). De forma análoga, los péptidos anticuerpos hechos a medida se pueden
 adquirir en cualquiera de diversas fuentes, por ejemplo, PeptidoGenic (pkim@ccnet.com), HTI Bio-products, Inc.
 (dirección de la página web mundial htibio.com), y BMA Biomedicals Ltd. (Reino Unido), Bio.Synthesis, Inc.

Ciertos nucleótidos de la invención también se pueden obtener mediante identificación sistemática de bibliotecas
 65 ADNc usando sondas de oligonucleótido que se pueden hibridar a o polinucleótidos de amplificación por PCR que

codifican los polipéptidos de la invención. Los procedimientos para identificar sistemáticamente y aislar clones de ADNc y procedimientos de amplificación por PCR son bien conocidos por las personas con experiencia en la materia; a continuación se describen procedimientos a modo de ejemplo (véanse, por ejemplo, los procedimientos que se describen en los Ejemplos que siguen a continuación). Tales técnicas se describen en, por ejemplo, Berger y Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques", en *Methods in Enzymol.* Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, CA ("Berger"); Sambrook, mencionado anteriormente; y Ausubel, mencionado anteriormente. Algunos ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener alterando una estructura principal de origen natural, por ejemplo, mediante mutagénesis, recombinación *in vitro* (por ejemplo, barajado), o recombinación de oligonucleótidos. En otros casos, tales polinucleótidos se pueden preparar mediante simulación informática o a través de métodos de recombinación de oligonucleótidos como se describen las referencias que se citan en el presente documento.

Las técnicas de ADN recombinante útiles en la modificación de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica (por ejemplo, digestión de endonucleasa de restricción, ligadura, transcripción inversa y producción de ADNc, y PCR). Las técnicas de tecnología de ADN recombinante y principios relacionados con las mismas se proporcionan en, por ejemplo, Mulligan (1993) *Science* 260: 926-932, Friedman (1991) *THERAPY FOR GENETIC DISEASES*, Oxford University Press, Ibanez *et al.*, (1991) *EMBO J.* 10: 2105-10, Ibanez *et al.*, (1992) *Cell* 69: 329-41 (1992), y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075, and 4.810.648, y se describen más particularmente en Sambrook *et al.*, (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Press, y en la tercera edición del mismo (2001), Ausubel *et al.*, (1994-1999), *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (con Greene Publishing Associates para algunas ediciones), Berger, mencionado anteriormente, y Watson, mencionado anteriormente.

Secuencias Codificantes Modificadas

Cuando sea apropiado, los ácidos nucleicos de la invención se pueden modificar para aumentar o potenciar la expresión en un hospedador particular mediante modificación de la secuencia con respecto al uso de codón y/o contexto de codón, dado el hospedador(es) particular en el que se desea la expresión del ácido nucleico. Los codones que se usan lo más a menudo en un hospedador particular se denominan codones óptimos, y los que no se usan muy a menudo se clasifican como codones raros o de bajo uso (véase, por ejemplo, Zhang, S. P. *et al.*, (1991) *Gene* 105: 61-72). Los codones se puede sustituir para reflejar el uso del codón preferente del hospedador, un proceso denominado "optimización de codón" o "control para sesgo de codón de especies".

La secuencia codificante optimizada que comprende codones preferentes para un hospedador procariota o eucariota en particular se puede usar para aumentar la tasa de traducción o para producir transcripciones de ADN recombinante que tienen propiedades deseables, tal como una semivida más larga, en comparación con transcripciones producidas a partir de una secuencia no optimizada. Se conocen técnicas para producir secuencias optimizadas con codón (véase, por ejemplo, Murray, E. *et al.*, (1989) *Nucl. Acids Res.* 17: 477-508). Los codones de parada de la traducción también se puede modificar para reflejar la preferencia del hospedador. Por ejemplo, los codones de parada preferentes para *S. cerevisiae* y mamíferos son UAA y UGA respectivamente. El codón de parada preferente para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* prefieren usar UAA como el codón de parada (véase, por ejemplo, Dalphin, M.E. *et al.*, (1996) *Nucl. Acids Res.* 24: 216-218, para discusión). La colocación de los codones en contexto con respecto a otros codones también puede influir en las propiedades biológicas de secuencias de ácidos nucleicos, y los inventores también contemplan modificaciones de ácidos nucleicos para proporcionar una colocación de contexto de codón común para un hospedador en particular. Por lo tanto, una secuencia de ácidos nucleicos de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos no optimizada por codón, es decir, optimizada por frecuencia de codón y/o optimizada por par de codón (es decir, contexto de codón) para una especie en particular (por ejemplo, el polipéptido se puede expresar a partir de la secuencia de polinucleótidos optimizada para expresión en seres humanos mediante reemplazo de codones humanos "raros" basándose en la frecuencia del codón, o contexto de codón, tal como usando técnicas tales como las que se describen en Buckingham *et al.*, (1994) *Biochimie* 76 (5): 351-54 y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.082.767, 5.786.464, y 6.114.148). Por ejemplo, en el presente documento se desvela un ácido nucleico que comprende una variante de secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 80, en el que la variante de secuencia de nucleótidos se diferencia de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 80 en la sustitución de los codones "raros" para un hospedador en particular con codones comúnmente expresados en el hospedador, codones que codifican el mismo resto de aminoácido que los codones "raros" incluidos en la SEQ ID NO: 80.

VECTORES, COMPONENTES DEL VECTOR, Y SISTEMAS DE EXPRESIÓN

La presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden uno o más de los ácidos nucleicos de la invención como se ha descrito anteriormente de manera amplia. Tales construcciones pueden comprender un vector, tal como un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, una partícula viral, una partícula similar a un virus, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o similares, o vector no replicante, tal como un liposoma, ADN desnudo o conjugado, micropartícula de ADN, en las que se ha insertado al menos una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, en una orientación directa o inversa. En un aspecto particular de esta realización, la construcción comprende adicionalmente una o más secuencias reguladoras,

incluyendo, por ejemplo, un promotor, unido de forma operativa a una secuencia de ácidos nucleicos de la invención (por ejemplo, ácido nucleico que codifica un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante aislado o recombinante o CTLA-4-Ig mutante dimérico o monomérico). Los expertos en la materia conocen grandes números de vectores y promotores adecuados y están disponibles en el mercado. En algunos casos, un vector, tal como, por ejemplo, un virus o partícula similar a un virus, también incluye o como alternativa puede incluir uno o más polipéptidos de la invención tal como, por ejemplo, incorporado en el revestimiento del virus o partícula similar a un virus. Los vectores pueden ser útiles como agentes de suministro para el suministro o administración a un sujeto de genes o proteínas exógenos. Los vectores de la presente invención, incluyendo los que se describen en el presente documento, son útiles como agentes de suministro para el suministro o administración de ácidos nucleicos y/o polipéptidos de la invención.

Los textos generales que describen técnicas de biología molecular útiles en el presente documento, incluyendo el uso de vectores, promotores, y muchos otros temas pertinentes, incluyen Berger, mencionado anteriormente, Sambrook (1989), mencionado anteriormente, y Ausubel, mencionado anteriormente. Los ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a las personas con experiencia a través de métodos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación de Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), por ejemplo, para la producción de los ácidos nucleicos homólogos de la invención se encuentran en Berger, Sambrook, y Ausubel, todos mencionados anteriormente, así como en Mullis *et al.*, (1987) documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.*, eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis"); Amheim y Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwoh *et al.*, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173- 1177; Guatelli *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878; Lomeli *et al.*, (1989) J. Clin. Chem. 35: 1826-1831; Landegren *et al.*, (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560-569; Barringer *et al.*, (1990) Gene 89: 117-122, y Sookninan y Malek (1995) Biotechnology 13: 563-564.

PCR generalmente se refiere a un procedimiento en el que cantidades diminutas de un trozo específico de ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN) se amplifican mediante métodos bien conocidos la técnica (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.683.195 y otras referencias citadas anteriormente). Generalmente, la información de la secuencia desde los extremos de la región de interés o más allá se usa para el diseño de cebadores de oligonucleótido. La secuencia de tales cebadores será idéntica o similar a la de las hebras opuestas Del molde a amplificar. Los nucleótidos en la posición 5' terminal de las hebras opuestas pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ADN específicas o de ADN específicas, secuencias de ADN o ARN recombinante, secuencias de ADN y ARN de ADN genómico total, y ADNc transcrito a partir de ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido, etc. La PCR es un ejemplo, pero no el único ejemplo, de un método de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de ensayo de ácido nucleico que comprende el uso de otro ácido nucleico (por ejemplo, conocido) como un cebador. Los métodos mejorados para donación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro* se describen en Wallace *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.426.039. Los métodos mejorados para amplificar ácidos nucleicos grandes por PCR Se resumen en Cheng *et al.*, (1994) Nature 369: 684 685 y las referencias que se citan en ese documento, en el que se generan amplicones de PCR de hasta 40 kilobases (kb). Alguien con experiencia observará que esencialmente cualquier ARN se puede convertir en un ADN bicatenario adecuado para digestión por restricción, expansión por PCR y secuenciación usando transcriptasa inversa y una polimerasa. Véase Ausubel, Sambrook, y Berger, todos mencionados anteriormente.

Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden incorporar en una cualquiera de diversos vectores, por ejemplo, vectores de expresión, para expresar un polipéptido, incluyendo, por ejemplo, un polipéptido de la invención. Se pueden usar vectores de expresión compatibles con células hospedadoras procariotas; tales vectores de expresión procariotas se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, vector BLUESCRIPT (Stratagene), vector de expresión T7 (Invitrogen), vector pET (Novagen), y vectores procariotas similares.

Como alternativa se pueden usar vectores de expresión compatibles con células hospedadoras eucariotas; tales vectores de expresión eucariotas se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, vectores pCMV (por ejemplo, Invitrogen), vector pIRES (Clontech), vector pSG5 (Stratagene), pCDNA3.1 (Invitrogen Life Technologies), pCDNA3 (Invitrogen Life Technologies), vector de expresión de Elemento de Apertura de Cromatina Ubicuo (UCOE™) (Millipore), y vectores de expresión eucariotas similares. El vector UCOE™ generalmente se usa para producción de proteína en células de mamífero (por ejemplo, células CHO). De acuerdo con Millipore, la tecnología de expresión de UCOE™ impide el silenciamiento transgénico y proporciona expresión genética de alto nivel estable sin respetar el sitio de integración cromosómica. Véase el sitio web de Millipore en la dirección Guerra Mundial millipore.com. Un vector de expresión UCOE a modo de ejemplo en el que se puede incorporar, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención es el vector de expresión UCOE denominado CET1019AS-puro-Scel, que está disponible por autorización de Millipore. La información con respecto al vector de expresión UCOE, CET1019AS-puro-Scel, se puede encontrar en, por ejemplo, John Wynne, "UCOE™ Technology Maximizes Protein Expression", BioProcess International 4 (7): 104-105 (julio/agosto de 2006) (RP1725EN00) (disponible en la dirección de la página web mundial millipore.com/bibliography/tech1/rp1725en00);

la información adicional con respecto a este vector y la autorización de este vector de Millipore se puede encontrar en el sitio web de Millipore, incluyendo en, por ejemplo, las direcciones de la página web mundial millipore.com/company/cp3/ucoc_licenseing y millipore.com/techpublications/tech1/ps1013en00. Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 50) fusionado a una secuencia de ADN y que codifica un polipéptido de Fc de IgG2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 184), dando como resultado la secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 201 se inserta en un vector UCOE, CET1019AS (Millipore), y el plásmido de ADN resultantes se puede usar para transfecciones de células hospedadoras.

Los vectores de expresión incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados de SV40, vectores bacterianos (por ejemplo, *S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *B. anthracis*); plásmidos; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores obtenidos a partir de combinaciones de plásmidos y ADN de fago; vectores de ADN o ARN virales, incluyendo, por ejemplo, virus vaccinia, virus adeno-asociado (AAV), adenovirus, virus del Bosque de Semliki (por ejemplo, Notka *et al.*, Biol. Chem. 380: 341-52 (1999)), virus de la viruela (por ejemplo, MVA), alfavirus (por ejemplo, virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de la encefalitis equina occidental (WEE), virus de la encefalitis equina oriental (EEE)), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la viruela aviar, pseudorrabia, virus del herpes simplex, retrovirus, y otros muchos. Se puede usar cualquier vector que transduzca material genético en una célula, y, si se desea replicación, que se pueda replicar y sea viable en el hospedador pertinente. Los vectores virales y bacterianos que sirven como vehículos de suministro se pueden atenuar; la atenuación del diesel suficiente para disminuir, sino para eliminar, la inducción de síntomas de enfermedad no deseados. La Figura 1 es un diagrama esquemático de un vector de expresión CTLA-4-Ig mutante de ADNpC de vector de expresión de plásmido a modo de ejemplo que codifica un CTLA-4-Ig mutante de la invención. Los detalles adicionales con respecto a vectores de expresión adecuados se proporcionan a continuación, incluyendo en los Ejemplos.

Un vector de la invención que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención como se describe en el presente documento, así como una secuencia promotora o de control apropiada, se puede usar para transformar un hospedador apropiado para permitir que el hospedador exprese la proteína. Los ejemplos de hospedador es de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero, tales como Ovario de Hámster Chino (CHO) (por ejemplo, CHO-K1), COS (por ejemplo, COS-1, COS-7), riñón de cría de hámster (BHK), y Riñón Embrionario Humano (HEK) (por ejemplo, HEK 293), células de melanoma de Bowes, y células vegetales. Se entiende que no es necesario que todas las células o líneas celulares sean capaces de producir polipéptidos totalmente funcionales de la invención o fragmentos de los mismos. La invención no está limitada por las células hospedadoras usadas. Los detalles adicionales con respecto a células hospedadoras adecuadas se proporcionan a continuación.

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión se puede seleccionar dependiendo del uso pretendido para el polipéptido o fragmento deseado de los mismos. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de un polipéptido en particular o fragmentos del mismo para la inducción de anticuerpos, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de expresión y clonación de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que secuencia codificante de nucleótidos de interés (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que codifica un CTLA-4-Ig mutante recombinante) se puede unir en el vector en el marco con secuencias para el resto de Met amino-terminal y los 7 restos posteriores de beta-galactosidasa de modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke y Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264: 5503-5509); vectores pET (Novagen, Madison WI); y similares.

De forma análoga, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se puede usar un número de vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa, y PGH para producción del polipéptido de la invención. Para revisiones, véanse Ausubel, mencionado anteriormente, Berger, mencionado anteriormente, y Grant *et al.*, (1987) Meth. Enzymol. 153: 516-544.

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

Un vector, por ejemplo, vector de expresión, o polinucleótido de la invención puede comprender una o más secuencias de control de la expresión. Una secuencia de control de la expresión generalmente se asocia con y/o se une de forma operativa a una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante recombinante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante recombinante.

Una secuencia de control de la expresión es generalmente una secuencia de nucleótidos que estimula, potencia, o controla la expresión (generalmente la transcripción) de otra secuencia de nucleótidos. Las secuencias de control de la expresión adecuadas que se pueden usar incluyen un promotor, incluyendo un promotor constitutivo, promotor inducible, y/o promotor controlable, un potenciador para amplificar la expresión, una secuencia de inicio, una
5 secuencia de terminación de traducción, una secuencia de control de corte y empalme, y similares.

Cuando un ácido nucleico de la invención se incluye en un vector, el ácido nucleico generalmente se une de forma operativa a una secuencia de control de la transcripción (promotor) apropiada para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores ejercen un impacto particularmente importante en el nivel de expresión de polipéptido recombinantes. Se
10 puede usar cualquier promotor adecuado. Los ejemplos de promotores adecuados incluyen el promotor de citomegalovirus (CMV) con o sin el primer intrón (intrón A), el promotor de repetición termina el largo del VIH, el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), promotores del virus del sarcoma de Rous (RSV), tales como promotores de repetición terminal larga (LTR) del RSV, promotores de SV40, promotores de virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotores de HSV, tales como el promotor Lap2 o el promotor de timidina quinasa del herpes (como se describe en, por ejemplo, Wagner *et al.*, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 144-145), promotores obtenidos a partir del
15 virus SV40 o Epstein Barr, promotores virales adeno-asociados (AAV), tales como el promotor p5, promotores de metalotioneína (por ejemplo, el promotor de metalotioneína de oveja fue el promotor de metalotioneína de ratón (véase, por ejemplo, Palmiter *et al.*, (1983) Science 222: 809-814), el promotor de ubiquitina C humano, promotores de *E. coli*, tales como los promotores lac y trp, promotor P_L lambda de fago, y otros promotores conocidos por
20 controlar la expresión de genes en células procariontas o eucariotas (ya sea directamente en la célula o en el virus que infecta a la célula). Se pueden usar promotores que presentan expresión del valor inicial constitutivo fuerte en mamíferos, particularmente en seres humanos, tales como promotores de CMV, tal como el promotor temprano inmediato de CMV (que se describe en, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.168.062, 5.385.839, 5.688.688, y 5.658.759), y promotores que tienen identidad de secuencia sustancial con tales promotores
25 de CMV. También se pueden usar promotores recombinantes que tienen propiedades mejoradas, tal como en la Publ. de Sol. de Patente Internacional N.º WO 02/00897.

Un promotor que se une de forma operativa a un ácido nucleico de la invención para expresión del ácido nucleico puede tener cualquier mecanismo de acción adecuado. Por lo tanto, el promotor puede ser, por ejemplo, un
30 promotor "inducible", (por ejemplo, un promotor de hormona de crecimiento, promotor de metalotioneína, promotor de proteínas de choque térmico, promotor E1B, promotor inducido por hipoxia, promotor inducible por radiación, o promotor MLP adenoviral y líder tripartito), un promotor inducible-controlable, un promotor relacionado con la etapa de desarrollo (por ejemplo, un promotor genético de globina), o un promotor específico de tejido (por ejemplo, un promotor de α -actina de célula del músculo liso, promotor 1A de cadena ligera de miosina, o promotor de cadherina
35 endotelial vascular). Los promotores inducibles adecuados incluyen ecdisona y promotores inducibles por análogo de ecdisona. Los promotores inducibles por análogo de ecdisona están disponibles en el mercado, por ejemplo, a través de Stratagene (La Jolla, CA). Si se desea, un ácido nucleico de la invención se puede inducir usando un sistema de expresión activación y desactivación genética inducible. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de activación y desactivación genética incluyen el Sistema de Expresión Genética Tet-On™ y el Sistema de Expresión
40 Genética Tet-Off™, respectivamente (Clontech, Palo Alto, CA; véase, por ejemplo, Clontech Catalog 2000, pg. 110-111 para una descripción detallada de cada uno de tales sistemas). El promotor inducible puede ser cualquier promotor que tenga una respuesta regulada de forma positiva y/o negativa para una señal apropiada. Los promotores inducibles adicionales incluyen promotores inducibles por arabinosa, promotores inducibles por esteroide (por ejemplo, promotores inducibles por glucocorticoides), así como promotores inducibles por pH, estrés, y calor.

El promotor puede ser, y a menudo es, un promotor nativo para el hospedador, o un promotor obtenido a partir de un virus e infecta un hospedador en particular (por ejemplo, un promotor de beta actina humano, promotor de EF1 α humano, o un promotor obtenido a partir de un AAV humano unido de forma operativa al ácido nucleico de interés),
50 en particular cuando es un tema preocupante Editar de forma estricta el silenciamiento de la expresión genética debido a reacciones inmunológicas del hospedador con respecto a secuencias que no están regularmente presentes en el hospedador. También se puede usar un sistema de promotor bidireccional (como se describe en, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.017.478) unido a múltiples secuencias de nucleótidos de interés.

Otros promotores adecuados y principios relacionados con la selección, uso, y construcción de promotores adecuados se proporcionan en, por ejemplo, Werner (1999) Mamm Genome 10 (2): 168-75, Walther *et al.*, (1996) J. Mol. Med. 74 (7): 379-92, Novina (1996) Trends Genet. 12 (9): 351-55, Hart (1996) Semin. Oncol. 23 (1): 154-58, Gralla (1996) Curr. Opin. Genet. Dev. 6 (5): 526-30, Fassler *et al.*, (1996) Methods Enzymol 273: 3-29, Ayoubi *et al.*, (1996), 10 (4) FASEB J 10 (4): 453-60, Goldsteine *et al.*, (1995) Biotechnol. Annu. Rev. 1: 105-28, Azizkhan *et al.*, (1993) Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 3 (4): 229-54, Dynan (1989) Cell 58 (1): 1-4, Levine (1989) Cell 59 (3): 405-8, Y Berk *et al.*, (1986) Annu. Rev. Genet. 20: 45-79, así como en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.194.191. Otros promotores adecuados se pueden identificar mediante el uso de la Base de Datos de Promotor Eucariota (edición 68) (disponible en la dirección de la página web mundial epd.isb-sib.ch/) y otras bases de datos similares, tal tales como la Base de Datos de Regiones Reguladoras de la Transcripción (TRRD) (versión 4.1) (disponible en la dirección de la página web mundial bionet.nsc.ru/trrd/) y la base de datos de factor de transcripción (TRANSFAC) (disponible en la dirección de la página web mundial transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html).
65 Como una alternativa para un promotor, en particular vectores y construcciones de ARN, un vector o ácido nucleico

de la invención puede comprender una o más sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), secuencias codificantes de IRES, o potenciadores de secuencia de ARN (análogos de secuencia consenso de Kozak), tal como la secuencia original omega de virus del mosaico del tabaco.

- 5 Un vector o polinucleótido de la invención puede incluir una secuencia activador a cadena arriba (UAS), tal como una secuencia activadora de Gal4 (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.133.028) u otra secuencia reguladora cadena arriba adecuada (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.204.060).
- 10 Un vector o polinucleótido de la invención puede incluir una secuencia consenso de Kozak que es funcional en una célula de mamífero. La secuencia de Kozak puede ser una secuencia de origen natural o modificada, tal como las secuencias consenso de Kozak modificadas que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.107.477.
- 15 Las señales de inicio específicas pueden ayudar en la traducción eficaz de una secuencia codificante de la invención, tal como una secuencia de nucleótidos que codifican polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante. Tales señales se pueden incluir en un vector de la invención. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que una secuencia codificante, su codón de inicio, y secuencias cadena arriba se insertan en un vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control de traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que solamente una secuencia codificante (por ejemplo, una secuencia codificante de proteína madura), o una parte de la misma se inserta, se deben proporcionar señales de control de la transcripción de ácido nucleico exógeno que incluyen el codón de inicio ATG. Además el codón de inicio debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la transcripción de toda la inserción. Los elementos de transcripción exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes - tanto natural como sintético. La eficacia de la expresión se puede aumentar mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf *et al.*, Results Probl. Cell. Differ. 20: 125-62 (1994); y Bittner *et al.*, Meth. Enzymol. 153: 516-544 (1987)). Los potenciadores adecuados incluyen el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV) y los potenciadores de RTE que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.225.082.
- 20
- 25
- 30 El experto en la materia reconocerá que la introducción de un codón de inicio (ATG) en el extremo 5' terminal de una secuencia de nucleótidos en particular de interés normalmente da como resultado la adición de una metionina N-terminal en la secuencia de aminoácidos codificaba cuando la secuencia se expresa en una célula de mamífero (otras modificaciones deben producir en células bacterianas y/u otras células eucariotas, tales como la introducción de un resto de formil-metionina en un codón de inicio).
- 35
- Para la expresión de un ácido nucleico de la invención en células eucariotas, un codón de inicio y una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal por lo general se van a incluir en el extremo 5' terminal de una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 80), y un codón de determinación generalmente se incluye en el extremo C terminal del ácido nucleico (por ejemplo, SEQ ID NO: 80). Una secuencia de péptido señal a modo de ejemplo es la secuencia del péptido señal de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 182); la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido señal activador de plasminógeno tisular se muestra en la SEQ ID NO: 181. Otra secuencia de péptido señal a modo de ejemplo es la secuencia del péptido señal de hCTLA-4 (SEQ ID NO: 216), que está codificada con la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID NO: 215.
- 40
- 45 Las secuencias de terminación se discuten con detalle a continuación.
- Tales elementos se pueden incluir en la construcción del vector de elección. Después de la expresión, la variante de polipéptido codificada por el ácido nucleico (por ejemplo, SEQ ID NO: 80) inicialmente incluirá un resto de metionina N-terminal y la secuencia del péptido señal. Sin embargo, la metionina N-terminal y la secuencia del péptido señal se escindirán después de la secreción, generando ese modo el polipéptido codificado (por ejemplo, SEQ ID NO: 1).
- 50
- El nivel de expresión de un ácido nucleico de la invención (o un polipéptido correspondiente de la invención) se puede evaluar mediante cualquier técnica adecuada. Los ejemplos incluyen análisis de Transferencia de Northern (que se discute en, por ejemplo, McMaster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (11): 4835-38 (1977) y Sambrook, a continuación), transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (TA-PCR) (como se describe en, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.601.820 y Zaheer *et al.*, Neurochem. Res. 20: 1457-63 (1995)), y técnicas de hibridación *in situ* (como se describe en, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.750.340 y 5.506.098). La cuantificación de proteínas también se puede realizar con el ensayo de Lowry y otros ensayos de cuantificación de proteína (véase, por ejemplo, Bradford, Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976); Lowry *et al.*, J. Biol. Chem. 193: 265 (1951)). El análisis de transferencia de Western de polipéptidos recombinantes de la invención obtenidos a partir del lisado de células transfectadas con polinucleótidos que codifican tales polipéptidos recombinantes es otra técnica adecuada para evaluar los niveles de expresión de polipéptido recombinante.
- 55
- 60
- 65 Un vector, por ejemplo, vector de expresión, o polinucleótido de la invención puede comprender un sitio de unión a ribosoma para inicio de traducción y una región de terminación de la transcripción. Una región de terminación de la

- transcripción adecuada es, por ejemplo, una secuencia de poliadenilación que facilita la escisión y la poliadenilación de una transcripción de ARN producida a partir de una secuencia de ADN. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación adecuada, incluyendo una secuencia optimizada sintética, así como la secuencia de poliadenilación de BGH (Hormona de Crecimiento Bovino), gen de hormona de crecimiento humano, virus polioma, TK (Timidina
- 5 Quinasa), EBV (Virus de Epstein Barr), beta globina de conejo, y el virus del papiloma, incluyendo el virus del papiloma humano y BPV (Virus del Papiloma Bovino). Las secuencias de poliadenilación (poliA) adecuadas también incluyen la secuencia de poliadenilación de SV40 (Virus-40 del Sarcoma humano) y la secuencia de poliA de BGH. Tales secuencias de poliA se describen en, por ejemplo, Goodwin *et al.*, (1998) *Nucleic Acids Res.* 26 (12): 2891-8, Schek *et al.*, (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12 (12): 5386-93, y van den Hoff *et al.*, (1993) *Nucleic Acids Res.* 21 (21): 4987-8.
- 10 Los principios adicionales relacionados con la selección de secuencias de poliadenilación apropiadas se describen en, por ejemplo, Levitt *et al.*, (1989) *Genes Dev.* 1989 3 (7): 1019-1025, Jacob *et al.*, (1990) *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1 (1): 49-59, Chen *et al.*, (1995) *Nucleic Acids Res.* 23 (14): 2614-2620, Moreira *et al.*, (1995) *EMBO J.* 14 (15): 3809-3819, Carswell *et al.*, (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9 (10): 4248-4258.
- 15 Un vector o polinucleótido de la invención puede comprender adicionalmente sitios de recombinación específicos del sitio, que se pueden usar para modular la transcripción de una secuencia de nucleótidos de interés, como se describe en, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.959.317, 5.801.030 y 6.063.627, Solicitud de Patente Europea N.º 0 987 326 y Publ. de Sol. de Patente Internacional N.º WO 97/09439.
- 20 Un vector o polinucleótido de la invención también puede comprender un ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, para dirigir la expresión del polipéptido a un compartimento, membrana, u orgánulo celular deseados, o para dirigir la secreción del polipéptido al espacio periplasmático o en el medio de cultivo celular. Tales secuencias se conocen en la técnica, e incluyen péptidos líder de secreción o péptidos señal, secuencia de dirección de orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, secuencias de retención en ER, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito de cloroplasto), secuencias de localización/ancla de membrana (por
- 25 ejemplo, secuencias de transferencia de parada, secuencias de ancla de GPI), y similares. Los polinucleótidos de la invención se pueden fusionar, por ejemplo, en marco con tal ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción y/o localización. Los polipéptidos expresados por tales polinucleótidos de la invención pueden incluir la secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia(s) de secreción y/o localización.
- 30 Además, un vector o polinucleótido de la invención puede comprender una o más secuencias de nucleótidos demarcador seleccionable o genes para proporcionar un rasgo fenotípico para selección de células hospedadoras transformadas, tales como resistencia a la dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina, resistencia a G418, resistencia a puromicina, y/o resistencia a blastidina para cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a
- 35 tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.
- Un vector o polinucleótido de la invención también puede comprender un origen de replicación útil para propagación en un microorganismo. El origen bacteriano de replicación (Ori) usado es preferentemente uno que no influya de forma adversa en la expresión genética en células de mamífero. Los ejemplos de secuencias de origen de
- 40 replicación útiles incluyen el ori del fago f1, RK2 oriV, ori de pUC, y el ori de pSC101. El origen de las secuencias de replicación incluye el ori de ColEI y el p15 (disponible a partir del plásmido pACYC177, New England Biolab, Inc.), como alternativa otra secuencia de ori de pocas copias (similar a p15) puede ser deseable en algunos contextos. El ácido nucleico en este sentido actúa de forma deseable como vector lanzadera, capaz de replicarse y/o expresarse en hospedadores tanto eucariotas como procariotas (por ejemplo, un vector que comprende un origen de secuencias
- 45 de replicación reconocido tanto en eucariotas como en procariotas).
- La invención incluye un vector de ADN o ARN desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston (1997) *Nat Biotech* 17: 355-59), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe en, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.077.835 y/o Publ.
- 50 de Sol. de Patente Internacional N.º WO 00/70087), un vector plásmido tal como pCDNA3.1, pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico con un tamaño mínimo "midge" (como se describe en, por ejemplo, Schakowski *et al.*, (2001) *Mol. Ther.* 3: 793-800) o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaPO₄ (como se describe en, por ejemplo, Sol. de Patente Internacional WO 00/46147, Benvenisty y Reshef (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9551-55, Wigler *et al.*, (1978), *Cell* 14: 725, y
- 55 Coraro y Pearson (1981) *Somatic Cell Genetics* 7: 603), que comprende un ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona un plásmido de ADN desnudo que comprende la SEQ ID NO: 80 unido de forma operativa a un promotor de CMV o variante de promotor de CMV y una secuencia de poliadenilación adecuada. Los vectores de nucleótido desnudo y el uso de los mismos se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.589.466 y 5.973.972).
- 60 Un vector de la invención generalmente es un vector de expresión que es adecuado para expresión en un sistema bacteriano, sistema eucariota, sistema de mamífero, u otro sistema (a diferencia de un vector des diseñado para replicar la secuencia de ácidos nucleicos sin expresión, que se puede denominar vector de clonación). Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona un vector de expresión bacteriano que comprende una secuencia de ácidos
- 65 nucleicos de la invención (por ejemplo, secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CTLA-4-Ig mutante recombinante). Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que dirigen expresión de alto nivel de

proteínas de fusión se purifican fácilmente (por ejemplo, clonación de *E. coli* multifuncional y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 264: 5503-5509 (1989); vectores pET (Novagen, Madison WI); y similares). Aunque tales vectores de expresión bacteriana pueden ser útiles para expresar polipéptidos de la invención en particular, las glicoproteínas de la invención se expresan preferentemente en células eucariotas y como tal la invención también proporciona vectores de expresión eucariota.

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

Un vector de expresión Generalmente se puede propagar en una célula hospedadora, que puede ser una célula eucariota (tal como una célula de mamífero, célula de levadura, o célula vegetal) o una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de un vector de ácido nucleico o vector de expresión en la célula hospedadora (por ejemplo, transfección) se puede realizar mediante transfección con fosfato cálcico (véase, por ejemplo, el método de coprecipitación con fosfato cálcico de Graham *et al.*, *Virology* 52: 456-457 (1973)), transfección mediada por DEAE-Dextrano, electroporación, pistola genética o de vacuna, inyección, lipofección y biolística u otras técnicas comunes (véase, por ejemplo, Kriegler, *GENE TRANSFER AND EXPRESSION: A LABORATORY MANUAL*, Stockton Press (1990); véase Davis, L., Dibner, M., y Battey, I., *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* (1986) para una descripción de métodos *in vivo*, *ex vivo*, e *in vitro*). Las células que comprenden estos y otros vectores de la invención forman una parte importante de la invención.

En el presente documento se desvela un vector de expresión que comprende: (i) una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un primer polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en el que dicho primer polipéptido se une a CD86 humano y/o CD80 humano y/o un dominio extracelular de cualquiera o ambos, y/o suprime una respuesta inmunológica, y (ii) una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un segundo polipéptido que comprende una región bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3 de un polipéptido de inmunoglobulina (Ig). El polipéptido de Ig es opcionalmente un polipéptido de Fc de Ig humana (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG4, etc.) o un polipéptido de Fc de Ig mutante, (por ejemplo, un polipéptido de Fc de Ig en el que uno o más restos de cisteína se han sustituido con otro aminoácido (por ejemplo, un resto de serina), eliminando de ese modo uno o más enlaces disulfuro formados entre dos cadenas de Ig, o en el que uno o más restos de prolina está sustituido con otro aminoácido (por ejemplo, prolina) para reducir la función efectora (reducción de la unión al receptor Fc). En el presente documento se desvela un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222.

Los ácidos nucleicos adicionales proporcionados por la invención incluyen cósmidos. Cualquier vector cósmido adecuado se puede usar para replicar, transferir, y expresar la secuencia de ácidos nucleicos de la invención. Por lo general, un cósmido comprende un oriV bacteriano, un marcador de selección de antibiótico, un sitio de clonación, y ya sea uno o dos sitios obtenidos a partir de bacteriófago lambda. El cósmido puede ser un cósmido lanzadera o cósmido de mamífero, que comprende un SV40 oriV y, de forma deseable, marcador o marcadores de selección de mamífero adecuados. Los vectores cósmidos se describen adicionalmente en, por ejemplo, Hohn *et al.*, (1988) *Biotechnology* 10: 113-27.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden incluir en y/o administrar a un hospedador o célula hospedadora en forma de un vehículo de suministro adecuado (es decir, un vector). El vector puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores de ácido nucleico cromosómico, no cromosómico, y sintético, u otros vectores que se han descrito anteriormente, y pueden incluir cualquier combinación de los elementos de expresión que se han descrito anteriormente y/u otros elementos de secuencia que facilitan la transfección y/o estimulan la expresión. Los ejemplos de tales vectores incluyen virus, plásmidos bacterianos, fagos, cósmidos, fagémidos, derivados de SV40, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores obtenidos a partir de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN), polilisina, y células bacterianas.

El suministro de una secuencia de ADN recombinante de la invención se puede realizar con un plásmidos de ADN

desnudo o plásmido asociado con uno o más agentes potenciadores de la transfección, como se discute adicionalmente en el presente documento. El vector de ADN de plásmido puede tener cualquier combinación adecuada de características. Los vectores de ADN de plásmido pueden comprender una región de promotor/potenciador fuerte (por ejemplo, promotor de CMV humano, RSV, SV40, SL3-3, MMTV, o LTR del VIH), una secuencia de terminación de poli(A) eficaz, un origen de replicación para producto plásmido en *E. coli*, un gen de resistencia antibiótico como marcador seleccionable, y un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un policonector). Un vector plásmido particular para suministro del ácido nucleico de la invención en este sentido se muestra en la Figura 1; la construcción y características de este vector se describen en los Ejemplos que siguen a continuación.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende al menos un ácido nucleico o polipéptido de la invención. Tal vector de ácido nucleico incluye, por ejemplo, pero no se limita a, un virus recombinante, un conjugado de ácido nucleico-proteína viral (que, con partículas virales recombinantes, en algunas ocasiones se puede denominar vector viral), o una célula, tales como células bacterianas recombinantes (y normalmente atenuadas) de *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, y *Bacilo de Calmette-Guérin* (BCG). Por lo tanto, por ejemplo, la invención proporciona un vector viral, vector de insecto, vector bacteriano, o vector vegetal que comprende un ácido nucleico de la secuencia de la invención. En este sentido se puede usar cualquier vector viral, de insecto, vegetal, o bacteriano adecuado y en la técnica se conoce un número de ellos. Un vector viral puede comprender cualquier número de polinucleótidos virales, solo (un vector de ácido nucleico) o más comúnmente en combinación con uno o más (generalmente dos, tres, o más) proteínas virales, que facilitan el suministro, replicación, y/o expresión del ácido nucleico de la invención en una célula hospedadora deseada.

En un aspecto, se puede usar bacterias intracelulares (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*) para suministrar un ácido nucleico de la invención. Un vector bacteriano a modo de ejemplo para suministro de ADN de plásmido de uno o más ácidos nucleicos de la invención es *Listeria monocytogenes* (Lieberman *et al.*, Vaccine 20: 2007-2010 (2002)).

La invención incluye vectores virales recombinantes o aislados que se han modificado para comprender uno o más ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención. Un vector viral puede incluir un polinucleótido que comprende todo o parte de un genoma viral, un conjugado de proteína/ácido nucleico viral, una partícula similar a un virus (VLP), un vector similar a los que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.849.586 y en la Publ. de Sol. de Patente Internacional N.º WO 97/04748, o una partícula de virus intacto que comprende uno o más ácidos nucleicos virales, y el vector viral generalmente se modifica por ingeniería para incluir al menos un ácido nucleico y/o polipéptido de la invención. Un vector viral (es decir, un virus recombinante) puede comprender una partícula viral de tipo silvestre o una partícula viral modificada, ejemplos particulares de los cuales se discuten a continuación. Generalmente se usa en numerosos virus como vectores para el suministro de ácidos nucleicos exógenos, incluyendo al menos un ácido nucleico de la invención, tal como un ácido nucleico que codifica un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante que se describe en el presente documento. Tales vectores incluyen virus de ADN y ARN con envoltura o sin envoltura modificados de forma recombinante, generalmente seleccionados entre *baculoviridae*, *parvoviridae*, *picomoviridae*, *herpesviridae*, *poxyviridae*, *adenoviridae*, o *picornaviridae*. Los vectores virales pueden ser de tipo silvestre o se puede modificar mediante técnicas de ácido nucleico recombinante para que tengan deficiencia de replicación, competencia de replicación, o replicación condicionada.

El vector viral puede ser un vector que requiere la presencia de otro vector o virus de tipo silvestre para replicación y/o expresión (es decir, un virus dependiente auxiliar), tal como un amplicón de vector adenoviral. Generalmente, tales vectores virales comprenden una partícula viral de tipo silvestre, o una partícula viral modificada en su contenido de proteína y/o ácido nucleico para aumentar la capacidad transgénica o para ayudar en la transfección y/o expresión del ácido nucleico (los ejemplos de tales vectores incluyen los amplicones del virus del herpes/AAV). El genoma viral se puede modificar para que incluya promotores inducibles que consiguen replicación o expresión solamente en ciertas condiciones.

El vector viral se puede obtener a partir de o puede comprender un virus que normalmente infecta a animales, preferentemente vertebrados, tales como mamíferos, incluyendo, por ejemplo, seres humanos. Las partículas de vector viral adecuadas en este sentido, incluyen, por ejemplo, partículas de vector adenoviral (incluyendo cualquier virus de u obtenido a partir de un virus del género *adenoviridae*), partículas de vector viral adeno-asociadas (partículas de vector AAV) u otras partículas de vector de parvovirus y parvovirales, partículas de vector del virus del papiloma, vector viral Semliki-Forest, vectores flavivirales, vectores picornavirales, vectores alfavirales, vectores virales del herpes, vectores de virus de la viruela, vectores retrovirales, incluyendo vectores lentivirales. Los ejemplos de tales virus y vectores virales se proporcionan en, por ejemplo, Fields Virology, mencionado anteriormente, Fields *et al.*, eds., VIROLOGY, Raven Press, Ltd., New York (3ª ed., 1996 y 4ª ed., 2001), ENCYCLOPEDIA OF VIROLOGY, R.G. Webster *et al.*, eds., Academic Press (2ª ed., 1999), Fundamental Virology, Fields *et al.*, eds., Fippincott-Raven (3ª ed., 1995), Fevine, "Viruses," Scientific American Fibrary N.º 37 (1992), MEDICAL VIROLOGY, D.O. White *et al.*, eds., Academic Press (2ª ed. 1994), e INTRODUCTION TO MODERN VIROLOGY, Dimock, N.J. *et al.*, eds., Blackwell Scientific Publications, Ltd. (1994).

Los vectores virales que se pueden usar con ácidos nucleicos de la invención y los métodos que se describen en el presente documento incluyen vectores de virus adeno-asociados, que se revisan en, por ejemplo, Carter (1992)

Curr. Opin. Biotech. 3: 533-539 (1992) y Muzyczka (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158: 97-129 (1992). Los tipos y aspectos adicionales de vectores de AAV se describen en, por ejemplo, Buschacher *et al.*, Blood 5 (8): 2499-504, Carter, Contrib. Microbiol. 4: 85-86 (2000), Smith-Arica, Curr. Cardiol. Rep. 3 (1): 41-49 (2001), Taj, J. Biomed. Sci. 7 (4): 279-91 (2000), Vigna *et al.*, J. Gene Med. 2 (5): 308-16 (2000), Klimatcheva *et al.*, Front. Biosci. 4: D481-96 (1999), Lever *et al.*, Biochem. Soc. Trans. 27 (6): 841-47 (1999), Snyder, J. Gene Med. 1 (3): 166-75 (1999), Gerich *et al.*, Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 5 (2): 118-23 (1998), y During, Adv. Drug Deliv. Review 27 (1): 83-94 (1997), y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 4.797.368, 5.139.941, 5.173.414, 5.614.404, 5.658.785, 5.858.775, y 5.994.136, así como otras referencias que se discuten en cualquier parte en el presente documento). Los vectores virales adeno-asociados se pueden construir y/o purificar usando los métodos que se presentan, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.797.368 y en Laughlin *et al.*, Gene 23: 65-73 (1983).

Los vectores de alfavirus pueden ser vectores de suministro genético en otros contextos. Los vectores de alfavirus se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Carter (1992) Curr Opin Biotech 3: 533-539, Schlesinger Expert Opin. Biol. Ther. (2001) 1 (2): 177-91, Polo *et al.*, Dev. Biol. (Basilea). 2000; 104: 181-5, Wahlfors *et al.*, Gene Ther. (2000) 7 (6): 472-80, Publ. de Sol. de Pat. Internacional N.º WO 01/81609, WO 00/39318, WO 01/81553, WO 95/07994, WO 92/10578.

Otro grupo de vectores virales ventajosos son los vectores virales del herpes. Los ejemplos se describen en, por ejemplo Lachmann *et al.*, Curr. Opin. Mol. Ther. (1999) 1 (5): 622- 32, Fraefel *et al.*, Adv. Virus Res. (2000) 55: 425-51, Huard *et al.*, Neuromuscul. Disord. (1997) 7 (5): 299-313, Frenkel *et al.*, Gene Ther. (1994) Supl 1: S40-6, documentos de Patente de Estados Unidos N.º 6.261.552 y 5.599.691.

Los vectores retrovirales, incluyendo vectores lentivirales, también pueden ser vehículos de suministro genético ventajosos en contextos particulares. Existen numerosos vectores retrovirales conocidos en la técnica. Los ejemplos de vectores retrovirales se describen en, por ejemplo, Miller, Curr Top Microbiol. Immunol. (1992) 158: 1-24, Weber *et al.*, Curr. Opin. Mol. Ther. (2001) 3 (5): 439-53, Hu *et al.*, Pharmacol. Rev. (2000) 52 (4): 493-511, Kim *et al.*, Adv. Virus Res. (2000) 55: 545-63, Palu *et al.*, Rev. Med. Virol. (2000) 10 (3): 185-202, Takeuchi *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. (2000) 465: 23-35, documentos de Patente de Estados Unidos N.º 6.326.195, 5.888.502, 5.580.766, y 5.672.510.

Los vectores de baculovirus son otro grupo ventajoso de vectores virales, particularmente para la producción de polipéptidos de la invención. La producción y uso de vectores de baculovirus se conoce (véase, por ejemplo, Kost, Curr. Opin. Biotechnol. 10 (5): 428-433 (1999); Jones, Curr. Opin. Biotechnol. 7 (5): 512-516 (1996)). Cuando el vector se usa para usos terapéuticos, el vector se seleccionara de modo que sea capaz de infectar de forma adecuada (o en el caso de vectores de ácido nucleico transfectar o transformar) células diana en las que se desea el efecto terapéutico deseado.

Los vectores adenovirales también pueden ser vectores virales adecuados para transferencia genética. Los vectores adenovirales se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, Graham *et al.*, (1995) Mol. Biotechnol. 33 (3): 207-220, Stephenson (1998) Clin. Diagn. Virol. 10 (2-3): 187-94, Jacobs (1993) Clin Sci (Lond). 85 (2): 117-22, documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.922.576, 5.965.358 y 6.168.941 y Solicitudes de Patente Internacional WO 98/22588, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441, y WO 00/32754. Los vectores adenovirales, vectores virales del herpes, y vectores virales Sindbis, útiles en la práctica de la invención y adecuados para transducción *in vivo* de organismos y expresión de ácidos nucleicos de la invención, generalmente se describen en, por ejemplo, Jolly (1994) Cancer Gene Therapy 1: 51-64 Latchman (1994) Molec. Biotechnol. 2: 179-195, y Johanning *et al.*, (1995) Nucl. Acids Res. 23: 1495-1501.

El vector de virus puede tener una replicación deficiente en una célula hospedadora. Los vectores de virus adenoasociado (AAV), que en la naturaleza tienen una replicación deficiente en ausencia de los adenovirus de complemento o al menos productos genéticos de adenovirus (proporcionados, por ejemplo, por un virus auxiliar, plásmido, o célula de complemento), están incluidos. Por "replicación deficiente" se hace referencia a que el vector viral comprende un genoma que carece de al menos una función genética esencial para la replicación. Una deficiencia en un gen, función genética, o gen o región genómica, como se usa en el presente documento, se define como una delección de material genético suficiente del genoma viral para alterar o anular la función del gen cuya secuencia de ácidos nucleicos se sometió a delección total o parcialmente. Las funciones genéticas esenciales para la replicación son aquellas funciones genéticas que se requieren para replicación (es decir, propagación) de un vector viral con replicación deficiente. Las funciones genéticas esenciales de la particular de vector viral varían con el tipo de partícula de vector viral en cuestión. Los ejemplos de partículas de vector viral con replicación deficiente se describen en, por ejemplo, Marconi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (21): 11319-20 (1996), Johnson y Friedmann, Methods Cell Biol. 43 (pt. A): 211-30 (1994), Timiryasova *et al.*, J. Gene Med. 3 (5): 468-77 (2001), Burton *et al.*, Stem Cells 19 (5): 358-77 (2001), Kim *et al.*, Virology 282 (1): 154-67 (2001), Jones *et al.*, Virology 278 (1): 137-50 (2000), Gill *et al.*, J. Med. Virol. 62 (2): 127-39 (2000). Otros vectores con replicación deficiente se basan en vectores de MLV sencillos (Miller *et al.*, (1990) Mol. Cell Biol. 10: 4239; Kolberg (1992) J. NIH Res. 4: 43, y Cornetta *et al.*, (1991) Hum. Gene. Ther. 2: 215). Los vectores de la viruela de canarios son ventajosos para infectar células humanas pero en la naturaleza son incapaces de replicación en los mismos (es decir, sin modificación

genética).

La construcción básica de vectores virales recombinantes entiende bien en la técnica implica el uso de técnicas de biología molecular convencionales tales como las que se describen en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press 1989) y en la tercera edición del mismo (2001), Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Wiley Interscience Publishers 1995), y Watson, mencionado anteriormente, y varias de las otras referencias que se mencionan en el presente documento. Por ejemplo, los vectores adenovirales se pueden construir y/o purificados son los métodos que se presentan, por ejemplo, en Graham *et al.*, Mol. Biotechnol. 33 (3): 207-220 (1995), documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.965.358, Donthine *et al.*, Gene Ther. 7 (20): 1707-14 (2000), y otras referencias que se describen en el presente documento. Los vectores virales adeno-asociados se pueden construir y/o purificar usando los métodos que se presentan, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.797.368 y en Laughlin *et al.*, Gene 23:65-73 (1983). En la técnica se conocen técnicas similares con respecto a otros vectores virales, particularmente con respecto a vectores virales del herpes (véase por ejemplo Lachman *et al.*, Curr. Opin. Mol. Ther. 1 (5): 622-32 (1999)), vectores lentivirales, y otros vectores retrovirales. En general, el vector viral comprende una inserción del ácido nucleico (por ejemplo, un vector adenoviral de tipo silvestre puede comprender una inserción de hasta 3 KB sin delección), o, más generalmente, comprende una o más delecciones del genoma del virus para acomodar la inserción del ácido nucleico y ácidos nucleicos adicionales, si se desea, y para prevenir la replicación en células hospedadoras.

Los vectores no virales, tales como, por ejemplo, plásmidos de ADN, ácidos nucleicos desnudos, y ácido nucleico formando complejo o con un vehículo de suministro tal como un liposoma, también se puedan asociar con moléculas que dirigen el vector a una región en particular en el hospedador (por ejemplo, un órgano en particular, tejido, y/o tipo celular). Por ejemplo, un nucleótido se puede conjugar con una proteína de dirección, tal como una proteína viral que se une a un receptor o una proteína que se une a un receptor de una diana en particular (por ejemplo, mediante modificación de las técnicas en Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 263 (29): 14621-24 (1988)). Se conocen composiciones de lípido catiónico dirigido (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.120.799). otras técnicas para dirección de construcciones genéticas se proporcionan en la Publ. de Sol. de Patente Internacional N.º WO 99/41402.

Hospedadores de Expresión

La presente invención también proporciona células hospedadoras modificadas por ingeniería transducidas, transfectadas o transformadas con un vector de la invención (por ejemplo, un vector de clonación o vector de expresión) or un ácido nucleico de la invención. Las células hospedadoras modificadas por ingeniería se pueden cultivar en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes, o amplificar el ácido nucleico de interés. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las que se han usado anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para las personas con experiencia en la materia y en las referencias que se citan en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3ª ed., Wiley - Liss, New York y las referencias que se citan en ese documento. Los polipéptidos de la invención codificados por tales vectores o ácidos nucleicos de la invención se expresan en tales células hospedadoras y se pueden aislar mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, los polipéptidos liberados en el cultivo celular se pueden aislar del cultivo mediante ultracentrifugación o técnicas similares.

Los polipéptidos de la invención se pueden producir en diversos hospedadores de expresión, que incluyen, pero no se limitan a, células animales, tales como células de mamífero (por ejemplo, células CHO), incluyendo células de ser humano y primate no humano, y en células no animales, tales como plantas, levadura, hongos, bacterias, y similares. Los ejemplos de hospedadores de expresión adecuados incluyen células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; células de insecto tal como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero, tales como células CHO (por ejemplo, CHO-K1), COS (por ejemplo, COS-1, COS-7), BHK, y HEK (por ejemplo, HEK293), células de melanoma de Bowes, y células vegetales. Como se ha indicado anteriormente, la invención no está limitada por las células hospedadoras usadas. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, todos mencionados anteriormente, los detalles con respecto al cultivo celular se encuentran en, por ejemplo, Payne *et al.*, (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg NY); Atlas & Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL. Tales células hospedadoras se pueden adaptar para crecer en medio sin suero, sin proteína, medio sin componente animal, tal como, por ejemplo, un medio químicamente definido (CD) (tal como, por ejemplo, CD OptiCHO™ (Invitrogen, N.º 12681) usando procedimientos conocidos en la técnica.

La invención proporciona una célula(s) que comprende uno cualquiera o más de los ácidos nucleicos, vectores, u otras construcciones de la invención (por ejemplo, una construcción que expresa un ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante) que se describe en el presente documento o cualquier combinación de los mismos. También se incluye una célula que comprende uno o más de cualquiera de los polipéptidos, anticuerpos, o proteínas de fusión, u

5 otras construcciones de la invención que se describen en el presente documento, o cualquier combinación de uno o más de los mismos. Una célula de la invención generalmente es una célula aislada o recombinante y puede comprender una célula hospedadora. Tal célula, por ejemplo, célula recombinante, se puede modificar mediante transformación, transfección, y/o infección con al menos un ácido nucleico, vector, u otra construcción de la invención. Tal célula puede ser una célula eucariota (por ejemplo, células de mamífero, levadura, o vegetal) o una célula procariota (por ejemplo, célula bacteriana) y se puede transformar con cualquiera de tales construcciones de la invención usando diversos métodos conocidos, incluyendo, por ejemplo, transfección con fosfato cálcico (véase, por ejemplo, método de coprecipitación con fosfato cálcico), transfección mediada por DEAE-Dextrano, electroporación (Irving *et al.*, Cell 64: 891-901 (1991)), pistola genética o de vacuna, inyección, lipofección y biolística u otras técnicas comunes como se ha indicado anteriormente. Véanse también los métodos y tecnología de electroporación de Inovio Biomedical Corp. en la dirección de la página web mundial inovio.com.

15 Una cepa de célula hospedadora se elige opcionalmente por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en la forma deseada. Tales modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y aclación. Diferentes células hospedadoras tales como *E. coli*, *Bacillus sp.*, levadura, o células de mamífero, tales como CHO, HeLa, BHK, MDCK, HEK 293, WI38, etc., tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades posteriores a la traducción y se pueden elegir para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña introducida.

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

35 La presente invención también proporciona células hospedadoras que se transducen, transforman o transfectan con al menos un ácido nucleico o vector de la invención. Como se ha discutido anteriormente, un vector de la invención por lo general comprende un ácido nucleico de la invención. Las células hospedadoras se modifican mediante ingeniería genética (por ejemplo, transducidas, transformadas, infectadas, o transfectadas) con los vectores de la invención, que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, bacteria atenuada, o cualquier otro tipo de vector adecuado. Las células hospedadoras adecuadas para transducción y/o infección con vectores virales de la invención para producción de los polipéptidos recombinantes de la invención y/o para rectificación del vector viral de la invención incluyen las células que se han descrito anteriormente. Los ejemplos de células que se ha mostrado que son adecuadas para empaquetamiento de partículas de vector viral se describen en, por ejemplo, Polo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 96 (8): 4598-603 (1999), Farson *et al.*, J. Gene Med. 1 (3): 195-209 (1999), Sheridan *et al.*, Mol. Ther. 2 (3): 262-75 (2000), Chen *et al.*, Gene Ther. 8 (9): 697-703 (2001), y Pizzaro *et al.*, Gene Ther. 8 (10): 737-745 (2001). Para vectores virales con deficiencia de replicación, tales como vectores AAV, son necesarias líneas celulares de complemento, líneas celulares transformadas con virus auxiliar, o líneas celulares transformadas con plásmidos que codifican genes esenciales, a la replicación del vector viral.

50 Las modificadas células hospedadoras por ingeniería se pueden cultivar en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para activación de promotores, selección de transformantes, o amplificación del gen de interés. Las células hospedadoras se pueden cultivar en medio que contiene suero o medio sin suero. Las células hospedadoras se pueden cultivar en un medio sin suero, sin proteína, sin componente animal, incluyendo, por ejemplo, un medio químicamente definido (por ejemplo, CD OptiCHO™ (Invitrogen, N.º 12681)). El medio de cultivo celular se puede suplementar, si se desea, con suplementos conocidos por los expertos, tales como, por ejemplo, uno o más aminoácido(s), tales como L-glutamina (por ejemplo, L-glutamina 200 mM al 2 % en v/v (Invitrogen, N.º 25031)). Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las que se han usado previamente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para las personas con experiencia en la materia y en las referencias que se citan en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, ANIMAL CELL TECHNOLOGY, Rhiel *et al.*, eds., (Kluwer Academic Publishers 1999), Chaubard *et al.*, Genetic Eng. News 20 (18) (2000), Hu *et al.*, ASM News 59: 65-68 (1993), Hu *et al.*, Biotechnol. Prog. 1: 209-215 (1985), Martin *et al.*, Biotechnol. (1987), Freshney, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE, 4ª ed., (Wiley, 2000), Mather, INTRODUCTION TO CELL AND TISSUE CULTURE: THEORY AND TECHNIQUE, (Plenum Press, 1998), Freshney, CULTURE OF IMMORTALIZED CELLS, 3ª ed., (John Wiley & Sons, 1996), CELL CULTURE: ESSENTIAL TECHNIQUES, Doyle *et al.*, eds. (John Wiley & Sons 1998), y GENERAL TECHNIQUES OF CELL CULTURE, Harrison *et al.*, eds., (Cambridge Univ. Press 1997).

65 El ácido nucleico también puede estar contenido, replicado, y/o expresado en células vegetales. Las técnicas

relacionadas con el cultivo de células vegetales se describen en, por ejemplo, Payne *et al.*, (1992) PLANT CELL AND TISSUE CULTURE IN LIQUID SYSTEMS John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE: FUNDAMENTAL METHODS SPRINGER LAB MANUAL, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Plant Molecular Biology (1993) R.R.D. Croy (ed.) Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6. Los medios de cultivo celular en general se presentan en Atlas y Parks (eds.) THE HANDBOOK OF MICROBIOLOGICAL MEDIA (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Para producción de proteínas recombinantes de alto rendimiento, a largo plazo, se pueden usar sistemas de expresión estables. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable un polipéptido de la invención se pueden transducir con vectores de expresión que comprenden orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de introducir el vector, se puede permitir que las células en la línea celular crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se también a un medio selectivo. La finalidad del marcador seleccionable es transmitir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan de forma satisfactoria las secuencias introducidas. Por ejemplo, pueden proliferar grupos resistentes de células transformadas de forma estable usando técnicas de cultivo celular apropiadas para el tipo de célula. Los medios sin suero están fácilmente disponibles (por ejemplo, JRH Biosciences, SAFC Biosciences, Sigma-Aldrich Corporation, página web mundial en sigmaaldrich.com). Los medios sin suero un medio acondicionado (por ejemplo, medio de crecimiento previamente cosechado a partir de cultivos de células sin transfectar o sin tratamiento previo) pueden ser preferentes para producción de proteína o banco celular en algunos casos.

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

Las células hospedadoras transformadas con vector de expresión y/o polinucleótido opcionalmente se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. El polipéptido o fragmento del mismo producido con una célula recombinante de ese tipo se puede secretar, unida membrana, o contener de manera intracelular, dependiendo de la secuencia y/o el vector usados. Los vectores de expresión que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos maduros de la invención se pueden diseñar con secuencias señal que dirigen la secreción de los polipéptidos maduros a través de la membrana celular procariota o eucariota. Tales secuencias señal generalmente se incorporan en el vector de modo que la secuencia señal se expresa en el extremo N-terminal del polipéptido de la invención. Los principios relacionados con tales secuencias señal se discuten en cualquier parte en el presente documento.

Producción y Recuperación de Polipéptido

Después de transducción de una cepa hospedadora adecuada y crecimiento de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce con medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Las células generalmente se cosechan mediante centrifugación, se interrumpen mediante medios físicos o químicos, y el extracto en bruto resultante se retiene para purificación adicional. Las células microbianas usadas en expresión de proteínas se pueden interrumpir mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica, o usando agentes de lisado celular, u otros métodos, que son bien conocidos por las personas con experiencia en la materia.

Como se ha indicado, para el cultivo y producción de muchas células hay disponibilidad de muchas referencias, incluyendo, células de origen bacteriano, vegetal, animal (especialmente mamífero) y arqueobacteriano. Véase por ejemplo, Sambrook, Ausubel, y Berger (todos mencionados anteriormente), así como Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, Tercera edición, Wiley-Liss, New York y las referencias que se citan en ese documento; Doyle y Griffiths (1997) Mammalian Cell Culture: Essential Techniques, John Wiley and Sons, NY; Humason (1979) Animal Tissue Techniques, cuarta edición W.H. Freeman y Company; y Ricciardelli, *et al.*, (1989) In vitro Cell Dev. Biol. 25:1016-1024. Para cultivo y regeneración de células vegetales, Payne *et al.*, (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y Plant Molecular Biology (1993) R. R. D. Croy, Ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido. ISBN 0 12 198370 6. Los medios de cultivo celular en general se presentan en Atlas y Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla. La información adicional para cultivo celular se encuentra en la bibliografía disponible en el mercado tal como el Life Science Research Cell Culture Catalogue (1998) de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo.) ("Sigma-LSRCCC") y, por ejemplo, el Plant Culture Catalogue and supplement (1997) también de Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, Mo.) ("Sigma-PCCS").

Los polipéptidos de la invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes mediante cualquier número de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía por afinidad (por ejemplo, usando cualquiera de los sistemas

de etiquetado que se indican en el presente documento), cromatografía con hidroxilapatita, y cromatografía con lectina. Se pueden usar etapas de replegamiento de proteína, si se desea, para completar la configuración de la proteína madura. Por último, en las etapas de purificación final se puede usar cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Además de las referencias y se han indicado anteriormente, en la técnica se conoce bien
 5 diversos métodos de purificación, incluyendo, por ejemplo, los que se presentan en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; y Bollag *et al.*, (1996) *Protein Methods*, 2.sup.nd Edition Wiley- Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook Humana Press*, NJ, Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3.sup.rd
 10 Edition Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM Humana Press*, NJ.

Alguien con experiencia podría entender las proteínas de fusión de la invención (por ejemplo, proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante) se pueden preparar con diversos métodos que se describen en el presente documento,
 15 incluyendo, por ejemplo, los que se presentan en el Ejemplo 1 para preparar LEA29Y-Ig. Por ejemplo, en lugar del ácido nucleico que codifica LEA29Y, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, D3-54 polipéptido) se puede clonar en el vector de fusión de Fc de IgG2 para producir un vector que codifica la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, D3-54-IgG2), las células CHO-K1 estables que expresan tal proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante se pueden preparar mediante
 20 transfección de tales células con el vector que codifica proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, y la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante resultante (por ejemplo, D3-54-IgG2) se puede expresar (generalmente en forma dimérica) y purificar como se describe en el Ejemplo 1.

Sistemas de Expresión *In vitro*

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

MÉTODOS

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

En un aspecto, los métodos terapéuticos o profilácticos que se desvelan en el presente documento implican la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de al menos uno de tales polipéptidos (incluyendo, por ejemplo,
 50 proteína de fusión, multímero, etc.), conjugado, composición, ácido nucleico, vector, y/o célula para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica. En un contexto terapéutico, el sujeto por lo general es uno que está afectado con una enfermedad, trastorno, o afección del sistema inmunológico, y la administración se realiza para evitar una progresión adicional de la enfermedad, trastorno o afección. Por ejemplo, la administración de una molécula de la invención a un sujeto que padece una enfermedad del sistema inmunológico (por ejemplo, enfermedad autoinmune) puede dar
 55 como resultado la supresión o la inhibición de un ataque al sistema inmunológico o respuestas biológicas asociadas con el mismo. mediante la supresión de este ataque al sistema inmunológico en tejidos corporales sanos, los síntomas físicos resultantes (por ejemplo, dolor, inflamación de articulación, hinchazón o sensibilidad de articulación) que resultan o que están asociados con un ataque de ese tipo en tejidos sanos se puede disminuir o aliviar, y el daño biológico y físico que resulta o que está asociado con el ataque al sistema inmunológico se puede disminuir,
 60 retrasar, o detener.

En un contexto profiláctico, el sujeto puede ser uno que esté afectado con, sea susceptible de, o se crea que presenta una enfermedad, trastorno o afección del sistema inmunológico, y la administración generalmente se realiza para evitar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para inhibir o aliviar síntomas, signos, o
 65 respuestas biológicas asociadas con los mismos, para prevenir el daño corporal que potencialmente resulte del mismo, y/o para mantener o mejorar el funcionamiento físico del sujeto.

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

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

En algunos de tales métodos, al menos una de tal molécula o componente de la invención se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la interacción de linfocitos T positivos para CD28 endógenos con células positivas para B7-1 y/o células positivas para B7-2 endógenas en el sujeto. En algunos de tales métodos, la interacción de linfocitos T positivos para CD28 endógenos con células positivas para B7 endógenas que expresan B7-2 (CD86) o B7-1 (CD80) se inhibe.

En algunos casos, las células positivas para B7 son las APC que expresan B7-2 o B7-1, y la interacción de B7-2 o B7-1 con linfocitos T positivos para CD28 se inhibe. En algunos casos, la interacción tanto de B7-2 como de B7-1 expresados en las APC con linfocitos T positivos para CD28 se inhibe.

En el presente documento se desvela un método para suprimir una respuesta inmunológica *in vitro* o *in vivo*. El método comprende poner en contacto células positivas para B7 con al menos una de las siguientes moléculas o componentes de la invención en cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunológica: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido de CTLA-4-ECD mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende cualesquiera dos de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cualesquiera cuatro de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado, y/o vector de la invención; y/o (7) composición de la invención, en el que una respuesta inmunológica se inhibe de ese modo. Una o más respuestas inmunológicas se pueden suprimir, incluyendo, por ejemplo, respuesta de linfocitos T, proliferación o activación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas, inflamación, hinchazón o sensibilidad de articulación, nivel en suero de proteína C-reactiva, producción de anticuerpos anti-colágeno, y/o respuesta(s) a anticuerpo dependientes de linfocitos T. En

tales métodos que comprenden poner en contacto una célula positiva para B7 con un polipéptido de la invención, el polipéptido se une a B7-1 (por ejemplo, human B7-1) expresado en células positivas para B7, y/o se unía B7-2 (por ejemplo, B7-2 humano) expresado en células positivas para B7. En algunos casos, las células positivas para B7 son las APC. En algunos casos, una respuesta inmunológica se suprime *in vitro*, tal como, por ejemplo, en un ensayo *in vitro*, incluyendo los que se describen con detalle en cualquier parte en el presente documento (véanse, por ejemplo, los Ejemplos que siguen a continuación). En algunos casos, una respuesta inmunológica se suprime *in vivo* en un sujeto a que se administra una cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunológica, tal como, por ejemplo, en los métodos de tratamiento terapéutico o profiláctico (por ejemplo, método para tratar enfermedad reumática, tal como artritis reumatoide, u otra enfermedad autoinmune) que se discuten con detalle en cualquier parte en el presente documento.

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

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

Se cree que diversas enfermedades o trastornos del sistema inmunológico, incluyendo enfermedad o trastorno reumático o del sistema autoinmune, se puede tratar de forma eficaz usando una o más de las moléculas que se desvelan en el presente documento, tal como, por ejemplo, un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-73, tal como, por ejemplo, D3-54 (SEQ ID NO: 36), D3-69 (SEQ ID NO: 50), o D3-27 (SEQ ID NO: 24) ECD de CTLA-4 mutante), o una proteína de fusión del mismo (por ejemplo, D3-54-IgG2 (SEQ ID NO: 197 o 211), D3-69-IgG2 (SEQ ID NO: 199 o 213), D3-29-IgG2 (SEQ ID NO: 79 o 210)). La enfermedad o trastorno del sistema inmunológico puede ser o puede implicar, por ejemplo, pero no se limita a, Enfermedad de Addison, Alergia, Alopecia Areata, Alzheimer, Vasculitis asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), Espondilitis Anquilosante, Síndrome Antifosfolípido (Síndrome de Hughes), artritis, Asma, Aterosclerosis, Placa aterosclerótica, enfermedad autoinmune (por ejemplo, lupus, RA, MS, enfermedad de Graves, etc.), Anemia Hemolítica Autoinmune, Hepatitis Autoinmune, Enfermedad autoinmune del oído interno, Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune, Miocarditis Autoinmune, Ooforitis Autoinmune, Orquitis Autoinmune, Azoospermia, Enfermedad de Behcet, Enfermedad de Berger, Penfigoide Bulloso, Cardiomiopatía, Enfermedad cardiovascular, Esprúe Celíaco/Enfermedad Celíaca, Síndrome de Fatiga Crónica y Disfunción Inmune (CFIDS), Polineuritis idiopática crónica, Enfermedad Desmielinizante Inflamatoria Crónica, Neuropatía polirradicular (CIPD), Polineuropatía recidivante crónica (síndrome de Guillain-Barré), Síndrome de Churg-Strauss (CSS), Penfigoide Cicatricial, Enfermedad de Aglutinina Fría (CAD), EPOC, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, Dermatitis, Dermatitis Herpetiforme, Dermatomiositis, diabetes, Lupus Discoide, Eccema, Epidermólisis bullosa adquirida, Crioglobulinemia Mixta Esencial, Síndrome de Evan, Exoftalmos, Fibromialgia, Síndrome de Goodpasture, enfermedad o trastorno relacionado con injertos, Enfermedad de Graves, GVHD, Tiroiditis de Hashimoto, Fibrosis Pulmonar Idiopática, Púrpura Trombocitopénica Idiopática (ITP), Nefropatía por IgA, enfermedad o trastorno inmunoproliferativo (por ejemplo, psoriasis), Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), Diabetes Mellitus Dependiente de Insulina (IDDM), Enfermedad pulmonar intersticial, diabetes juvenil, Artritis Juvenil, Artritis idiopática juvenil (JIA), Enfermedad de Kawasaki, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, Liqueur Plano, lupus, Nefritis Lúpica, Lipofisitis Linfocítica, Enfermedad de Ménière, Síndrome de Miller Fish/encefalomieloradiculopatía diseminada aguda, Enfermedad Mixta

del Tejido Conjuntivo, Esclerosis Múltiple (MS), Reumatismo muscular, Encefalomiélitis miálgica (ME), Miastenia Grave, Inflamación Ocular, Pénfigo Foliáceo, Pénfigo Vulgar, Anemia Perniciosa, Poliarteritis Nodosa, Policondritis, Síndromes Poliglandulares (síndrome de Whitaker), Polimialgia Reumática, Polimiositis, Agammaglobulinemia Primaria, Cirrosis Biliar Primaria/Colangiopatía autoinmune, Psoriasis, Artritis psoriásica, Fenómeno de Raynaud, Síndrome de Reiter/Artritis reactiva, Reestenosis, Fiebre Reumática, enfermedad reumática, Artritis Reumatoide, Sarcoidosis, síndrome de Schmidt, Esclerodermia, Síndrome de Sjörgen, Rechazo al trasplante de órgano sólido (riñón, corazón, hígado, pulmón, etc.), Síndrome de Stiff-Man, Lupus Sistémico Eritematoso (SLE), esclerodermia sistémica, Arteritis de Takayasu, Arteritis Temporal/Arteritis de Células Gigantes, Tiroiditis, Diabetes de Tipo 1, Diabetes de Tipo 2, Colitis ulcerosa, Uveítis, Vasculitis, Vitiligo, Granulomatosis de Wegener, y prevenir o suprimir una respuesta inmunológica asociada con rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de un donante por un sujeto receptor. Las enfermedades o trastornos relacionados con injerto incluyen enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), tales como asociadas con trasplante de médula ósea, y trastornos inmunológicos que resultan de o que están asociados a rechazo de trasplante de órgano, tejido o injerto celular (por ejemplo, aloinjertos o xenoinjertos de tejido o célula), incluyendo, por ejemplo, injertos de piel, músculo, neuronas, islotes, órganos, células parenquimatosas del hígado, etc. Con respecto a un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de un donante en un sujeto receptor, se cree que tales moléculas de la invención que se desvelan en el presente documento (por ejemplo, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante) pueden ser eficaces para prevenir el rechazo agudo de dicho trasplante en el receptor y/o para terapia de mantenimiento a largo plazo para prevenir el rechazo de tal trasplante en el receptor (por ejemplo, inhibición del rechazo del trasplante de células de los islotes productoras de insulina de un donante en el sujeto receptor que padece diabetes).

La invención incluye cualquiera de tal polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención para uso para suprimir una respuesta inmunológica asociada con al menos una de las enfermedades o trastornos del sistema inmunológico que se han mencionado anteriormente. También se proporciona el uso de cualquiera de tal polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención en la preparación de un medicamento para suprimir una respuesta inmunológica con al menos uno de las enfermedades y trastornos del sistema inmunológico que se han mencionado anteriormente.

Una cantidad eficaz de una molécula de la divulgación, tal como, por ejemplo, un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, D3-54, D3-69, D3-29, D3-56, D3-75) o una proteína de fusión de Ig que comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, D3-54-IgG2, D3-69-IgG2, D3-29-IgG2, D3-56-IgG2, D3-75-IgG2, respectivamente), para suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto o para tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico modulado por la interacción de linfocitos T endógenos con células endógenas que expresan CD80 y/o CD86 en un sujeto en los métodos que se describen en el presente documento puede comprender de aproximadamente 0,0001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto a aproximadamente 200 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto, o, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso del sujeto a al menos de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, o 75 mg/kg de peso corporal del sujeto. Una o más respuestas inmunológicas se puede suprimir en el sujeto, incluyendo, por ejemplo, respuesta de linfocitos T, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ , IL-2, etc.), inducción de diversos marcadores de activación (por ejemplo, CD25, receptor de IL-2, etc.), síntesis o producción de moléculas inflamatorias, inflamación, hinchazón de articulación, sensibilidad de articulación, dolor, rigidez, niveles en suero de proteína C-reactiva, producción de anticuerpos anti-colágeno, y/o respuesta(s) a anticuerpo dependientes de linfocitos T). Una cantidad eficaz de una molécula o componente de la invención para suprimir una respuesta inmunológica puede ser una cantidad que suprime una respuesta inmunológica o un síntoma o signo de la misma mediante una cantidad detectable o mensurable. La respuesta inmunológica se puede suprimir parcial o completamente. Una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico puede ser una cantidad que mejora, disminuye, o alivia al menos un síntoma o respuesta o efecto biológico asociado con la enfermedad o trastorno, previene la progresión de la enfermedad o trastorno, o mejora el funcionamiento físico del sujeto.

Una cantidad eficaz de una molécula o componente de la invención para modular o inhibir la interacción de los linfocitos T que expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7 puede ser una cantidad que modula o inhibe la unión entre células positivas para B7 y linfocitos T positivos para CD28 y/o positivos para CTLA-4, respectivamente. Tal interacción o interacciones de unión se pueden modular o inhibir parcial o totalmente.

En algunos de tales métodos, un dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención se administra al sujeto en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz (o dosis) suficiente para suprimir una respuesta inmunológica, tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico modulado por la interacción de linfocitos T con células que expresan B7, o modular o inhibir la interacción de linfocitos T expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7. El dímero de proteína de fusión administrado por lo general es un dímero de proteína de Fusión de Ig soluble. En algunos de tales métodos, la cantidad o dosis eficaz del dímero de proteína de fusión de la invención comprende de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto a aproximadamente 200 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto (tal como, por ejemplo, un ser

humano) o de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal del sujeto. Por ejemplo, la cantidad o dosis eficaz del dímero de proteína de fusión puede comprender de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del sujeto a al menos de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, o 300 mg/kg de peso corporal del sujeto (tal como, por ejemplo, ser humano, incluyendo un ser humano adulto). En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es de aproximadamente 0,001 miligramos (mg) a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo (kg) de peso corporal del sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto (por ejemplo, ser humano), de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del sujeto, o de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso del sujeto; por ejemplo, de aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg o 100 mg/kg de peso corporal del sujeto (por ejemplo, paciente humano adulto) se administra al sujeto. En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz del dímero de proteína de fusión es de aproximadamente 2 a 10 mg/kg, de aproximadamente 3 a 10 mg/kg, de aproximadamente 3 a 5 mg/kg, de aproximadamente 5 a 10 mg/kg, de 0,1 a 5 mg/kg, de aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,05 a 3 mg/kg, de aproximadamente 0,05 a 2,0 mg/kg, de aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 2,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 0,8 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,2 a 1 mg/kg, de aproximadamente 0,2 a 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,2 a 0,5 mg/kg de aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg, de aproximadamente 0,3 a 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,3 a 0,5 mg/kg de peso de un sujeto.

En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es inferior a aproximadamente 500 mg para un sujeto que pesan menos de 60 kg (por ejemplo, inferior a aproximadamente 100 mg, 75 mg, 50 mg, 25 mg, 12,5 mg o 10 mg), inferior a aproximadamente 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg (por ejemplo, inferior a aproximadamente 150 mg, 100 mg, 75 mg, 37,5 mg, o 20 mg), o inferior a aproximadamente 1000 mg para un sujeto que pesa más de 100 kg (por ejemplo, inferior a aproximadamente 500 mg, 100 mg, 50 mg, 25 mg, o 10 mg).

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

que pesa más de 100 kg (por ejemplo, inferior a aproximadamente 500 mg, 100 mg, 50 mg, 25 mg, o 10 mg).

La cantidad o dosis eficaz de un ácido nucleico, vector, composición, y/o célula de la invención suficiente para suprimir del mismo modo una respuesta inmunológica o para modular, tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico modulado por la interacción de linfocitos T con células que expresan B7, o modular o inhibir la interacción de linfocitos T expresan CD28 y/o CTLA-4 con células positivas para B7 se puede determinar. Por ejemplo, si un vector que codifica tal dímero de proteína de fusión de la invención se va a administrar al sujeto, alguien con experiencia en la materia puede determinar fácilmente la cantidad del vector a administrar de modo que probablemente se produzca en el sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del dímero de proteína de fusión.

Los dímeros de proteína de fusión a modo de ejemplo que se desvelan en el presente documento incluyen cualquiera de los que se han descrito con detalle anteriormente en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, un dímero de proteína de fusión que comprende dos monómeros de la proteína de fusión idénticos, en el que cada monómero de la proteína de fusión comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la divulgación fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de Ig (por ejemplo, Fc de IgG2, IgG1, IgG4 o polipéptido de Fc de Ig mutante que reduce la función efectora). Un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante a modo de ejemplo es uno que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73. Un dímero de proteína de fusión a modo de ejemplo es uno que comprende dos monómeros de la proteína de fusión, en el que cada monómero de la proteína de fusión comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222. Por lo general, las dos proteínas de fusión monoméricas en una proteína de fusión dimerica según en con enlace covalente en conjunto mediante al menos un enlace disulfuro formado entre resto(s) de cisteína presentes en cada monómero.

En cualquiera de los métodos que se han descrito anteriormente, la molécula o componente de la invención (por ejemplo, polipéptido (incluyendo, por ejemplo, proteína de fusión dimerica o monomérica o multímero de polipéptido), conjugado, ácido nucleico, vector, composición, y/o célula de la invención) se puede administrar al sujeto como una composición. La composición por lo general comprende al menos una de tal molécula o componente y un excipiente, vehículo, o diluyente. La composición puede comprender una composición farmacéutica que comprende al menos una de tal molécula o componente y un excipiente, vehículo, o diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS). El pH de las composiciones de la invención por lo general varía de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 9,0, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, normalmente de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0. En un aspecto, el pH de las composiciones de la invención por lo general varía de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,7, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 8,7, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 7,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 6,3 a aproximadamente pH 6,8, de aproximadamente pH 6,4 a aproximadamente pH 6,8, y de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,4. En un aspecto, una composición que comprende al menos una de tal molécula o componente de la invención, tal como, por ejemplo, una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, tiene un pH de pH 5,5, pH 6,0, pH 6,1, pH 6,2, pH 6,3, pH 6,4, pH 6,5, pH 6,6, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4, pH 7,5, pH 7,6, pH 7,7, pH 7,8, pH 7,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9, pH 9,0, pH 9,1, pH 9,2, pH 9,3, pH 9,4, pH 9,5, pH 9,6, pH 9,7, pH 9,8, pH 9,9, o pH 10,0. Algunas composiciones de la invención incluyen una o más sales (por ejemplo, cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro cálcico, y similares), uno o más tampones (por ejemplo, HEPES, citrato sódico, fosfato sódico (por ejemplo, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$), succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), y similares), uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más sacáridos o azúcares (por ejemplo, sacarosa, manosa, maltosa, dextrosa, y similares), y/o uno, dos, tres, cuatro o más polialcoholes o alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, sorbitol, glicol, glicerol, arabitól, eritritol, xilitol, ribitol, lactitol, y similares). En la composición se pueden incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más monosacáridos, disacáridos y/o polisacáridos. La composición de la invención puede comprender cualquier concentración de tal molécula o componente eficaz para suprimir una respuesta inmunológica cuando se administra al sujeto. Por ejemplo, en algunos de tales métodos (incluyendo, por ejemplo, métodos en los que la inmunosupresión es deseable, tales como, pero no limitados a, por ejemplo, el tratamiento de artritis reumatoide o trastornos inmunológicos similares, o para inhibir el rechazo de un tejido, célula, injerto, o trasplante de órgano de un donante por un sujeto receptor), una composición farmacéutica que comprende un vehículo, excipiente, o diluyente farmacéuticamente aceptable y un dímero de proteína de fusión de la invención se administra al sujeto (por ejemplo, por vía parental, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, etc.), en el que la composición farmacéutica comprende un dímero de proteína de fusión de la invención a una concentración de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente

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

La cantidad o dosis eficaz de una molécula de la invención que se administra a un sujeto particular puede variar dependiendo, por ejemplo, de la enfermedad, trastorno, o afección que se está tratando, la potencia de la molécula de CTLA-4 mutante en particular de la invención (es decir, su eficacia) (por ejemplo, un dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención) a administrar, el modo de administración de la molécula, y la capacidad individual del sujeto para tolerar una cantidad específica de la molécula en particular. Por ejemplo, en un método para suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto que tiene artritis reumatoide (RA) o un método para tratar RA, la cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, D3-75-IgG2, etc.) a administrar al sujeto se puede determinar basándose en diversos factores, incluyendo la potencia del dímero de CTLA-4-Ig mutante, el modo de administración del dímero, y/o la gravedad de los síntomas o signos de artritis reumatoide del sujeto. En un aspecto, una cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante en particular de la invención se puede determinar comparando la potencia de tal dímero de CTLA-4-Ig mutante con la del dímero Orencia®. En la técnica se conocen dosis del dímero Orencia® eficaces para tratar la artritis reumatoide y trastornos relacionados. Por ejemplo, el dímero Orencia® por lo general se administra por vía intravenosa a un ser humano que padece artritis reumatoide en una dosis de aproximadamente 10 mg de Orencia® por kilogramo (kg) de peso corporal del ser humano. Un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la invención que es aproximadamente "X" veces más potente que Orencia® se puede administrar (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, o de otro modo que se describe en el presente documento) a un ser humano que padece artritis reumatoide en una dosis que es aproximadamente "X" veces menor que la dosis del dímero Orencia® para conseguir un efecto terapéutico (por ejemplo, suprimir una respuesta inmunológica) que es aproximadamente equivalente a la del dímero Orencia®. Si se desea un efecto terapéutico mayor, una cantidad o dosis proporcionalmente aumentada del dímero de CTLA-4-Ig mutante se puede determinar fácilmente y administrar al ser humano.

En cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento, la molécula o componente de la invención (por ejemplo, un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, proteína de fusión dimerica o monomérica o multímero de polipéptido), conjugado, ácido nucleico, vector, composición, y/o célula de la invención) se puede administrar por vía parenteral, por vía subcutánea, o por vía intravenosa, o como se describe en cualquier parte en el presente documento. La molécula o componente de la invención se puede administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz una, dos, tres o cuatro veces al mes, dos veces a la semana, bisemanalmente (cada dos semanas), o bimensualmente (cada dos meses). La administración puede durar durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 o un periodo más largo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más años, incluyendo durante la vida del sujeto).

Cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento puede comprender adicionalmente la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un agente o compuesto terapéutico o inmunosupresor adicional. Por lo tanto, en el presente documento se desvela un método para suprimir una respuesta inmunológica

que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo (1) una cantidad eficaz de al menos un primer agente inmunosupresor, en el que cada uno de tal primer agente inmunosupresor es un polipéptido, ácido nucleico, vector, composición, y/o célula de la invención, y (2) una cantidad eficaz de al menos un segundo agente inmunosupresor, en el que se suprime una respuesta inmunológica en el sujeto.

5 Diversos agentes terapéuticos o inmunosupresores adicionales (que no son moléculas de la invención) se puede usar o administran en conjunto con una molécula de la invención (por ejemplo, polipéptido, ácido nucleico, vector, composición, y/o célula de la invención). Tales agentes incluyen, por ejemplo, un fármaco anti-reumático modificador de enfermedad (DMARD) (tal como, por ejemplo, metotrexato (MTX), antagonista de citoquina (por ejemplo, antagonista de IL-2 o IL-6), compuestos del video (por ejemplo, corticosteroide, glucocosteroide, por ejemplo, prednisona o metilprednisona), compuesto no esteroideo, salicilato de sodio o magnesio, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, acetaminofeno, anticuerpo, agente biológico que bloquear la síntesis de una citoquina antiinflamatoria de producción, Raptiva® efalizumab, agente o compuesto antiinflamatorio, y fármaco antiinflamatorios no esteroideo AINES). Tal agente terapéutico o inmunosupresor adicional se puede administrar al sujeto en una composición farmacéutica que comprende el agente adicional y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad o dosis eficaz del agente administrar dependerá del agente específico. Algunos de tales agentes en la actualidad se usan en terapias inmunosupresoras y las dosificaciones apropiadas se pueden determinar basándose en la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando y la capacidad del sujeto para tolerar cantidades o dosis específicas, y la eficacia inmunosupresora del agente. Se conocen dosis de agentes inmunosupresores a modo de ejemplo que se han descrito anteriormente que no son moléculas la invención. El agente inmunosupresor adicional que no es una molécula de la invención se puede administrar de forma simultánea con o antes o después de la administración de la molécula de la invención (por ejemplo, proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante).

25 Un régimen de tratamiento, que incluye, por ejemplo, dosis, programa de administración, método de administración (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección subcutánea, etc.) y composición farmacéutica que comprende al menos una de tal molécula o componente de la invención puede variar dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección a tratar. Una o más de tales moléculas componentes de la invención se puede administrar a un sujeto; no es necesario administrar cada una de tales moléculas o componentes en la misma formulación farmacéutica, con los mismos métodos de administración, en la misma cantidad, o con el mismo programa de frecuencia de dosificación.

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

45 Métodos para Tratar la Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide es una de las enfermedades autoinmunes inflamatorias sistémicas más comunes y se calcula que afecta a un 1-2 % de la población humana. Véase, por ejemplo, Dipiro, J.T., *Rheumatoid arthritis, en PHARMACOTHERAPY: A PATHOPHYSIOLOGIC APPROACH*, 1671-1682 (Talbert, R.T. *et al.*, eds., McGraw-Hill, New York, 6ª ed. 2005). La enfermera se caracteriza por hiperplasia de la membrana sinovial e infiltración de células inflamatorias, incluyendo linfocitos T activados. Los linfocitos T activados desempeñan un papel fundamental en la progresión de la artritis reumatoide mediante la estimulación de diversos tipos celulares para producir citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, y TNF-alfa, autoanticuerpos, y metaloproteinasas de matriz (Hoffman, R.W., *Front. Biosci.* 6: 1369-1378 (2001); Choy, E.K. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 344: 907-916 (2001)). La fuerte contribución de los linfocitos T a la progresión de la artritis reumatoide hace que la activación de los linfocitos T sea una diana racional a la intervención terapéutica. Se cree que tales moléculas inflamatorias causó la respuesta inflamatoria, daño tisular (por ejemplo, daño articular), y dolor asociado con la artritis reumatoide.

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

receptor CD28 en los linfocitos T.

El Abatacept Está aprobado en la actualidad para tratar pacientes humano adulto con RA de moderada a severamente activa que han tenido una respuesta inadecuada a uno o más DMARD, tales como metotrexato o antagonistas de TNF. El Abatacept se administra a un paciente con RA adulto a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal del sujeto mediante infusión intravenosa. Después de la primera dosis, se administra en segunda y tercera dosis de 10 mg/kg de la proteína de fusión al sujeto a dos y cuatro semanas, respectivamente, después de la primera dosis. Las dosis posteriores se administran cada cuatro semanas (es decir, una vez al mes). Se cree que la infusión intravenosa de Abatacept es necesario para suministrar el nivel de dosis elevará necesario para obtener una eficacia deseable en terapia para artritis reumatoide.

Otras terapias actuales para la artritis reumatoide incluyen la administración de agentes inmunosupresores no específicos, tales como metotrexato, y fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. Además, se aprueban agentes biológicos que se dirigen a citoquinas proinflamatorias específicas, tales como TNF- α (por ejemplo, Remicade® infliximab, Enbrel® entaercept, Humira® adalimumab) e IL-1 (por ejemplo, Kineret® anakinra). Sin embargo, muchas de estas terapias tienen efectos secundarios significativos - algunos de los cuales son tóxicos - En particular cuando se administran durante un periodo de tiempo largo.

A pesar de la disponibilidad de diversas terapias, existen necesidades sin satisfacer significativas para el tratamiento de RA. Por ejemplo, un 60 % de pacientes humanos con RA que han fallado con el tratamiento previo de DMARD y un 80 % de los pacientes humanos con RA que han fallado con la terapia anti-TNF previa no consiguieron puntuaciones de ACR50 después del tratamiento con Orenzia durante 6 meses (Kremer J.M. *et al.*, Ann. Intern. Med. 144: 865-876 (2006); Genovese, M.C. *et al.*, N. Engl. J. Med. 353: 1114-11 (2005)). Los estudios de respuesta a la dosis usando Abatacept y proteína de fusión Belatacept (LEA29Y-Ig) en el tratamiento de RA en adultos indicaron que la eficacia era dependiente de la dosis y no estaba saturada a los niveles de dosis más elevados sometidos a ensayo (Kremer, J.M. *et al.*, N. Engl. J. Med. 349: 1907-1915(2003); Moreland, L.W. *et al.*, Arthrit. Rheum. 46: 1470-1479 (2002)).

Se espera que una CTLA-4-Ig mutante dimérica soluble de la invención que tiene una avidéz de unión más elevada con respecto a hCD80 y/o hCD86 que Abatacept sea capaz de ejercer efectos inmunosupresores más potentes que Abatacept cuando se administra a un sujeto con RA. Tal CTLA-4-Ig mutante se une a un número similar de ligandos de CD80 y/o CD86 a una concentración más baja que Abatacept.

Un CTLA-4-Ig mutante con Una avidéz de unión más elevada hacia CD80 o CD86 y una tasa de disociación más lenta de CD80 o CD86, respectivamente, tiene un tiempo de permanencia más largo sobre tal ligandos. Se espera que este tiempo de permanencia más largo esté asociado con una mayor eficacia *in vivo*. Se cree que tal CTLA-4-Ig mutante puede ser eficaz en el tratamiento terapéutico o profiláctico de un sujeto con RA a una dosis que es menor que la de Abatacept.

Es decir, se cree que tal CTLA-4-Ig mutante puede conseguir un grado de eficacia equivalente al de Abatacept cuando se administra al sujeto con RA a una dosis que es menor que la dosis de Abatacept de 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. La invención proporciona proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante diméricas solubles de varias capacidades de avidéz de unión a hCD80 y/o hCD86. Las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante diméricas solubles que tienen capacidades de avidéz de unión sustancialmente más elevadas a hCD86 que Abatacept pueden tener un grado de eficacia equivalente ante Abatacept cuando se administran al sujeto con RA a una dosis que es sustancialmente menor a la de Abatacept. La administración de una dosis menor de tal CTLA-4-Ig mutante puede permitir el uso de un método de administración más conveniente (por ejemplo, inyección subcutánea) que en la actualidad se usa para administración de Abatacept (inyección intravenosa).

También se cree que una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble de la invención con una potencia inmunosupresor la más elevada que la de la proteína de fusión Abatacept o Belatacept podría permitir la obtención de un nivel de eficacia más elevado en el tratamiento de pacientes con RA. Se espera que un CTLA-4-Ig mutante inmunosupresor sea capaz de aliviar los síntomas asociados con la RA e inhibir la evolución de los efectos físicos perjudiciales de la RA de forma más eficaz que Abatacept. Tal CTLA-4-Ig mutante se puede formular en un diluyente, excipiente, o vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS) a una concentración que varía de 0,1 - 200 mg/ml. El tratamiento de un sujeto con RA se puede realizar mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz (dosis) del CTLA-4-Ig mutante mediante inyección subcutánea o infusión intravenosa a una frecuencia de dosificación apropiadamente determinada (por ejemplo, dosis inicial después de una dosis de 2 a 4 veces al mes, una dosis al mes, o una dosis cada dos meses). La dosis podría depender de la gravedad de la enfermedad o síntomas del sujeto. Por ejemplo, una cantidad o dosis de un CTLA-4-Ig mutante de no más de de aproximadamente 10 mg/kg (incluyendo por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,25 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, o 9 mg/kg) de peso corporal del sujeto se puede administrar. Un CTLA-4-Ig mutante más inmunosupresor puede permitir un programa de dosificación menos frecuente (por ejemplo, una vez cada dos meses) el programa de dosificación usado generalmente con Abatacept. Como alternativa, una cantidad o dosis de un CTLA-4-Ig mutante mayor que aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto (por ejemplo, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente

100 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg, etc., incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 15 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 g/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg) se puede administrar a un sujeto con RA si el estado y/o síntomas de la enfermedad del sujeto garantiza una cantidad o dosis de ese tipo.

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

En el presente documento se desvela un método para tratar artritis reumatoide en un sujeto con necesidad de tal tratamiento, método que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante dimérica soluble de la invención mediante, por ejemplo, inyección intravenosa o subcutánea. La cantidad o dosis eficaz puede comprender de aproximadamente 0,001 miligramos (mg) a aproximadamente 10 miligramos por kilogramo (kg) de peso corporal del sujeto, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, o 10 mg/kg de peso corporal del paciente humano adulto se administra al sujeto. En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es de aproximadamente 2 a 10 mg/kg, de aproximadamente 3 a 10 mg/kg, de aproximadamente 3 a 5 mg/kg, de aproximadamente 5 a 10 mg/kg, 0,1 a 5 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,05 a 3 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,05 a 2,0 mg/kg, de aproximadamente 0,05 a 1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,05 a 3 mg/kg de peso, de aproximadamente 0,1 a 2,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 0,8 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,2 a 1 mg/kg, de aproximadamente 0,2 a 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,2 a 0,5 mg/kg de aproximadamente 0,3 a 1 mg/kg, de aproximadamente 0,3 a 0,6 mg/kg, de aproximadamente 0,3 a 0,5 mg/kg de peso de un sujeto. En algunos casos, la cantidad o dosis eficaz es inferior a aproximadamente 500 mg para un sujeto que pesa menos de 60 kg (por ejemplo, inferior a aproximadamente 100 mg, 75 mg, 50 mg, 25 mg, o 12,5 mg), inferior a aproximadamente 750 mg para un sujeto que pesa entre 60-100 kg (por ejemplo, inferior a aproximadamente 150 mg, 100 mg, 75 mg, 37,5 mg, o 20 mg), o inferior a aproximadamente 1000 mg para un sujeto que pesa más de 100 kg (por ejemplo, inferior a aproximadamente 500 mg, 100 mg, 50 mg, 25 mg, o 10 mg). Después de la primera dosis, se administran dosis equivalentes posteriores a intervalos de 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, o 16 semanas. Si fuera necesario se puede determinar la frecuencia de dosificación posterior.

Tal proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante se puede formular con un excipiente, vehículo, o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica adecuada para administración a un sujeto (por ejemplo, mamífero, que incluye un ser humano). La concentración de la proteína de fusión en la composición puede variar de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml o de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 25 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml. También se contempla otras composiciones, incluyendo las que se han discutido anteriormente y se discuten a continuación.

Se espera que un tratamiento de ese tipo reduzca uno o más signos y/o síntomas asociados con la artritis reumatoide, tal como, por ejemplo, inflamación, sensibilidad de articulación, hinchazón de articulación, dolor, y rigidez, en el sujeto. Un tratamiento de ese tipo puede reducir la progresión adicional de la enfermedad en el paciente. Por ejemplo, un tratamiento de ese tipo puede reducir la progresión del daño estructural en el paciente. Un tratamiento de este tipo puede mejorar el funcionamiento físico del sujeto.

Métodos para Inhibir el Rechazo a Transplante de Tejido, Célula, Injerto, u Órgano

En el presente documento se desvela un método para inhibir el rechazo de, o suprimir una respuesta inmunológica asociada con, un trasplante de tejido, célula, injerto de piel, u órgano de un donante por un sujeto receptor, método que comprende la administración al sujeto receptor de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los

siguientes: (1) un polipéptido de la invención (por ejemplo, polipéptido de CTLA-4-ECD mutante o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante dimérica o monomérica); (2) un multímero que comprende uno o más polipéptidos de la invención (por ejemplo, un dímero que comprende cualesquiera dos de tales polipéptidos o un tetrámero que comprende cualesquiera cuatro de tales polipéptidos); (3) un conjugado que comprende al menos un polipéptido de la invención; (4) un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención); (5) un vector que comprende un ácido nucleico de la invención o que codifica un polipéptido de la invención; (6) una célula o población de células que comprende un polipéptido, ácido nucleico, conjugado, y/o vector de la invención; y/o (7) una composición de la invención, inhibiendo de ese modo el rechazo del trasplante de tejido, célula, injerto de piel, u órgano por el sujeto receptor. El donante y el receptor pueden ser de la misma especie o de diferentes especies. El donante y el receptor pueden ser un mamífero, tal como un ser humano, primate no humano (por ejemplo, mono, gorila), oveja, gato, perro, cerdo, vaca, caballo, etc. En algunos de tales métodos, el polipéptido, conjugado, vector, y/o célula de la invención se administra al sujeto receptor antes de, de forma simultánea con, o después del trasplante de tejido, célula, injerto de piel, u órgano. La cantidad eficaz por lo general comprende de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso del sujeto a aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunos de tales métodos, por ejemplo, la cantidad eficaz comprende de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto a al menos de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, o 300 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto. En algunos de tales métodos, la cantidad eficaz comprende de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto a al menos de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 50, o 75 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto. El polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, y/o célula de la invención se puede administrar al sujeto receptor durante, antes de, o inmediatamente después del trasplante. Como alternativa o adicionalmente, tal molécula de la invención se puede administrar una o más horas después del trasplante, el día después del trasplante, y/o diariamente a partir de ese momento, o al menos una vez a la semana, al menos una vez cada dos semanas, o al menos una vez al mes después del trasplante, según sea necesario, hasta 12, 24, o 36 o más meses o un período mayor si fuera necesario. El trasplante de órgano puede implicar cualquier órgano, tal como, por ejemplo, un riñón, hígado, corazón, o pulmón.

La cantidad o dosis eficaz de una molécula de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante) a administrar a un sujeto receptor de trasplante de órgano, tejido, o célula con el fin de inhibir el rechazo al trasplante (o suprimir una respuesta inmunológica asociada con tal trasplante) por lo general se determina basándose en la potencia de tal molécula, modo de administración, el tipo de trasplante (por ejemplo, célula, tejido, órgano), la historia del sujeto, y/o la gravedad de los síntomas o signos del sujeto receptor del trasplante de una respuesta inmunológica(s) que sugiere rechazo al trasplante. Por ejemplo, una cantidad o dosis eficaz de un dímero de CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, D3-75-IgG2 dímero, etc.) se puede determinar comparando la potencia de tal dímero con la del dímero Belatacept. Se conocen dosis eficaces de Belatacept útiles para prevenir o suprimir una respuesta inmunológica asociada con trasplante de riñón/renal. Por ejemplo, Belatacept se administra por infusión intravenosa a un ser humano después del trasplante de riñón en el ser humano de un donante de riñón en una cantidad o dosis de aproximadamente 5 mg o 10 mg por kilogramo de peso corporal del ser humano al mes. Un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la invención que es aproximadamente "X" veces más potente que Belatacept se puede administrar (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, o de otra manera que se describe en el presente documento) a un ser humano que se ha sometido a trasplante de riñón en una cantidad o dosis que es aproximadamente "X" veces menor que la dosis de Belatacept para conseguir un efecto terapéutico (por ejemplo, suprimir una respuesta inmunológica) aproximadamente equivalente a la de Belatacept. Si se desea un efecto terapéutico mayor, se puede determinar y administrar una cantidad o dosis proporcionalmente aumentada del dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig.

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

En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el rechazo al trasplante de células de los islotes de un donante en un sujeto receptor con necesidad del mismo, método que comprende la administración al sujeto de una cantidad o dosis eficaz de una molécula de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante) antes de, de forma simultánea con, o después del trasplante de células(s) de los islotes del páncreas de un donante en el sujeto. El sujeto (por ejemplo, ser humano) por lo general padece diabetes (por ejemplo, IDDM) y tal método es útil para tratar un sujeto diagnosticado con o que padece diabetes. Los procedimientos de trasplante de islotes se conocen en la técnica. Por lo general, los islotes se retiran del páncreas de un donante de órganos muerto, se purifican y se procesan, y se implantan en un sujeto receptor que padece diabetes. Después del trasplante, las células beta células en los islotes comienzan a producir y liberar insulina, reduciendo de ese modo la necesidad de insulina del sujeto receptor.

En tales métodos para inhibir el rechazo al trasplante, la molécula de CTLA-4 mutante de la invención (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante) se puede formular con un excipiente, vehículo, o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica adecuada para su administración a un sujeto (por ejemplo, mamífero, incluyendo un ser humano). Algunos de tales métodos comprenden la administración de una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo, o diluyente farmacéuticamente aceptable y un dímero de CTLA-4-Ig mutante de la invención que tiene una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml o de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 25 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mg/ml, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml. También se contemplan otras composiciones, incluyendo las que se han discutido anteriormente y se discuten a continuación.

Métodos para Inhibir una Respuesta Inmunológica

En otro aspecto, la invención incluye el uso de un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, una proteína de fusión dimérica o monomérica o polipéptido multimérico), conjugado, ácido nucleico, vector, o célula de la invención para la preparación de un medicamento para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un mamífero (por ejemplo, ser humano o primate no humano). Las respuestas inmunológicas que se pueden suprimir incluyen, por ejemplo, activación o proliferación de linfocitos T, síntesis o producción de citoquinas, inducción de marcadores de activación, síntesis o producción de moléculas inflamatorias, inflamación, producción de Ab anti-colágeno, respuesta de Ab dependiente de linfocitos T.

La invención también incluye el uso de un polipéptido (incluyendo, por ejemplo, una proteína de fusión dimérica o monomérica o polipéptido multimérico), conjugado, ácido nucleico, vector, o célula de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico. La enfermedad o trastorno del sistema inmunológico puede ser uno que esté mediado por la interacción de los linfocitos T con células positivas para CD80 y/o células positivas para CD86 en un mamífero. La enfermedad o trastorno del sistema inmunológico puede ser una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico, tal como una enfermedad o trastorno reumático o una enfermedad autoinmune o trastorno autoinmune. Tal enfermedad o trastorno del sistema inmunológico puede ser o puede implicar, por ejemplo, pero no se limita a, Enfermedad de Addison, Alergia, Alopecia Areata, Alzheimer, Vasculitis asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), Espondilitis Anquilosante, Síndrome Antifosfolípido (Síndrome de Hughes), artritis, Asma, Aterosclerosis, Placa aterosclerótica, enfermedad autoinmune (por ejemplo, lupus, RA, MS, enfermedad de Graves, etc.), Anemia Hemolítica Autoinmune, Hepatitis Autoinmune, Enfermedad autoinmune del oído interno, Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune, Miocarditis Autoinmune, Ooforitis Autoinmune, Orquitis Autoinmune, Azoospermia, Enfermedad de Behcet, síndrome de Behcet, Enfermedad de Berger, Penfigoide Bulloso, Cardiomiopatía, Enfermedad cardiovascular, Esprúe Celíaco/Enfermedad Celíaca, Síndrome de Fatiga Crónica y Disfunción Inmune (CFIDS), Polineuritis idiopática crónica, Enfermedad Desmielinizante Inflamatoria Crónica, Neuropatía polirradicular (CIPD), Polineuropatía recidivante crónica (síndrome de Guillain-Barré), Síndrome de Churg-Strauss (CSS), Penfigoide Cicatricial, Enfermedad de Aglutinina Fría (CAD), EPOC, síndrome de CREST, Enfermedad de Crohn, Dermatitis, Dermatitis Herpetiforme, Dermatomiositis, diabetes, Lupus Discoide, Eccema, Epidermólisis bullosa adquirida, Crioglobulinemia Mixta Esencial, Síndrome de Evan, Exoftalmos, Fibromialgia, Síndrome de Goodpasture, enfermedad o trastorno relacionado con injertos, Enfermedad de Graves, GVHD, Tiroiditis de Hashimoto, Fibrosis Pulmonar Idiopática, Púrpura Trombocitopénica Idiopática (ITP), Nefropatía por IgA, enfermedad o trastorno inmunoproliferativo (por ejemplo, psoriasis), Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), Diabetes Mellitus Dependiente de Insulina (IDDM), Enfermedad pulmonar intersticial, diabetes juvenil, Artritis Juvenil, Artritis idiopática juvenil (JIA), Enfermedad de Kawasaki, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, Liqueur Plano, lupus, Nefritis Lúpica, Lipofisitis Linfocítica, Enfermedad de Ménière, Síndrome de Miller Fish/encefalomieloradiculopatía diseminada aguda, Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo, Esclerosis Múltiple (MS), Reumatismo muscular, Encefalomielitis miálgica (ME), Miastenia Grave, Inflamación Ocular, Pénfigo Foliáceo, Pénfigo Vulgar, Anemia Perniciosa, Poliarteritis Nodosa, Policondritis, Síndromes Poliglandulares (síndrome de Whitaker), Polimialgia Reumática, Polimiositis, Agammaglobulinemia Primaria, Cirrosis Biliar Primaria/Colangiopatía autoinmune, Psoriasis, Psoriasis, Artritis psoriásica, Fenómeno de Raynaud, Síndrome de Reiter/Artritis reactiva, Reestenosis, Fiebre Reumática, enfermedad reumática, Artritis Reumatoide, Sarcoidosis, síndrome de Schmidt, Esclerodermia, Síndrome de Sjörgen, Rechazo al trasplante de órgano sólido (riñón, corazón, hígado, pulmón, etc.), Síndrome de Stiff-Man, Lupus Sistémico Eritematoso (SLE), esclerodermia sistémica, Arteritis de Takayasu, Arteritis Temporal/Arteritis de Células Gigantes, Tiroiditis, Diabetes de Tipo 1, Diabetes de Tipo 2, Colitis ulcerosa, Uveítis, Vasculitis, Vitíligo, Granulomatosis de Wegener, y prevenir o suprimir una respuesta inmunológica asociada con rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto u órgano de un donante por un sujeto receptor.

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

Evaluación de las Respuestas Inmunológicas

- 10 Las respuestas inmunológicas suprimidas por un polipéptido, ácido nucleico, vector, virus, pseudovirus, VLP, o composición de la invención se pueden medir mediante cualquier técnica adecuada. Los ejemplos de técnicas útiles para evaluar respuestas inmunológicas humorales incluyen citometría de flujo, ensayos de inmunotransferencia, ensayos de inmunohistoquímica, ensayos de inmunoprecipitación, radioinmunoensayos (RIA), y inmunoensayos enzimáticos. Los inmunoensayos enzimáticos incluyen ensayos de inmunoflujo relacionado con enzimas (ELIFA) y ensayos inmunoabsorbentes relacionado con enzimas (ELISA), incluyendo ELISA de sándwich y ELISA competitivo.
- 15 Para detectar complejos de anticuerpos y sustancias diana también se puede usar HPLC y electroforesis capilar (CE). Las directrices generales para realizar tales técnicas y principios relacionados se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York, Hampton R *et al.*, (1990) SEROLOGICAL METHODS A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul Minn., Stevens (1995) CLINICAL IMMUNOLOGY AND SEROLOGY: A LABORATORY PERSPECTIVE, CRC press, Bjerrum (1988) HANDBOOK OF IMMUNOBLOTTING OF PROTEINS, Vol. 2, Zoa (1995) DIAGNOSTIC IMMUNOPATHOLOGY: LABORATORY PRACTICE AND CLINICAL APPLICATION, Cambridge University Press, Folds (1998) CLINICAL DIAGNOSTIC IMMUNOLOGY: PROTOCOLS IN QUALITY ASSURANCE AND STANDARDIZATION, Blackwell Science Inc., Bryant (1992) LABORATORY IMMUNOLOGY & SEROLOGY 3ª edición, W B Saunders Co., y Maddox D E *et al.*, (1983) J. Exp. Med. 158: 1211. Las directrices con respecto a técnicas de ELISA y principios relacionados se describen en, por ejemplo, Reen (1994) Methods Mol. Biol. 32: 461-6, Goldberg *et al.*, (1993) Curr. Opin. Immunol. 5 (2): 278-81, Voller *et al.*, (1982) Lab. Res. Methods Biol. Med. 5: 59-81, Yolken *et al.*, (1983) Ann. NY Acad. Sci. 420: 381-90, Vaughn *et al.*, (1999) Am. J. Trop. Med. Hyg. 60 (4): 693-8, y Kuno *et al.*, (1991) J. Virol. Methods 33 (1-2): 101-13. Las directrices con respecto a técnicas de citometría de flujo se proporcionan en, por ejemplo, Diamond (2000) IN LIVING COLOR : PROTOCOLS IN FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING, Springer Verlag, Jaroszeki (1998) FLOW CYTOMETRY PROTOCOLS, 1ª Ed., Shapiro (1995) PRACTICAL FLOW CYTOMETRY, 3ª edición, Rieseberg *et al.*, (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol. 56 (3- 4): 350-60, Scheffold y Kern (2000) J. Clin. Immunol. 20 (6): 400-7, y McSharry (1994) Clin. Microbiol. Rev. (4): 576-604.
- 20
- 25
- 30
- 35 Las respuestas inmunológicas citotóxicas y otras respuestas inmunológicas de linfocitos T también se pueden medir mediante cualquier técnica adecuada. Los ejemplos de tales técnicas incluyen ensayo de ELISpot (en particular, ELISpot de IFN-gamma), tinción de citoquina intracelular (ICC) (en particular en combinación con análisis FACS), tinción de tetrámero de linfocitos T CD8⁺/FACS, ensayos de proliferación de linfocitos T convencionales y modificados, ensayo de CTL de liberación de cromo, análisis de dilución limitante (LDA), y ensayos de eliminación de CTL. Las directrices y principios relacionados con ensayos de proliferación de linfocitos T se describen en, por ejemplo, Plebanski y Burtles (1994) J. Immunol. Meth. 170: 15, Sprent *et al.*, (2000) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 355 (1395): 317-22 y Messele *et al.*, (2000) Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7 (4): 687-92. LDA se describe en, por ejemplo, Sharrock *et al.*, (1990) Immunol. Today 11: 281-286. Los ensayos de ELISpot y principios relacionados se describen en, por ejemplo, Czerinsky *et al.*, (1988) J. Immunol. Meth. 110: 29-36, Olsson *et al.*, (1990) J. Clin. Invest. 86: 981-985, Schmittel *et al.*, (2001) J. Immunol. Meth. 247 (1-2): 17-24, Ogg y McMichael (1999) Immunol. Lett. 66 (1-3): 77-80, Schmittel *et al.*, (2001) J. Immunol. Meth. 247 (1-2): 17-24, Kurane *et al.*, (1989) J. Exp. Med. 170 (3): 763-75, Chain *et al.*, (1987) J. Immunol. Meth. 99 (2): 221-8, Czerkinsky *et al.*, (1988) J. Immunol. Meth. 110: 29-36, y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.750.356 y 6.218.132. Los ensayos de tetrámero Se discuten en, por ejemplo, Skinner *et al.*, (2000) J. Immunol. 165 (2): 613-7. Otras técnicas analíticas de linfocitos T Se describen en Hartel *et al.*, (1999) Scand. J. Immunol. 49 (6): 649-54 y Parish *et al.*, (1983) J. Immunol. Meth. 58 (1- 2): 225-37.
- 40
- 45
- 50

La activación de linfocitos T También se puede analizar midiendo la actividad CTL o expresión de antígenos de activación tales como moléculas de receptor de IL-2, CD69 o HLA-DR. La proliferación de linfocitos T purificados se puede medir en un ensayo reacción de linfocitos mixto (MLR); tales ensayos se conocen bien en la técnica.

Los ensayos de ELISpot Miden el número de linfocitos T que secretan una citoquina específica, tal como IFN- γ o TNF- α , que sirve como un marcador de efectores de linfocitos T. Los kits de ELISA específicos de citoquina están disponibles en el mercado (por ejemplo, un ELISPot específico de IFN- γ está disponible a través de R&D Systems, Minneapolis, MN).

Los métodos adicionales para evaluar y medir la capacidad de moléculas de la invención (por ejemplo, polipéptidos de la invención, incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante solubles de la invención) para suprimir o inhibir activación de linfocitos T y/o proliferación de linfocitos T se describen en los Ejemplos 5-8 en la sección de Ejemplos que sigue a continuación.

Métodos de Administración

En cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento, una composición farmacéutica inyectable que comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado (por ejemplo, PBS) y una cantidad eficaz de una molécula de la invención, tal como un polipéptido (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante monomérico, dimérico, o multimérico) o conjugado de la invención, se puede administrar por vía parenteral, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía subdérmica, por vía transdérmica, por vía subcutánea, o por vía intradérmica a un hospedador. Como alternativa, se pueden usar técnicas biolísticas de suministro de proteínas (suministro con pistola de vacuna) (cuyos ejemplos se discuten en cualquier parte en el presente documento). También se pensó partir otra técnica adecuada. La administración del polipéptido se puede facilitar mediante liposomas. Cualquier técnica de suministro se puede usar para suministrar un polipéptido o conjugado de la invención en conjunto con cualquier método terapéutico profiláctico que se describe en el presente documento.

Aunque la siguiente discusión se dirige principalmente a los nucleicos, se entenderá que se aplica igualmente a vectores de ácido nucleico de la invención. Un ácido nucleico de la invención o composición del mismo se puede administrar a un hospedador mediante cualquier vía de administración adecuada. En algunos aspectos que se desvelan en el presente documento, la administración del ácido nucleico es por vía parenteral (por ejemplo, subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), o intradérmica (i.d.)), tópica, o transdérmica. El ácido nucleico se puede introducir directamente en un tejido, tal como músculo, mediante inyección usando una aguja u otro dispositivo similar. Véase, por ejemplo, Nabel *et al.*, (1990), mencionado anteriormente; Wolff *et al.*, (1990) *Science* 247: 1465-1468, Robbins (1996) *Gene Therapy Protocols*, Humana Press, NJ, y Joyner (1993) *Gene Targeting: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, England, y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.580.859 y 5.589.466. Otros métodos tales como transformación "biolística" o mediada por partícula (léanse, por ejemplo, Los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.945.050 y 5.036.006, Sanford *et al.*, *J. Particulate Sci. Tech.* 5:27-37 (1987), Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9568-72 (1990), y Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2726-30 (1991)). Estos métodos son útiles no solamente para introducción de ADN *in vivo* en un sujeto, tal como un mamífero, sino también para modificación *ex vivo* de células para reintroducción en un mamífero (que se discute adicionalmente en cualquier parte en el presente documento).

Para administración con pistola genética convencional, el vector o ácido nucleico de interés se precipita sobre la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas helio en expansión, y penetran en los tejidos hasta una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, el Dispositivo de Suministro Genético Accel™ fabricado por Agacetus, Inc. Middleton WI es adecuado para uso en esta realización. El ácido nucleico o vector se puede administrar mediante técnicas tales como, por ejemplo, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía subdérmica, por vía subcutánea, y/o por vía intraperitoneal. Los dispositivos y técnicas adicionales relacionados con suministro biolístico se presentan en las Publ. De Sol. de Patente Internacional N.ºs WO 99/2796, WO 99/08689, WO 99/04009, y WO 98/10750, y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.525.510, 5.630.796, 5.865.796, y 6.010.478.

El ácido nucleico se puede administrar en asociación con un agente que facilita la transfección, cuyos ejemplos se han discutido anteriormente. El ácido nucleico sea puede administrar por vía tópica y/o mediante su ministro de partícula líquida (a diferencia del suministro biolístico de partícula sólida). Los ejemplos de tales técnicas de suministro de ácido nucleico, composiciones, y construcciones adicionales que pueden ser adecuadas como vehículos de suministro para los ácidos nucleicos de la invención se proporcionan en, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.591.601, 5.593.972, 5.679.647, 5.697.901, 5.698.436, 5.739.118, 5.770.580, 5.792.751, 5.804.566, 5.811.406, 5.817.637, 5.830.876, 5.830.877, 5.846.949, 5.849.719, 5.880.103, 5.922.687, 5.981.505, 6.087.341, 6.107.095, 6.110.898, y en las Publ. De Sol. de Patente Internacional N.ºs WO 98/06863, WO 98/55495, y WO 99/57275.

Como alternativa, el ácido nucleico se puede administrar al hospedador por medio de suministro genético basado en liposoma. Las técnicas y principios a modo de ejemplo relacionados con el suministro genético basado en liposoma se proporcionan en, por ejemplo, Debs y Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6 (7): 682-691; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.279.833 de Rose; Brigham (1991) WO 91/06309; Brigham *et al.*, (1989) *Am. J. Med. Sci.* 298: 278-281; Nabel *et al.*, (1990) *Science* 249: 1285-1288; Hazinski *et al.*, (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.* 4: 206-209; y Wang y Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, y Felgner *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7414). Las composiciones farmacéuticamente aceptables de liposoma adecuadas que se pueden usar para suministrar el ácido nucleico se describen adicionalmente en cualquier parte en el presente documento.

En los métodos de la invención se puede usar cualquier cantidad de ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, Una cantidad suficiente de ácido nucleico se puede formular en un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable y se puede administrar a un sujeto de modo que el polipéptido o conjugado codificado se produzca en el sujeto en una cantidad que se cree que es eficaz para, por ejemplo, suprimir la respuesta inmunológica en el sujeto, inhibir la interacción entre células positivas para B7 endógenas y células positivas para CD28 en el sujeto, o inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula, órgano, o injerto. En un formato, en el que el ácido nucleico se administra

- mediante inyección, se administran de aproximadamente 50 microgramos (μg) a 100 mg de ácido nucleico. En una aplicación a modo de ejemplo, para suprimir una respuesta inmunológica, una composición farmacéutica que comprende PBS y una cantidad de un vector de ADN que codifica una cantidad eficaz de un polipéptido CTLA-4 mutante se administra mediante inyección o electroporación u otro método de suministro adecuado (por ejemplo, pistola genética, impresión a través de la piel, y lipofección) a un sujeto con necesidad de tratamiento (por ejemplo, un sujeto que padece una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico en el que se desea el tratamiento). Un vector a modo de ejemplo se muestra en la Figura 1.
- La cantidad de plásmido de ADN para uso en los métodos de la divulgación cuando la administración se realiza mediante pistola genética, por ejemplo, a menudo es de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 veces menor que la cantidad usada para inyección directa (por ejemplo, mediante inyección con aguja convencional). A pesar de tal sensibilidad, en tardes técnicas biofísicas de suministro se puede usar al menos aproximadamente 1 μg del ácido nucleico.
- Los sistemas de vector viral de ARN o ADN puede ser útiles para suministro de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención. Los vectores virales se pueden administrar directamente a un sujeto *in vivo* o se pueden usar para tratar células *in vitro* y las células modificadas se administran al sujeto en un formato *ex vivo*. Los vectores virales útiles incluyen los que se han discutido anteriormente, tales como vectores de virus adeno-asociados, adenovirales, retrovirales, lentivirus, y herpes simplex. Con tales vectores virales, un ácido nucleico de la invención se puede transferir fácilmente en células y tejidos diana del sujeto. Además, con los métodos de transferencia genética de retrovirus, lentivirus, y virus adeno-asociado, es posible integrar un ácido nucleico de la invención en el genoma hospedador, dando como resultado de ese modo una expresión continua del ácido nucleico insertado.
- Se cree que el suministro de un vector viral de la invención que comprende al menos un ácido nucleico de la invención a un sujeto es capaz de suprimir una respuesta inmunológica en el sujeto al que se administra el vector. Opcionalmente, algunos métodos profilácticos y/o terapéuticos de la divulgación se ponen en práctica con una dosificación de un vector viral adecuado suficiente para inhibir una respuesta inmunológica detectable. Cualquier vector viral adecuado que comprende un ácido nucleico de la invención, en cualquier concentración adecuada, se puede usar para suprimir la respuesta inmunológica. Por ejemplo, al hospedador objeto se le puede administrar una población de vectores retrovirales (cuyos ejemplos se describen en, por ejemplo, Buchscher *et al.*, (1992) *J. Virol.* 66 (5) 2731-2739, Johann *et al.*, (1992) *J. Virol.* 66 (5): 1635-1640 (1992), Sommerfelt *et al.*, (1990) *Virol.* 176: 58-59, Wilson *et al.*, (1989) *J. Virol.* 63: 2374-2378, Miller *et al.*, *J. Virol.* 65: 2220-2224 (1991), Wong-Staal *et al.*, documento PCT/US94/05700, Rosenberg y que Fauci (1993) en FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, THIRD EDITION Paul (ed.) Raven Press, Ltd., New York y las referencias que se encuentran en el mismo), un vector AAV (como se describe en, por ejemplo, West *et al.*, (1987) *Virology* 160: 38-47, Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801, Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94: 1351, Tratschin *et al.*, (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5 (11): 3251-3260, documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.797.368 y que 5.173.414, y Sol. de Patente Internacional Publ. N.º WO 93/24641), o un vector adenoviral (como se describe en, por ejemplo, Berns *et al.*, (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772: 95-104; Ali *et al.*, (1994) *Gene Ther.* 1: 367-384; y Haddada *et al.*, (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 (Pt 3): 297-306), tales niveles inmunosupresores de expresión del ácido nucleico se incluyen en el vector resultante, de ese modo dando como resultado la respuesta inmunosupresora deseada. Otros tipos de vectores virales adecuados se describen en cualquier parte en el presente documento (incluyendo los ejemplos alternativos de vectores retrovirales, AAV, y adenovirales adecuados).
- Las condiciones de infección adecuadas para estos y otros tipos de partículas de vector viral se describen en, por ejemplo, Bachrach *et al.*, *J. Virol.*, 74 (18), 8480-6 (2000), Mackay *et al.*, *J. Virol.*, 19 (2), 620-36 (1976), y FIELDS VIROLOGY, mencionado anteriormente. Las técnicas adicionales útiles en la producción y aplicación de vectores virales se proporcionan en, por ejemplo, "Practical Molecular Virology: Viral Vectors for Gene Expression" en METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, vol. 8, Collins, M. Ed., (Humana Press 1991), VIRAL VECTORS: BASIC SCIENCE AND GENE THERAPY, 1ª Ed. (Cid-Arregui *et al.*, Eds.) (Eaton Publishing 2000), "Viral Expression Vectors", en CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, Oldstone *et al.*, Eds. (Springer-Verlag, NY, 1992), y "Viral Vectors" en CURRENT COMMUNICATIONS IN BIOTECHNOLOGY, Gluzman y Hughes, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).
- La toxicidad y eficacia terapéutica de vectores o virus que incluyen una o más moléculas de la invención se determinan usando procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. La DLM₅₀ (la dosis mínima de tal para un 50 % de la población) y/o la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de la población) se puede determinar usando procedimientos que se presentan en el presente documento y los que de otro modo se conocen en la técnica. Véase también S. Plotkin y W. Orenstein, VACCINES (W. B. Saunders Co. 1999 3ª ed.) parados y sugeridas para vacunas virales conocidas. Los ácidos nucleicos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, células transducidas y otras formulaciones de la presente invención se pueden administrar en una cantidad determinada, por ejemplo, con la DLM₅₀ de la formulación, y los efectos secundarios de la misma a diversas concentraciones, tal como se aplica a la masa y a la salud general del paciente. Por lo tanto, en el presente documento se desvela un método para inducir una respuesta inmunológica mediante la administración de una dosis igual o mayor que la DE₅₀ de una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una población de partículas similares a un virus o virus (por ejemplo, virus atenuado o con deficiencia de replicación) que comprende

un polipéptido o ácido nucleico de la invención. La administración se puede realizar mediante una sola dosis o dosis divididas (ya sea mediante coadministración, administración en serie, o combinaciones de las mismas). Las técnicas y protocolos de administración se describen en, por ejemplo, Plotkin (VACCINES) mencionado anteriormente y otras referencias que se citan en el presente documento. En un sentido relacionado, las técnicas para evaluar la dosificación de las composiciones de ácido nucleico, polipéptido, vector, y célula eficaces para inducir inmunidad se describen en, por ejemplo, Sol de Patente Europea N.º 1 156 333 y referencias que se citan en ese documento.

El vector viral se puede dirigir a tejidos, células, y/u órganos en particular de un sujeto, por ejemplo, mamífero. Los ejemplos de tales vectores se han descrito anteriormente. Por ejemplo, el vector viral o vector de ácido nucleicos se puede usar para suministrar de forma selectiva la secuencia de ácidos nucleicos de la invención a monocitos, células dendríticas, células asociadas con células dendríticas (por ejemplo, queratinocitos asociados con células de Langerhans), linfocitos T, y/o linfocitos B. El vector viral puede ser un vector viral con deficiencia de replicación. La partícula de vector viral también se prevé modificar para reducir la respuesta inmunológica del hospedador con respecto al vector viral, consiguiendo de ese modo una expresión genética persistente. Tales vectores de "furtivos" se describen en, por ejemplo, Martin, *Exp. Mol. Pathol.* 66 (1): 3-7 (1999), Croyle *et al.*, *J. Virol.* 75 (10): 4792-801 (2001), Rollins *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7 (5): 619-26 (1996), Ikeda *et al.*, *J. Virol.* 74 (10): 4765-75 (2000), Halbert *et al.*, *J. Virol.* 74 (3): 1524-32 (2000), y Publ. de Sol. de Patente Internacional N.º WO 98/40509. Como alternativa o adicionalmente, las partículas de vector se pueden administrar mediante una estrategia seleccionada para reducir la respuesta inmunológica del hospedador a las partículas de vector. Las estrategias para reducir la respuesta inmunológica a la partícula de vector viral después de su administración a un hospedador se proporcionan en, por ejemplo, Maione *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (11): 5986-91 (2001), Morral *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (22): 2816-21 (1999), Pastore *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 10 (11): 1773-81 (1999), Morsy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (14): 7866-71 (1998), Joos *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 7 (13): 1555-66 (1996), Kass-Eisler *et al.*, *Gene Ther.* 3 (2): 154-62 (1996), documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.093.699, 6.211.160, 6.225.113, Publ. de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2001-0066947A1.

La piel y el músculo generalmente son las dianas preferentes para la administración del polipéptido, conjugados, ácidos nucleicos, y vectores de la invención, mediante cualquier técnica adecuada. Por lo tanto, la administración de un polipéptido, conjugado, ácido nucleico, o vector de la invención en o a través de la piel de un sujeto (por ejemplo, mamífero), es una característica de la invención. Tales moléculas de la invención se pueden administrar en una solución inyectable farmacéuticamente aceptable en o a través de la piel, por ejemplo, por vía intramuscular, o por vía intraperitoneal. La administración que se puede conseguir mediante dispositivos transdérmicos, o, más generalmente, suministro biolístico del polipéptido, conjugado, ácido nucleico, y/o vector a, en, o a través de la piel del sujeto o en músculo expuesto del sujeto. Los dispositivos transdérmicos, que se describen en la que parten el presente documento, por ejemplo, se pueden aplicar a la piel de un hospedador durante un periodo de tiempo adecuado de modo que se produce la transferencia suficiente de un polinucleótido y/o vector al sujeto, suprimiendo de ese modo una respuesta inmunológica en el sujeto o inhibiendo el rechazo de un injerto, célula, o trasplantes de tejido. La administración muscular se facilita más generalmente por inyección de una solución líquida que comprende un polipéptido, polinucleótido, o vector de la invención. Las células en particular que se pueden dirigir incluyen células dendríticas, otras APC, linfocitos B, monocitos, linfocitos T (incluyendo células auxiliares T), y células asociadas con tales células del sistema inmunológico (por ejemplo, queratinocitos u otras células cutáneas asociadas con las células de Langerhans). La dirección de vectores y ácidos nucleicos de la invención se describe en cualquier parte en el presente documento. Tal administración dirigida se puede realizar con ácidos nucleicos o vectores que comprenden ácidos nucleicos unidos de forma operativa a promotores específicos de célula y/o tejido, cuyos ejemplos se conocen en la técnica.

El polinucleótido de la invención se puede administrar mediante cualquier sistema de administración adecuado, de modo que la expresión de un polipéptido recombinante se produce en el hospedador dando como resultado una supresión de una respuesta inmunológica, inhibición de la interacción entre células positivas para B7 y positivas para CD28, o inhibición del rechazo de trasplante de tejido, célula, órgano, o injerto. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una población de células bacterianas que comprende un ácido nucleico de la invención se puede administrar a un sujeto, dando como resultado la expresión de un polipéptido de CTLA-4 mutante recombinante de la invención, y supresión de una respuesta inmunológica en el sujeto. Las células bacterianas desarrolladas para administración de genes de mamífero se conocen en la técnica.

La administración de un polinucleótido o vector de la invención a un sujeto se facilita mediante la aplicación de electroporación a un número eficaz de células o una diana tisular eficaz, de modo que las células recogen el ácido nucleico y/o vector, y se expresan las mismas, dando como resultado la producción de un polipéptido recombinante de la invención en las mismas y la posterior supresión de una respuesta inmunológica en el sujeto.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN

La invención también proporciona métodos para preparar y purificar los polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores, y células de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un método para preparar un polipéptido recombinante de la invención mediante la introducción de un ácido nucleico de la invención en una población de células en un medio de cultivo, cultivando las células en el medio (durante un periodo de tiempo y en condiciones

adecuadas para el nivel de expresión genética deseado) para producir el polipéptido, y aislamiento del polipéptido de las células, medio de cultivo, o ambos. El ácido nucleico generalmente se une de forma operativa a una secuencia reguladora eficaz para expresar el polipéptido codificado por el ácido nucleico.

5 El polipéptido se puede aislar a partir de lisados celulares, sobrenadantes celulares, y/o medios de cultivo celular mediante diversas técnicas adecuadas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, diversas cromatografías de lisados celulares y/o sobrenadantes celulares. Por ejemplo, el polipéptido se puede aislar de lisados celulares y/o medio de cultivo celular concentran en primer lugar en medio de cultivo usando filtros de centrifugadora (Amicon), como alternativa, precipitando los polipéptidos con sulfato de amonio o polietilenglicol y a continuación volviendo
10 suspender los polipéptidos en PBS u otros tampones adecuados. A continuación el polipéptido se puede purificar usando cromatografía de exclusión por tamaño en columna Sephacril S-400 (Amersham Biosciences) como se describe en, por ejemplo, Hjorth, R. y J. Moreno-Lopez, J. *Virology* 5: 151-158 (1982), u otra cromatografía de afinidad, o mediante centrifugación a través de gradientes de sacarosa al 20-60 % como se describe en, por ejemplo, Kasovich *et al.*, *Virology* 188: 714-720 (1992). Las fracciones que contienen los polipéptidos deseados se pueden identificar mediante ELISA o SDS-PAGE seguido de tinción de plata de proteína e inmunotransferencia. Las fracciones deseadas se combinan y se concentran adicionalmente. La sacarosa en fracciones de centrifugación en gradiente se pueden eliminar usando filtración sobre gel en columna PD-10 (Amersham Biosciences). Las técnicas de purificación adicionales incluyen las que se describen en los Ejemplos que siguen a continuación y cromatografía de interacción hidrófoba (Diogo, M. M, *et al.*, *J. Gene Med.* 3: 577-584 (2001)), y cualquier otra técnica adecuada
20 conocida en la técnica.

También se puede usar cualquier técnica de purificación adecuada que se conozca en la técnica. Los métodos de purificación de polipéptido conocidos en la técnica incluyen los que se presentan en, por ejemplo, Sandana (1997) BIOSEPARATION OF PROTEINS, Academic Press, Inc., Bollag *et al.*, (1996) PROTEIN METHODS, 2ª Edición
25 Wiley-Liss, NY, Walker (1996) THE PROTEIN PROTOCOLS HANDBOOK Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) PROTEIN PURIFICATION APPLICATIONS: A PRACTICAL APPROACH IRL Press at Oxford, Oxford, England, Scopes (1993) PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE 3ª Edición Springer Verlag, NY, Janson y Ryden (1998) PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES, HIGH RESOLUTION METHODS AND APPLICATIONS, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) PROTEIN PROTOCOLS ON CD-ROM Humana Press, NJ. En la técnica se conocen células adecuadas para producción de polipéptido y se discuten en cualquier parte en el presente documento (por ejemplo, las células Vero, células 293, células BHK, CHO (por ejemplo, CHO-K1), y COS pueden ser adecuadas). Las células se pueden lisar mediante cualquier técnica adecuada incluyendo, por ejemplo, sonicación, microfluidización, cizallamiento físico, lisis en prensa francesa, o lisis basada en detergente.
30

35 En el presente documento se desvela un método para purificar un polipéptido de la divulgación, que comprende transformar una célula hospedadora adecuada con un ácido nucleico de la invención (por ejemplo un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido recombinante que comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 1) en la célula hospedadora (por ejemplo, una célula CHO o célula 293), lisar la célula mediante una técnica de lisis adecuada (por ejemplo, sonicación, lisis en detergente, u otra técnica apropiada), y someter el lisado a purificación por afinidad con una columna de cromatografía que comprende una resina que incluye al menos un nuevo anticuerpo de la invención (normalmente un anticuerpo monoclonal de la invención) o fragmento de unión a antígeno del mismo, de modo que el lisado está enriquecido en el polipéptido deseado (por ejemplo, un polipéptido que comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 1).
40

45 En el presente documento se desvela un método para purificar tales polipéptidos diana, método que se diferencia del método que se ha descrito anteriormente en que un ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) y una etiqueta adecuada (por ejemplo, un epítipo e/etiqueta de his), y purificación del polipéptido mediante técnicas de enriquecimiento mediante inmunofinidad, cromatografía en columna por afinidad a lenti-lectina, cromatografía por afinidad a metal inmovilizado (IMAC), o cromatografía por afinidad a quelación de metal (MCAC). Los métodos de purificación adicionales se desvelan en cualquier parte en el presente documento.
50

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un polipéptido de la invención, método que comprende introducir en una población de células de un vector de expresión recombinante que comprende un ácido
55 nucleico de la invención, cultivarlas células en un medio de cultivo en condiciones apropiadamente suficientes para la expresión del ácido nucleico desde el vector y producción de polipéptido codificado por el ácido nucleico, y aislar el polipéptido de las células, medio de cultivo, o ambos. Las células elegida se basan en el procesamiento deseado del polipéptidos se basan en el vector apropiado (por ejemplo, las células de *E. coli* son preferentes para plásmidos bacterianos, mientras que las células 293 son preferentes para plásmidos lanzadera de mamífero y/o adenovirus, en particular a rinovirus con deficiencia de E1).
60

En otro aspecto más, la divulgación incluye un método para producir un polipéptido, método que comprende: (a) introducir en una población de células un vector de expresión recombinante que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido; (b) administrar el vector de expresión en un mamífero; y (c) aislar el polipéptido del mamífero o de un producto secundario del mamífero.
65

Un polipéptido de la invención también se puede producir cultivando una célula o población de células de la invención (que, por ejemplo, se han transformado con un ácido nucleico de la invención que codifica tal polipéptido) en condiciones suficientes para expresión del polipéptido de recuperación del polipéptido expresado en o por la célula usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

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

15 También se incluye un método para producir un polipéptido de la invención que comprende la introducción de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido en una población de células en un medio, células que toleran la expresión del ácido nucleico, mantenimiento de las células en condiciones en las que se expresa el ácido nucleico, y a partir de ese momento aislamiento del polipéptido del medio.

20 En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para preparar una proteína de fusión. El método comprende: (1) cultivar una célula hospedadora transformada con un ácido nucleico en un medio de cultivo, En el que el ácido nucleico comprende: (i) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos 95 % con respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, polipéptido que se une a CD86 y/o CD80, y/o un dominio extracelular de cualquiera de CD86 o CD80, y (ii) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de Fc de Ig que comprende una región bisagra, dominio CH2, y dominio CH3, de modo que el ácido nucleico se expresa y se produce una proteína de fusión; y (2) recuperar la proteína de fusión. Se puede usar cualquier polipéptido de Fc de Ig, incluyendo por ejemplo, un Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG4, o polipéptido de Fc de Ig mutante. En algunos de tales métodos, el ácido nucleico comprende adicionalmente una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un péptido secretor o señal unido de forma operativa a la proteína de fusión, y la proteína de fusión se secreta de la célula hospedadora como un dímero de proteína de fusión unida por enlace disulfuro que comprende primera y segunda proteínas de fusión idénticas, y el dímero de proteína de fusión unida por enlace disulfuro se recupera del medio de cultivo. En algunos de tales métodos, el dímero de proteína de fusión unida por enlace disulfuro se forma mediante un enlace disulfuro covalente entre un resto de cisteína de la primera proteína de fusión y un resto de cisteína de la segunda proteína de fusión. En algunos de tales métodos, la proteína de fusión se recupera del medio de cultivo, célula hospedadora, o periplasma de célula hospedadora.

35 En el presente documento se desvela una molécula de ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica (i) un primer polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-73, en la que el primer polipéptido se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de cualquiera o ambos, y (ii) un segundo polipéptido que comprende una región bisagra, dominio CH2, y dominio CH3 de un polipéptido de IgG. El segundo polipéptido puede comprender cualquier polipéptido de Ig adecuado que se discute en cualquier parte en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, El que comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 184 o SEQ ID NO: 218.

45 En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para preparar una proteína de fusión soluble dímero. El método comprende el cultivo de una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión soluble dímero de la invención. Las proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen las que comprenden la secuencia de polipéptidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222. El vector incluye una secuencia de nucleótidos que facilite la expresión de la proteína de fusión (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal). La proteína de fusión se secreta desde la célula hospedadora como un dímero de proteína de fusión unida por enlace disulfuro que comprende dos proteínas de fusión idénticas, y el dímero de proteína de fusión unida por enlace disulfuro se recupera del medio de cultivo. En algunos de tales métodos, el dímero de proteína de fusión unida por enlace disulfuro se forma mediante un enlace disulfuro covalente entre un resto de cisteína en cada proteína de fusión. El dímero de proteína de fusión generalmente se recupera del medio de cultivo, célula hospedadora, o periplasma de célula hospedadora. El Ejemplo 12 proporciona un procedimiento a modo de ejemplo para crear una línea celular transfectar de forma estable que expresa una proteína de fusión de CTLA4-Ig mutante de la invención, produciendo la proteína de fusión de CTLA4-Ig mutante, y la purificación de la proteína de fusión mutante del cultivo.

60 Además de producción recombinante, los polipéptidos de la invención se pueden producir mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, (1969) SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, W.H. Freeman Co, San Francisco y Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154). La síntesis peptídica se puede realizar usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Por ejemplo, las subsecuencias se pueden sintetizar de forma química por separado y se pueden combinar usando métodos químicos para producir un

polipéptido de la invención o fragmentos del mismo. Como alternativa, los polipéptidos sintetizados se pueden pedir en cualquier número de compañías que están especializadas en la producción de polipéptidos. Lo más comúnmente, los polipéptidos de la invención se producen mediante expresión de ácidos nucleicos codificante si recuperación de polipéptidos, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

5 La invención incluye un método para producir un polipéptido de la invención que comprende la introducción de un ácido nucleico de la invención, un vector de la invención, o una combinación del mismo, en un animal, tal como un mamífero (incluyendo, por ejemplo, rata, primate no humano, murciélago, mono tí, cerdo, o hoyo), de modo que un polipéptido de la invención se expresa en el animal, y el polipéptido se aísla del animal o de un producto secundario del animal. El aislamiento del polipéptido del animal o productos secundarios del animal se puede realiza mediante cualquier técnica adecuada, dependiendo del animal y estrategia de recuperación deseada. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar de sueros de ratones, monos, o cerdos que expresan el polipéptido de la invención. La invención proporciona animales transgénicos (incluyendo los mamíferos que se han mencionado anteriormente) que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención. El animal transgénico puede tener el ácido nucleico integrado en su genoma hospedador (por ejemplo, mediante un vector de AAV, vector lentiviral, técnicas biolísticas realizadas con secuencias de integración-estimulación, etc.) o pueden tener el ácido nucleico epicromosómicamente mantenido (por ejemplo, en un vector plásmido no integrante o mediante inserción en un vector viral de una integración). Los vectores epicromosómicos se puede modificar por ingeniería para expresión genética más transitoria que los vectores de no integración. En este sentido los vectores basados en ARN ofrecen ventajas particulares.

COMPOSICIONES

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

35 Por ejemplo, en el presente documento se desvela una composición que comprende un excipiente, diluyente, o vehículo y al menos uno de tales polipéptidos de la divulgación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más polipéptidos), tal como un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-73) o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222), en la que el al menos un polipéptido está presente en la composición en una cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunológica, incluyendo, por ejemplo, una respuesta o respuestas inmunológica(s) implicada en rechazo a trasplante y/o autoinmunidad, inhibir rechazo de un tejido donado, célula, o trasplante de órgano, o inhibir la interacción de células positivas para 137 endógenas con linfocitos T positivos para CD28 en un sujeto al que se le administra la composición.

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

55 La composición (o composición farmacéutica) puede ser cualquier composición no tóxica que no interfiera con las propiedades inmunosupresoras del polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP, o célula de la invención incluida en la misma. La composición puede comprender uno o más excipientes, diluyentes, o vehículos, Y la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes, diluyentes, o vehículos farmacéuticamente aceptables. En la técnica se conoce una amplia diversidad de vehículos, diluyentes, y excipientes aceptables y se pueden incluir en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, se pueden usar diversos vehículos acuosos, por ejemplo, agua destilada o purificada, solución salina estéril, solución salina tamponada, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS), y similares que son ventajosos en formulaciones inyectables del polipéptido, las proteínas de fusión, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP, y/o célula de la invención. En la técnica se conocen numerosos excipientes, vehículos, y diluyentes adecuados para administración de las proteínas terapéuticas. Tales soluciones son preferentemente estériles y generalmente libres de material no deseado. Las composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones de la invención pueden comprender sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, si fuera necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas. Tales sustancias incluyen, por

- ejemplo, agentes de ajuste del pH, agentes de tamponamiento, y agentes de ajuste de la tonicidad, incluyendo, por ejemplo, acetato sódico, ascorbato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico, y similares. Las composiciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas, también pueden incluir uno o más componentes, tales como diluyentes, cargas, sales, tampones, tensioactivos, agentes emulsionantes, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico o agente emulsionantes, tal como Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80, pluronic F-68, y similares), estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteína), conservantes, fijadores de tejido, agentes solubilizantes, y/o otros materiales, adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.
- 10 Los ejemplos de componentes adecuados que se pueden usar en la composición farmacéutica se describen en, por ejemplo, Berge *et al.*, J. Pharm. Sci. 66 (1): 1-19 (1977), Wang y Hanson, J. Parenteral. Sci. Tech. 42: S4-S6 (1988), documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.165.779 y 6.225.289, y en cualquier parte en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir conservantes (tales como alcohol bencílico, azida sódica, m-cresol, etc.), antioxidantes, agentes quelantes de metal (tales como metionina, EDTA, etc.), y/o otros aditivos conocidos para las personas con experiencia en la materia. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas se describen en, por ejemplo, Urquhart *et al.*, Lancet 16: 367 (1980), Lieberman *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS - DISPERSE SYSTEMS (2ª ed., Vol. 3, 1998), Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS & DRUG DELIVERY SYSTEMS (7ª ed. 2000), Martindale, THE EXTRA PHARMACOPEIA (31ª edición), Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES (16ª-20ª ediciones), THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Goodman y Gilman, Eds. (9ª ed. - 1996), WILSON AND GISVOLDS TEXTBOOK OF ORGANIC MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, Delgado y Remers, Eds. (10ª ed. - 1998), y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.708.025 y 5.994.106. Los principios de formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables se describen en, por ejemplo, Platt, Clin. Lab Med. 7: 289-99 (1987), Aulton, PHARMACEUTICS: THE SCIENCE OF DOSAGE FORM DESIGN, Churchill Livingstone (New York) (1988), EXTEMPORANEOUS ORAL LIQUID DOSAGE PREPARATIONS, CSHP (1998), y "Drug Dosage," J. Kans. Med. Soc. 70 (1): 30 - 32 (1969). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales particularmente adecuados para administración de vectores se describen en, por ejemplo, Publ. de Sol. de Patente Internacional N.º WO 98/32859.
- 30 Las composiciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas, pueden incluir uno o más vehículos o excipientes acuosos (incluyendo, por ejemplo, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables) y uno o más componentes, tales como uno o más tampones, una o más sales, uno o más detergentes o agentes emulsionantes, y/o uno o más azúcares. El sistema de tampón generalmente es un adecuado para mantener el pH de la composición dentro del intervalo que conduzca a la estabilidad de la molécula de la invención presente en la composición (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante). Los tampones a modo de ejemplo para uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, tampón de ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-aminoetano sulfónico (HEPES), tampón de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato disódico-citrato trisódico, mezcla de citrato sódico-ácido cítrico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico), tampón de fosfato sódico (por ejemplo, mezcla de fosfato disódico-fosfato trisódico (Na₂HPO₄/Na₃PO₄), mezcla de fosfato sódico dibásico-fosfato sódico monobásico), tampón de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico), tampón de histidina, tampón Tris, tampón de Tris-maleato, tampón de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, mezcla de succinato monosódico-succinato disódico), tampón de maleato, tampón de imidazol, tampón de tartrato, tampón de fumarato, 45 tampón de gluconato, tampón de oxalato, tampón de lactato, tampón de acetato, y similares, o una combinación de Cualquiera de los mismos (por ejemplo, cóctel de tampones de citrato y acetato, etc.). La concentración de tampón en la composición puede ser cualquiera que sea apropiada para la molécula(s) de la invención (por ejemplo, un CTLA-4-Ig mutante) incluida en la solución de la composición, tal como, pero sin limitarse a, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, incluyendo, por ejemplo, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM (tal como, por ejemplo, tampón HEPES 20 mM, tampón citrato disódico-citrato trisódico 20 mM, tampón succinato 20 mM, etc.).
- 55 Las sales a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, sales solubles en agua, incluyendo una sal orgánica o sal inorgánica (por ejemplo, sal inorgánica soluble en agua), tal como cloruro sódico, cloruro de magnesio, bicarbonato sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, y cloruro de amonio, y similares, o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o fisiológicamente compatible. Las concentraciones de sal a modo de ejemplo en la solución de la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 125 mM, o 60 de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 125 mM, incluyendo, por ejemplo, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM (tal como, por ejemplo, NaCl 100 mM).
- Los azúcares o carbohidratos a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, sacarosa, maltosa, trehalosa, dextrosa, manosa, rafinosa, lactosa, maltodextrina, dextrano, sacarosa, etc., 65 en un intervalo de concentraciones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % en peso de azúcar, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % en peso de

azúcar, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 % en peso de azúcar, incluyendo por ejemplo, un 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 %, un 2 %, 2,5 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o un 10 % en peso de azúcar (por ejemplo, un 2 % en peso de sacarosa, un 2 % en peso de trehalosa, o un 2 % en peso de manosa) basándose en la composición. Los alcoholes de azúcar a modo de ejemplo para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, manitol, sorbitol, glicol, glicerol, arabitol, eritritol, xilitol, ribitol, lactitol, y similares en un intervalo de concentraciones que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % en peso de alcohol de azúcar, aproximadamente un 1-5 %, aproximadamente un 1-3 %, incluyendo por ejemplo, un 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 %, un 2 %, 2,5 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o un 10 % en peso de alcohol de azúcar basándose en la composición.

La osmolalidad de las composiciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas, generalmente similar a la osmolalidad de la sangre en suero, que varía de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 miliosmoles por kilogramo (mOSm/kg) de agua. La concentración de sal en la composición generalmente es inferior a 125 mM. Las concentraciones de sal y azúcar se puedan ajustar o variar de modo que la osmolalidad de la composición sea de aproximadamente 250-350 mOSm/kg de agua.

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

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

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

El pH de una composición de la invención, incluyendo una composición farmacéutica, puede variar de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,7, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 6,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 8,7, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 7,5, de aproximadamente pH 6,2 a aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 6,3 a aproximadamente pH 6,8, de aproximadamente pH 6,4 a aproximadamente pH 6,8, de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0, and de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,4. En un aspecto, las composiciones que comprenden una molécula de la invención, tal como, por ejemplo, a CTLA-4-IgG2 mutante, tienen un pH de pH 5,0, pH 5,1, pH 5,2, pH 5,3, pH 5,4, 5,5, pH 5,6, pH 5,7, pH 5,8, pH 5,9, pH 6,0, pH 6,1, pH 6,2, pH 6,3, pH 6,4, pH 6,5, pH 6,6, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4, pH 7,5, pH 7,6, pH 7,7, pH 7,8, pH 7,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9, pH 9,0, pH 9,1, pH 9,2, pH 9,3, pH 9,4, pH 9,5, pH 9,6, pH 9,7, pH 9,8, pH 9,9, o pH 10,0.

En un aspecto, la invención proporciona una composición de la invención que comprende un excipiente o vehículo (incluyendo, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable) y una cantidad eficaz de cualquier polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión, de CTLA-4 de la invención que se describe en cualquier parte y en el presente documento, y que adicionalmente comprende un tampón capaz de mantener el pH de la composición dentro del intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 10, agua, opcionalmente un detergente no iónico, opcionalmente una sal, y opcionalmente un alcohol de azúcar, monosacárido, disacárido, o polisacárido. Algunas de tales composiciones se encuentran a pH fisiológico. Algunas de tales composiciones tienen un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5, o de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,6, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,4, o pH 7,5. Algunas de tales composiciones comprenden un tampón en una concentración de

aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM, 25 mM, o 30 mM. Algunas de tales composiciones comprenden un tampón seleccionado entre el grupo que consiste en un tampón HEPES, tampón de citrato, tampón de succinato, tampón de acetato, tampón de citrato, tampón maleato, tampón fosfato, y tampón Tris. Algunas de tales composiciones comprenden un tampón que se selecciona entre el grupo que consiste en un tampón HEPES, tampón de citrato sódico, y tampón de tampón de succinato sódico. Para algunas de tales composiciones, el pH es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,7 y el tampón es succinato sódico o citrato sódico. Para algunas de tales composiciones, el pH es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,7 y el tampón es HEPES. Algunas de tales composiciones comprenden adicionalmente un alcohol de azúcar o sacárido, en las que el sacárido es un monosacárido, disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa), o polisacárido. Algunas de tales composiciones comprenden unas al presente en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 20 mM, 25 mM, o 30 mM. Algunas de tales composiciones comprenden un detergente no iónico, tal como, por ejemplo, un detergente no iónico seleccionado entre el grupo que consiste en el grupo que consiste en Tween®-80, Tween®-60, Tween®-40, Tween®-20, o pluronic F-68.

En algunas de tales composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que se han descrito en el párrafo mencionado anteriormente, el polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión está presente a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml (peso/volumen o p/v) a aproximadamente 200 mg/ml (p/v), de aproximadamente 25 mg/ml (p/v) a aproximadamente 100 mg/ml (p/v), de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, opcionalmente de aproximadamente en un intervalo de aproximadamente 50 mg/ml (p/v) a aproximadamente 100 mg/ml (p/v). Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, y la composición se administra a un mamífero (por ejemplo, ser humano). Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, y la composición se administra por vía parenteral. Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, y opcionalmente aproximadamente 0,5 mg/kg, y la composición se administra por vía subcutánea. Algunas de tales composiciones comprenden una cantidad eficaz del polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg (opcionalmente aproximadamente 10 mg/kg), y la composición se administra por vía intravenosa. Para algunas de tales composiciones, el polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. Para algunas de tales composiciones, el polipéptido, multímero, dímero, conjugado, proteína de fusión, o dímero de proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % con respecto a secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50. Algunas de tales composiciones son estériles y/o son isotónicas con respecto a la sangre. Algunas de tales composiciones son composiciones líquidas. Algunas de tales composiciones están en una forma líquida o una forma seca, en las que la forma seca se selecciona entre el grupo que consiste en una forma liofilizada, una forma secada al aire, y una forma secada por pulverización.

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

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (i) un conjugado que

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

En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica que comprende: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos de aproximadamente un 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % con respecto a una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo de las SEQ ID NOS: 1-73, tal como, por ejemplo, SEQ ID NOS: 36 y 50, en la que dicho polipéptido está presente en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/ml (p/v); (b) un tampón que tiene una capacidad de tamponamiento entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 8,0 a un intervalo de concentración es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM; (c) un diluyente farmacéuticamente aceptable para llevar la composición hasta un volumen designado ; (d) un azúcar a una concentración de un 0,5 % a un 10 % en peso; (e) una sal a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM; y (f) opcionalmente un detergente, en el que el pH está en un intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 8,0. En algunas de tales composiciones farmacéuticas, (a) el polipéptido comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 36 presente en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml; (b) el tampón es tampón HEPES presente a una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) el diluyente farmacéuticamente aceptable es agua; (d) el azúcar es sacarosa o trehalosa a una concentración de un 2 % en peso; (e) la sal es cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 100 mM; y (f) opcionalmente un detergente seleccionado entre el grupo que consiste en Tween®-80, Tween®-60, Tween®-40, Tween®-20, o pluronic F-68 a una concentración inferior o igual a aproximadamente 0,1 mg/ml, en el que el pH la composición es de aproximadamente pH 7,4. En otras de tales composiciones, (a) el polipéptido comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 50 presente en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml; (b) el tampón es tampón de citrato sódico presente a una concentración de aproximadamente 20 mM; (c) el diluyente farmacéuticamente aceptable es agua; (d) el azúcar es sacarosa o trehalosa a una concentración de un 2 % en peso; (e) la sal es cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 100 mM; y (f) opcionalmente un detergente seleccionado entre el grupo que consiste en Tween®-80, Tween®-60, Tween®-40, Tween®-20, o pluronic F-68 a una concentración inferior o igual a aproximadamente 0,1 mg/ml, en el que el pH es aproximadamente pH 6,5.

En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica que comprende: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y (b) tampón HEPES o citrato sódico (por ejemplo, mezcla de citrato disódico-citrato trisódico, mezcla de citrato sódico-ácido cítrico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, o mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico).

En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica que comprende: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; y (b) un excipiente

farmacéuticamente aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la composición tiene un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. Algunas de tales composiciones farmacéuticas tienen un pH de aproximadamente 7,4 o 7,5. Algunas de tales composiciones farmacéuticas comprenden tampón HEPES o citrato sódico.

5 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, una identidad de secuencia de al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50; y (b) tampón de citrato sódico (por ejemplo, mezcla de citrato disódico-citrato trisódico, mezcla de citrato sódico-ácido cítrico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, o mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico).

15 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la composición tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7. Algunas de tales composiciones farmacéuticas tienen un pH de aproximadamente 6,5. Algunas de tales composiciones farmacéuticas comprenden tampón de citrato sódico.

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

45 En el presente documento se desvelan recipientes para contener una composición de la invención que comprende una molécula de la invención (por ejemplo, molécula de CTLA-4 mutante, tal como un CTLA-4-Ig mutante) y un excipiente, diluyente, o vehículo. La composición puede ser una composición farmacéutica que comprende una molécula de la invención y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los recipientes incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, viales (por ejemplo, vial de vidrio, tal como un vial de vidrio de Tipo I), autoinyectores, inyectores de pluma (dosis fija o dosis variable), y jeringas cargadas previamente, u otros recipientes adecuados. Si se desea, un recipiente puede contener una o más dosis determinadas previamente de la molécula de la invención, eficaces para suprimir una respuesta inmunológica o tratar una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico como se describe en cualquier parte en el presente documento. Algunos de tales recipientes son útiles para administración de la composición contenida en los mismos a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno inmunológico (por ejemplo, autoinyectores, inyectores de pluma, jeringas cargadas previamente, etc.). Algunos de tales recipientes permiten la autoadministración de la composición por el sujeto (por ejemplo, inyectores de pluma, autoinyectores, jeringas cargadas previamente, etc.).

55 También se proporcionan composiciones o formulaciones estables de una molécula (por ejemplo, ECD de CTLA-4 mutante o CTLA-4-Ig mutante) de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticamente aceptables de una molécula de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la invención incluye composiciones o formulaciones secadas por congelación o liofilizadas. El término "secado por congelación" o "liofilizado" generalmente se refiere al estado de una sustancia que se ha sometido a un procedimiento desecado tal como secado por congelación o liofilización, en el que se ha eliminado al menos un 50 % de la humedad. Los procedimientos de liofilización previa y liofilización se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, LYOPHILIZATION OF BIOPHARMACEUTICALS, Vol. 2 of BIOTECHNOLOGY: PHARMACEUTICAL ASPECTS (Henry R. Costantino *et al.*, eds., 2004), documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.436.897, documento WO 06/104852), y podrían ser fácilmente comprendidos por el experto en la materia. Cualquier procedimiento de liofilización adecuado se puede usar o modificar cuando sea apropiado por alguien con experiencia en la materia

para preparar la composición liofilizada de la invención. Una composición secada por congelación, secada al aire, secada por pulverización, o liofilizada normalmente se prepara a partir de un líquido, tal como una solución, suspensión, emulsión, etc. El líquido a secar por congelación, secar al aire, secar por pulverización, o liofilizar generalmente incluye todos los componentes (excepto el líquido, por ejemplo, agua) que se van a encontrar en la composición líquida reconstituida final. De este modo, la composición secada por congelación, secada al aire, secada por pulverización, o liofilizada tendrá la composición líquida deseada (por ejemplo, composición farmacéutica) cuando se reconstituya. Las composiciones de la invención a modo de ejemplo, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden una molécula de la invención (por ejemplo, proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención, tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 197, 199, 211 o 213), que se describen en la presente solicitud, se pueden secar por congelación, secar al aire, secar por pulverización, o liofilizar para producir una composición secada por congelación, secada al aire, secada por pulverización, o liofilizada estable, respectivamente, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véanse por ejemplo, los procedimientos a modo de ejemplo que se describen en LYOPHILIZATION OF BIOPHARMACEUTICALS, mencionado anteriormente.

Por ejemplo, un recipiente (por ejemplo, vial, tal como un vial de vidrio) que contiene una composición líquida de una molécula de la divulgación (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante, proteína de fusión de la invención, tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 197, 199, 211 o 213) a liofilizar se puede liofilizar usando procedimientos convencionales conocidos por las personas con una experiencia habitual en la materia. Véase, por ejemplo, LYOPHILIZATION OF BIOPHARMACEUTICALS, mencionado anteriormente. La molécula liofilizada de la invención (por ejemplo, CTLA-4-Ig mutante de la invención) posteriormente se puede reconstituir con un líquido para generar una composición líquida reconstituida. Las formulaciones liofilizadas generalmente se reconstituyen mediante la adición de una solución acuosa para disolver la formulación liofilizada. Cualquier líquido o solución a cursos adecuados se puede usar para reconstituir una formulación liofilizada. Una formulación liofilizada a menudo se reconstituye usando agua estéril o destilada, pero para la reconstitución se pueden usar soluciones que comprenden vehículos, excipientes, diluyentes, tampones, y/u otros componentes, incluyendo los que se describen en el documento.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma liofilizada, en la que la composición comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig de la invención, que generalmente se expresa como una proteína de fusión dimérica, en tampón apropiado (por ejemplo, HEPES, citrato disódico-citrato trisódico, etc.) en agua a una concentración para mantener el pH deseado (por ejemplo, de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 7,5), sal (por ejemplo, NaCl 50 mM), azúcar (por ejemplo, un 4-6 % en peso de sacarosa basándose en la composición), y que opcionalmente incluye un detergente no iónico (Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80, o pluronic F-68) a una concentración de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,1 mg/ml (por ejemplo, Tween®-20, Tween®-60, Tween®-80, o pluronic F-68). Una forma liofilizada de una composición farmacéutica generalmente incluye una concentración de sal inferior y una concentración de azúcar superior en comparación con una composición líquida no liofilizada.

En un aspecto particular, la invención proporciona una composición liofilizada estable para administración terapéutica después de su reconstitución con agua estéril que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de la invención y opcionalmente uno o más de los siguientes componentes farmacéuticamente aceptables: (a) un azúcar o sacárido, tal como sacarosa, manosa, dextrosa, o trehalosa en una cantidad de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso; (b) un detergente o agente emulsionante, tal como Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, Tween®-80, o pluronic F-68; (c) un agente o sal isotónicos, tal como una sal inorgánica (por ejemplo, cloruro sódico) en una concentración de 0 mM a aproximadamente 50 mM (incluyendo, por ejemplo, las concentraciones que se han presentado anteriormente); (d) un tampón adecuado para mantener el pH de la composición dentro del intervalo que conducía la estabilidad de la molécula; (e) agente de dispersión (por ejemplo, en una cantidad suficiente para dispersión a largo plazo de la molécula de la invención, tal como, por ejemplo, de un 0,001 % en p/v a aproximadamente un 1,0 % en p/v) (por ejemplo, polisorbato, tal como Tween®-20, Tween®-40, Tween®-60, o Tween®-80, o pluronic F-68); y (f) un estabilizante (por ejemplo, sacárido, dextranos, grupo PEG de bajo peso molecular (PM), tal como PEG con un PM de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 8000 Da (por ejemplo, 200, 300, 400, 600, 900, 1000, 1450, 3350, 4500, o 8000 Da) o conservantes. En algunas de tales composiciones liofilizadas estables, la molécula es una proteína de fusión recombinante o aislada de la invención, tal como una proteína de fusión que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % con al menos una secuencia de polipéptidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222 (opcionalmente, por ejemplo, seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 197, 199, 211, y 213), en las que la proteína de fusión se une a CD80 y/o CD86 y/o un dominio extracelular de los mismos y/o suprime una respuesta inmunológica. Tales proteínas de fusión pueden estar en forma monomérica o dimérica.

Las cantidades a modo de ejemplo de cada uno de tales componentes en la composición liofilizada incluyen los que se han descrito anteriormente y en el presente documento. En un aspecto, el tampón se selecciona con el fin de mantener el pH de la composición dentro de un intervalo de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 8, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 7,5. Una composición liofilizada de la invención que comprende una

proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante Recombinante de la invención generalmente es estable de -80 °C a +40 °C y/o sustancialmente mantiene su actividad biológica durante al menos una semana, uno o más meses (por ejemplo, seis meses), un año, dos años, tres años, cuatro años, o más cuando se almacena a temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 30 °C). después de reconstitución con un líquido (por ejemplo, agua estéril para inyección (WFI)), la composición liofilizada es adecuada para su administración (por ejemplo, i.v., s.c., parenteral, i.m., i.d., i.p., etc.) a un sujeto (por ejemplo, ser humano).

En el presente documento se desvela un kit que comprende una composición liofilizada o secada por congelación que comprende una molécula liofilizada o secada por congelación de la divulgación (por ejemplo, proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 197, 199, 211 o 213) en un primer recipiente (por ejemplo, vial, tal como un vial de vidrio) e instrucciones para reconstituir la composición secada por congelación o liofilizada usando un líquido (por ejemplo, agua estéril, WFI, o tampón). Opcionalmente, el kit comprende adicionalmente un segundo recipiente (por ejemplo, vial, tal como un vial de vidrio) que contiene una cándida suficiente líquido (por ejemplo, agua estéril, WFI o tampón) para reconstitución de la composición liofilizada o secada por congelación en una composición líquida. En este caso, la reconstitución se consigue usando una jeringa para retirar un volumen deseado de agua desde el segundo recipiente y para introducir el agua en el primer recipiente. A continuación el primer recipiente se sacude suavemente para poner la molécula de la invención (por ejemplo, proteína de fusión) en solución. El kit puede incluir un dispositivo(s) para reconstituir la composición liofilizada o secada por congelación y/o administrar la composición líquida reconstituida. Los dispositivos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una jeringa de mezcla de los componentes, jeringa de cámara doble, y alto inyector de cámara doble. Un componente o cámara contiene la composición liofilizada y el segundo componente o cámara contiene el líquido para reconstitución. Con tales dispositivos, la reconstitución se realiza generalmente antes de su administración, y la composición reconstituida se administra normalmente por vía parenteral (por ejemplo, inyección s.c., i.v., i.m., i.d.).

La composición o composición farmacéutica de la invención puede comprender o puede estar en forma de un liposoma. Los lípidos adecuados para formulación liposómica incluyen, pero no se limitan a, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y similares. La preparación de tales formulaciones liposómicas se describe en, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 4.837.028 y 4.737.323.

La forma de las composiciones o composición farmacéutica se puede dictar, al menos en parte, mediante la vía de administración del polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP, o célula de interés. Dado que son posibles numerosas vías de administración, la forma de la composición farmacéutica y sus componentes puede variar. Por ejemplo, en administración transmucosal o transdérmicas, en la composición se pueden incluir agentes penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Tales agentes penetrantes generalmente se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. Por el contrario, la administración transmucosal se puede facilitar mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios.

Una forma de administración común para composiciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas, es mediante inyección. Las composiciones farmacéuticamente aceptables inyectables generalmente comprenden uno o más vehículos líquidos adecuados tales como agua, vaselina, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ), PBS, o aceites. Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden incluir adicionalmente en solución salina fisiológica, dextrosa (u otra solución de sacárido), alcoholes (por ejemplo, etanol), polioles (polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, etc.), o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol, moléculas de PEG, agentes de revestimiento que estimulan la fluidez apropiada, tales como lecitina, agentes isotónicos, tales como manitol o sorbitol, ésteres orgánicos tales como etioleato, y agentes retardantes de la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatinas. La composición inyectable se puede presentar en forma de una solución acuosa, estable, sin pirógenos. Una solución acuosa inyectable puede comprender un vehículo isotónico tal como cloruro sódico, solución para inyección de Ringer, dextrosa, solución para inyección de Ringer con lactato, o un vehículo de administración equivalente (por ejemplo, solución para inyección de cloruro sódico/dextrosa). Las formulaciones adecuadas para inyección mediante las vías intraarticular, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subdérmica, intraperitoneal, y subcutánea, incluyen soluciones para inyección isotónicas estériles, acuosas y no acuosas, soluciones para inyección estériles isotónicas, que pueden incluir solventes, co-solventes, antioxidantes, agentes de reducción, agentes quelantes, tampones, agentes bacteriostáticos, conservantes antimicrobianos, y solutos y hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido (por ejemplo, PBS y/o soluciones salinas, tales como NaCl 0,1 M), y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, agentes emulsionantes, estabilizantes, y conservantes.

La administración de un polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, pseudovirus, VLP o célula de la invención (o una composición que comprende cualquiera de tales componentes) se puede facilitar mediante un dispositivo de administración formado por cualquier material adecuado. Los ejemplos de materiales de matriz adecuados para producir dispositivos de administración no biodegradables incluyen hidroxapatita, biovidrio, aluminatos, u otros agentes cerámicos. En algunas aplicaciones, un agente secuestrante, tal como carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa, o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), se puede usar para unir el

componente en particular al dispositivo para administración localizada.

Un ácido nucleico o vector de la invención se puede formular con uno o más poloxámeros, copolímeros de bloque de polioxietileno/polioxipropileno, u otros tensioactivos o sustancias lipófilas similares al jabón para administrar el Ácido nucleico o vector a una población de células o tejido o piel de un sujeto. Véanse por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.149.922, 6.086.899, y 5.990.241.

Los ácidos nucleicos y vectores de la invención se pueden asociar con uno o más agentes potenciadores de la transfección. En algunas realizaciones, un ácido nucleico y/o vector de ácido nucleico de la invención generalmente se asocia con una o más sales promotoras de la estabilidad, vehículos (por ejemplo, PEG), y/o formulaciones que ayudan en la transfección (por ejemplo, sales de fosfato sódico, vehículos de dextrano, vehículos de óxido de hierro, o vehículos de administración biolística ("pistola genética"), tales como vehículos de perla de oro o polvo). Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.945.050. Los agentes potenciadores de la transfección adicionales incluyen partículas virales a las que se puede conjugar el ácido nucleico o vector de ácido nucleico, un agente de precipitación de fosfato cálcico, una proteasa, una lipasa, una solución de bipuivacaína, una saponina, un lípido (por ejemplo, un lípido cargado), un liposoma (por ejemplo, un liposoma catiónico), un péptido o complejo proteico que facilita la transfección (por ejemplo, una poli(etilenimina), polilisina, o complejo de proteína-ácido nucleico viral), un virosoma, o una célula o estructura similar a una célula modificada (por ejemplo, una célula de fusión).

Los ácidos nucleicos y vectores de la invención también se deben administrar mediante métodos de electroporación *in vivo* o *ex vivo*, incluyendo, por ejemplo, los que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.110.161 y 6.261.281, y en Wídera *et al.*, J. of Immunol. 164: 4635-4640 (2000).

La administración transdérmica de un componente de la invención (por ejemplo, polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP, y/o célula de la invención) se puede facilitar mediante un parche transdérmico que comprende tal componente en cualquier composición adecuada en cualquier forma adecuada. La invención proporciona tales dispositivos de parche transdérmico. Por ejemplo, un componente de ese tipo puede estar contenido en un depósito de líquido en un dispositivo de parche de depósito de fármaco, o, como alternativa, el componente se puede dispersar a través de un material adecuado para incorporación en un dispositivo de parche transdérmico monolítico sencillo. Generalmente, al parche comprende una cantidad inmunosupresor de al menos un componente de ese tipo - tal como una cantidad eficaz para suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto que está en contacto con el parche. En la técnica se conocen ejemplos de tales dispositivos de parche. El dispositivo de parche puede ser un dispositivo pasivo o un dispositivo capaz de administración iontoforética de al menos uno de tales componentes a la piel o tejido del sujeto.

Una composición, en particular una composición farmacéutica, puede comprender cualquier dosis adecuada de al menos uno de tales componentes de la invención (por ejemplo, polipéptido, conjugado, ácido nucleico, vector, virus, VLP, y/o célula) suficiente para conseguir la respuesta inmunosupresor la deseada en un sujeto después de su administración. La dosificación apropiada se puede determinar mediante cualquier técnica adecuada y en la técnica se conocen consideraciones para determinar lo que es apropiado. En un régimen de ensayo de dosificación sencilla, se administran dosis bajas de la composición a un sujeto o sistema de ensayo (por ejemplo, un modelo animal, sistema sin célula, o sistema de ensayo de célula completa). La dosificación normalmente se determina mediante la eficacia del componente a administrar en particular, el estado del sujeto, el peso corporal del sujeto, y/o zona diana del sujeto a tratar. El tamaño de la dosis también se determina mediante la existencia, naturaleza, y alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de cualquiera de tales componentes en particular en un sujeto en particular. Los principios relacionados con la dosificación de los agentes terapéuticos y profilácticos se proporcionan en, por ejemplo, Platt, Clin. Lab Med. 7: 289-99 (1987), "Drug Dosage", J. Kans. Med. Soc. 70 (1): 30-32 (1969), y otras referencias que se describen en el presente documento (por ejemplo, Remington's, mencionado anteriormente).

A modo de ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención para una dosificación inicial para tratar una enfermedad autoinmune puede comprender de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del sujeto a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso del sujeto, o, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso del sujeto a al menos de aproximadamente 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, o 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Tal dosificación se realiza mediante cualquier protocolo adecuado, por ejemplo, tal como administradas diariamente, semanalmente, o bisemanalmente, o cualquier combinación de las mismas (por ejemplo, a aproximadamente 0, 1, 2, 4, 5, 6, y 7 días, semanalmente a partir de ese momento, o a aproximadamente 0, 1, 2, 4, y 6 semanas), seguido de intervalos de 1, 2, 3 meses, y mediante cualquier método de administración adecuado, tal como, por ejemplo, mediante electroporación o una inyección subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), o intraperitoneal (i.p.), subdérmica, transdérmica, parenteral, o intradérmica (i.d.). En algunos casos, un polipéptido de la invención generalmente se administra como un polipéptido soluble, tal como, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la invención unido con enlace covalente a un polipéptido

de Fc de Ig. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención en un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable se puede administrar Mediante cualquier vía apropiada (por ejemplo, por vía intradérmica, por vía intravenosa, o por vía subcutánea) en una cantidad eficaz dependiendo de la enfermedad autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide) o afección a tratar (por ejemplo, a inhibir el rechazo de un trasplante de tejido, célula, injerto, urbano sólido de un donante por el sujeto receptor).

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

También se proporciona una composición de vector viral, que comprende un vehículo por excipiente y un vector viral de la invención. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y un vector viral. La cantidad o dosificación de partículas de vector viral o ácido nucleico que codifica particular de vector viral depende de: (1) el tipo de partícula de vector con respecto al origen del vector, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, si el vector es un vector alfaviral, vector viral del Bosque de Semliki, vector adenoviral, vector viral adeno-asociado (AAV), vector flaviviral, vector viral del papiloma, y/o vector viral del herpes simplex (HSV), (2) si el vector es un vector que expresa transgén o vector de presentación de péptido recombinante, (3) el hospedador, y (4) otras consideraciones que se han discutido anteriormente. Generalmente, con respecto a vectores de transferencia genética, la composición farmacéuticamente aceptable comprende al menos aproximadamente 1×10^2 partículas de vector viral en un volumen de aproximadamente 1 ml (por ejemplo, al menos de aproximadamente 1×10^2 a 1×10^8 partículas en aproximadamente 1 ml). También pueden ser adecuadas dosificaciones más elevadas (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} partículas/ml).

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

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no se deberían interpretar como limitantes de su alcance en modo alguno.

Ejemplo 1

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

Creación de Vector de Plásmido de ADN que Codifica Proteína de Fusión de LEA29Y-Ig.

Este ejemplo describe la preparación de un vector plásmido de ADN que codifica la proteína de fusión de LEA29Y-Ig. LEA29Y-Ig comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante conocido específico, denominado "LEA29Y" (o "LEA" o "L104EA29Y" o "A29YL104E"), que se une con enlace covalente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG1 humano mutante específico. El polipéptido LEA29Y es un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la secuencia de polipéptidos del dominio extracelular de CTLA-4 humano en dos mutaciones - una sustitución A29Y y una sustitución L104E - en la que las posiciones 29 y 104 se numeran por referencia a la secuencia de polipéptidos del polipéptido de ECD de CTLA-4 humano, con el primer resto de aminoácido de CTLA-4 humano designado como posición 1 del resto de aminoácido. Véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874. El vector plásmido pCDNA3.1-LEA, que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica LEA29Y-Ig, se creó para producir esta proteína de fusión.

El ADN que codifican LEA29Y-Ig se crea mediante ensamblaje de PCR usando oligonucleótidos de superposición diseñados basándose en homología de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica LEA29Y-Ig que se muestra en la SEQ ID NO: 167. Los oligonucleótidos se diseñan, preparan, y ensamblan usando procedimientos convencionales bien conocidos por las personas con una experiencia habitual en la materia y

pueden incluir codones de parada e inicio y sitios de restricción si fuera necesario. En la técnica también se conocen bien los procedimientos de amplificación de PCR usados. Véase, por ejemplo, Berger, Ausubel, y Sambrook, todos mencionados anteriormente.

5 Los oligonucleótidos se ensamblan en una reacción de PCR de 100 µl con oligonucleótidos 1 µM, 1x de tampón Taq (Qiagen; N.º 201225) y dNTPs 200 µM para 30 ciclos de amplificación (94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 60 s). El ADN amplificado se purifica en Columnas de Centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen, N.º de Cat. 28104) y se digiere con enzimas de restricción *NheI* y *SacII*. Los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificó usando el Kit de Extracción en Gel Qiaquick (Qiagen, N.º 28704) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y se ligan en pCDNA 3.1(+) plásmido digerido del mismo modo (Invitrogen, N.º de Cat. V790-20). Las ligaduras se transforman en células TOP10 de *E. coli* (Qiagen, N.º de Cat. C4040-10) de acuerdo con las recomendaciones del fabricantes. Las células resultantes se incuban durante una noche a 37 °C en medio LB que contiene 50 µg/ml de carbenicilina con agitación a 250 rpm y a continuación se usó para preparar una solución de reserva maxiprep (Qiagen; N.º 12362) de ADN de plásmido (denominado en lo sucesivo en el presente documento vector plásmido pCDNA3.1-LEA).

El vector plásmido pCDNA3.1-LEA es idéntico al vector de CTLA-4-IgG2 mutante de pCDNA de vector plásmido que se muestra en la Figura 1 excepto porque la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de CTLA-4-IgG2 mutante se ha sustituido por una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión de LEA29Y-Ig. Un ácido nucleico que codifica el péptido señal CTLA-4 humano se incluyó como la secuencia de nucleótidos que codifica péptido señal.

Una secuencia de ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión de LEA29Y-Ig predicha se muestra en la SEQ ID NO: 167. La SEQ ID NO: 167 incluye la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal (por ejemplo, restos de aminoácido 1-37 de la SEQ ID NO: 165). Las secuencias de polipéptidos de la proteína de fusión de LEA29Y-Ig predicha y de LEA29Y-Ig madura (sin el péptido señal) se muestran en las SEQ ID NOS: 165 y 166, respectivamente. Como se indica en la Figura 2C, la secuencia de aminoácidos predicha de LEA29Y-Ig incluye los siguientes segmentos: el péptido señal predicho (restos de aminoácido 1-37), el ECD del polipéptido LEA29Y (restos de aminoácido 38-161), conector (resto de aminoácido 162), y un dominio de Fc mutante (modificado) de un polipéptido de IgG1 humana (restos de aminoácido 163-394). Los restos de aminoácido en las uniones entre estos diversos segmentos también se muestran en la Figura 2C. De forma específica, se muestran los últimos cuatro restos de aminoácido del péptido señal, los primeros cinco y los últimos cinco restos de aminoácido del ECD de LEA29Y, el resto de aminoácidos del conector individual (Q), y los primeros cinco y los últimos cinco restos de aminoácido del polipéptido de Fc de IgG1 mutante.

El péptido señal por lo general se escinde durante el procesamiento y de ese modo la proteína de fusión secretada (es decir, proteína de fusión madura) de LEA29Y-Ig normalmente no contiene la secuencia del péptido señal. La forma madura/secretada de LEA29Y-Ig, que tiene un total de 357 aminoácidos, comprende los restos de aminoácido 38-394 (la secuencia de longitud completa sin el péptido señal) de la secuencia predicha que se muestra en la SEQ ID NO: 165, y comienza con la secuencia de aminoácidos: metionina-histidina-valina-alanina. SEQ ID NO: 165 incluye el péptido señal (por ejemplo, restos 1-37) en su extremo N-terminal; el péptido señal generalmente se escinde para formar la proteína madura que se muestra en la SEQ ID NO: 166. Si se desea, los aminoácidos de la forma madura se pueden numerar comenzando con la Met de la secuencia Met-His-Val-Ala, designando a Met como el primer resto (por ejemplo, el ECD comprende los restos de aminoácido numerados 1-124), como en la proteína de fusión de LEA29Y-Ig madura que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 166. En un aspecto, la secuencia de la SEQ ID NO: 165 o 166 no incluye el resto de lisina C-terminal; este resto se puede escindir durante el procesamiento o antes de la secreción.

La secuencia de proteínas de la proteína de fusión de LEA29Y-Ig se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874. De forma específica, la SEQ ID NO: 4 del documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874 muestra una secuencia de proteínas que codifica la forma no madura de LEA29Y-Ig monomérica. En el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874, la proteína de fusión de LEA29Y-Ig se denomina "L104EA29YIg". La proteína de fusión de LEA29Y-Ig madura que comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 166 que se presenta en el presente documento se diferencia de la secuencia de la proteína de fusión que se muestra en la SEQ ID NO: 4 en documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874 porque la SEQ ID NO: 4 del documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874 incluye un péptido señal (es decir, restos 1-26 de la SEQ ID NO: 4). Este péptido señal por lo general se escinde durante el procesamiento y de ese modo la forma madura (secretada) de la proteína de fusión de LEA29Y-Ig normalmente no incluye la secuencia del péptido señal. La SEQ ID NO: 3 Del documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874 presenta una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión de L104EA29YIg (es decir, LEA29Y-Ig).

LEA29Y-Ig generalmente existe en solución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión de LEA29Y-Ig madura monomérica comprende un polipéptido de ECD de LEA29Y (SEQ ID NO: 168) fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un Fc de IgG1 mutante (SEQ ID NO: 186). Los dos monómeros de LEA29Y-Ig se unen con enlace covalente en conjunto mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero, formando de ese modo el

dímero de proteína de fusión LEA29Y-Ig. El dímero LEA29Y-Ig es la forma de la molécula de proteína de fusión usada en los ensayos que se describen en estos Ejemplos, a menos que de forma explícita se indique de otro modo.

Creación de Línea Celular CHO-K1 Estable que Expresa Proteína de Fusión de LEA29Y-Ig.

5 Una línea celular estable se creó para generar cantidades de múltiples miligramos de la proteína de fusión de LEA29Y-Ig que se ha discutido anteriormente.

Transfección de Células CHO-K1.

10 Las células CHO-K1 se sembraron a una densidad de 1×10^6 en matraces T-175 (BD Falcon, N.º 353112) que contenían 40 ml de Medio de Crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, N.º 10565-018) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Hyclone, N.º SV30014,03) y 1x de PS (Penicilina + Estreptomina) (Invitrogen, N.º 15140-122)). Las células se incubaron durante 24 horas (h) a 37 °C y a continuación se transfectaron con 10 µg de ADN de plásmido Maxiprep (por ejemplo, vector plásmido que codifica LEA29Y-Ig como se ha descrito anteriormente) mezclado con 60 µl de Eugene 6 (Roche, N.º 11814443001) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células se incubaron durante 2 días (d) a 37 °C en Medio de Crecimiento y a continuación durante 10 d en Medio de Selección (Medio de Crecimiento que contenía 300 µg/ml de Geneticina (Invitrogen, N.º 10131-027), cambiando el medio cada 2 d. El medio se retiró y las células se dispersaron mediante la adición de 3 ml de tripsina al 0,05 % (Invitrogen, N.º de Cat. 25300-054) e incubación a 37 °C durante 3 min. Las células dispersadas se diluyeron en 10 ml de Medio de Crecimiento y se cosecharon mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (TA) en un rotor GH-3.8 (Beckman Coulter, N.º 360581). Después de desechar el sobrenadante, las células se suspendieron en 1 ml de medio de crecimiento, se filtraron a través de membranas de 40 µm (BD Falcon, N.º 352340), y se ajustó a una densidad de 1×10^6 células/ml.

Separación de Clones Únicos.

25 Usando un separador celular (Dako, MoFlo), las células vivas se dispersaron individualmente en placas de cultivo de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, N.º CLS-3596) que contenían 200 µl/pocillo de Medio de Crecimiento que contenía Medio Acondicionado al 25 % (Medio de Crecimiento cosechado previamente a partir de cultivos de células sin transfectar (o sin tratamiento previo)). Después de incubación a 37 °C durante 10-14 d, las células se dispersaron mediante hidrólisis con tripsina y se transfectaron a nuevas placas de cultivo que contenían 200 µl/pocillo de Medio de Crecimiento. Las células se cultivaron a 37 °C en Medio de Crecimiento hasta que la densidad celular alcanzó una confluencia de un 70 % (aproximadamente 14 d, con medio cambiado cada 7 d).

Identificación de Clones Deseados.

30 Los clones que expresan altos niveles de proteína de fusión de LEA29Y-Ig recombinante se identificaron mediante análisis de transferencia de aplicación puntual y de Western. Para análisis de transferencia de aplicación puntual, se cosecharon 100 µl de medio de cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman, N.º 10439388) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las membranas se lavaron dos veces con 200 ml de PBST (PBST es solución salina tamponada con fosfato (PBS) + Tween®-20 al 0,05 %) durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y a continuación se incubaron con PBST que contenía leche seca sin grasa al 5 % (EMD, N.º 1,15363,0500) durante 1 hora (h) a TA. Las membranas se lavaron como se ha descrito anteriormente y se incubaron durante 1 h a TA en 20 ml de PBST que contenían anticuerpo de Ig anti-humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Vector Labs, N.º BA-3000) diluido a 1:4000. Las membranas se lavaron como se ha descrito anteriormente y se incubaron durante 1 h a TA con PBST que contenía reactivo de estreptavidina-HRP (BD Biosciences, N.º 554066) diluido a 1:2000. Las membranas se lavaron como se ha descrito anteriormente y las señales se detectaron usando Reactivo de Detección de Transferencia de Western de ECL (Amersham, N.º de Cat. RPN2132) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Los clones positivos identificados mediante intensidad de señal elevada (es decir, expresando niveles elevados de proteína de fusión) se dispersaron mediante hidrólisis con tripsina y se transfirieron a placas de cultivo de 6 pocillos (BD Falcon, N.º de Cat. 353046) que contenían 2 ml/pocillo de Medio de Crecimiento. Después de incubación a 37 °C durante 3-4 d, las células se dispersaron mediante hidrólisis con tripsina y se transfirieron a matraces T-75 (BD Falcon, N.º de Cat. 353136) que contenían 20 ml de Medio de Crecimiento. Después de incubación a 37 °C durante 2 d, se cosecharon 100 µl de medio y se analizaron para niveles de expresión de proteína mediante análisis de Western. Para análisis de Western, cantidades iguales (15 µl) de medio de cada cultivo celular se desarrollaron a través de geles de Bis-Tris NuPAGE al 4-12 % (Invitrogen, N.º NP0322BOX) en tampón de desarrollo MES (MES es ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, pH 7,3) (Invitrogen, N.º NP0002) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las proteínas se transfirieron desde geles a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, N.º de Cat. LC2001) mediante electro-transferencia de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las membranas se procesaron como se ha descrito anteriormente para transferencia de aplicación puntual y los clones positivos (que expresan la proteína de fusión de interés) se identificaron mediante intensidad de señal y peso molecular aparente. Los clones positivos se dispersaron mediante hidrólisis con tripsina como se ha descrito anteriormente y se propagaron en matraces T-175 que contenían 40 ml de Medio de Crecimiento.

Producción y Purificación de Proteína de Fusión de LEA29Y-Ig.*Propagación de Cultivos en Frasco Rodante.*

5 Una línea de células CHO-K1 estables que se había transfectado como se ha descrito anteriormente con ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de interés se cultivó hasta confluencia en matraces T-175 que contenían 40 ml de Medio de Crecimiento (medio DMEM/F-12 (Invitrogen, N.º 10565-018) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone N.º SV30014,03) y 1x de PS (Invitrogen, N.º 15140-122)). Las células se cosecharon mediante incubación en 3 ml de tripsina al 0,05 % (Invitrogen, N.º de Cat. 25300-054) durante 3 min a 37 °C, se diluyeron en 12 ml de Medio de Crecimiento y a continuación se transfirieron a frascos rodantes (Corning, N.º de Cat. 431191) que contenían 250 ml de Medio de Crecimiento. Después de incubación de los cultivos en frasco rodante a 37 °C en una incubadora para giro humidificada durante 2 d, el medio se retiró y se reemplazó con 250 ml de Medio de Crecimiento recién preparado. Los cultivos se incubaron durante 2 d a 37 °C y el medio se reemplazó con 250 ml de Medio UltraCHO (medio UltraCHO (BioWhittaker, N.º de Cat. 12-724) suplementado con EX-CYTE a 1/1000 (Serologicals Proteins, N.º de Cat. 81129N) y 1x de PS). Después de incubación durante 2 d a 37 °C, el medio se reemplazó con 250 ml de Medio UltraCHO recién preparado. Los cultivos se incubaron durante 2 d a 37 °C y el medio se reemplazó con 250 ml de Medio de Producción (medio DMEM/F-12 suplementado con 1/100x de ITSA (Life Technologies N.º 51300-044), 1/1000x EX-CYTE y 1x de PS). Durante la producción, el medio se cosechó y se reemplazó con Medio de Producción recién preparado cada día.

Purificación de Proteína.

25 El medio de producción a partir de cultivos en frasco rodantes se aclaró mediante centrifugación a 2500 x g durante 30 min a TA seguido de filtración a través de membranas de 0,2 µm (VWR, N.º de Cat. 73520-986). Los medios se concentraron 10 veces mediante filtración de flujo tangencial usando membranas de MWCO de 10 kDa (Millipore, N.º de Cat. P3C010C00) y a continuación se usaron para cromatografía por afinidad de Proteína-A usando un sistema de HPLC BioCad vision. La proteína de fusión a Ig se unió a Proteína-A Poros 20 (Applied Biosystems, N.º de Cat. 1-5029-01) en tampón PBS, se lavó con el mismo tampón, eluyendo con tampón de ácido cítrico 80 mM (pH 4,0) que contenía cloruro sódico 160 mM y a continuación se neutralizó mediante la adición de base Tris 2 M. Por último la solución de proteína se dializó contra 6 litros (1) de PBS usando membranas de MWCO de 10 kDa (Pierce, N.º de Cat. PI66810).

Ejemplo 2

35 Este ejemplo describe métodos a modo de ejemplo usados para crear e identificar sistemáticamente bibliotecas de mutantes de CTLA-4 para actividades de unión a CD80 humano y/o CD86 humano alterados mediante presentación de fagos.

Proteína de Fusión de CD80-Ig Humano.

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

50 Una secuencia de ácidos nucleicos representativa que codifica la proteína de fusión de CD80- IgG1 humano de WT predicha, que comprende el péptido señal de CD80 humano, ECD de CD80 humano, y Fc de IgG1 humano, se muestra en la SEQ ID NO: 172. Las secuencias de polipéptidos predicha y madura de la proteína de fusión de hCD80-IgG1 se muestran en la SEQ ID NO: 170 y SEQ ID NO: 171, respectivamente. La proteína de fusión predicha que se muestra en la SEQ ID NO: 170 comprende ECD de CD80 humano de WT fusionado con enlace covalente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG1 humano e incluye un péptido señal en su extremo N-terminal. El péptido señal generalmente se escinde para formar la proteína de fusión de CD80-Ig madura que se muestra en la SEQ ID NO: 171.

60 En el presente documento generalmente la abreviatura de CD80-IgG1 humano es hCD80-Ig. Como se muestra en la Figura 2A, la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión de hCD80-Ig (también denominada "CD80-IgG1") incluye los siguientes segmentos: el péptido señal predicho (restos de aminoácido 1-34), ECD de CD80 humano (restos de aminoácido 35-242), conector (restos de aminoácido 243-245), y polipéptido de Fc de IgG1 humano (restos de aminoácido 246-476). Los restos de aminoácido en las uniones entre estos diversos segmentos se muestran en la Figura 2A. De forma específica, se muestran los últimos cuatro restos de aminoácido del péptido señal, los primeros cinco y los últimos cinco restos de aminoácido del ECD de CD80 humano, los restos de aminoácido del conector (GVT), y los primeros cinco y los últimos cinco restos de aminoácido del polipéptido de Fc de IgG1 humano. En la proteína de fusión de CD80-Ig proteína de fusión, están presentes tres restos GVT como un artefacto de clonación (o conector) entre el extremo C-terminal del ECD de CD80 (que termina con los restos de

aminoácido FPDN) y el extremo N-terminal del polipéptido de Fc de IgG1 (que comienza con los restos de aminoácido PKSC). Este artefacto de clonación o conector GVT se muestra en las secuencias de polipéptidos de CD80-Ig predicha inmadura que se muestran en la SEQ ID NO: 170 y 171, respectivamente.

5 El péptido señal por lo general se escinde durante el procesamiento y de ese modo la proteína de fusión secretada (es decir, proteína de fusión madura) de hCD80-Ig normalmente no contiene el péptido señal. La forma madura/secretada de hCD80-Ig, que tiene un total de 442 aminoácidos, comprende los restos de aminoácido 35-476 (la secuencia de longitud completa sin el péptido señal) de la SEQ ID NO: 170, y comienza con la secuencia de restos de aminoácido: valina-isoleucina-histidina-valina. Si se desea, los aminoácidos de la forma madura se pueden
10 numerar comenzando con la valina (Val) de la secuencia Val-Ile-His-Val, designando a Val como el primer resto (por ejemplo, el ECD comprende los restos de aminoácido numerados de 1-208), al igual que en la forma madura de hCD80-Ig que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 171.

15 La proteína de fusión de hCD80-Ig generalmente existe en solución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión de hCD80-Ig maduras monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión de hCD80-Ig madura monomérica (SEQ ID NO: 171) comprende un ECD de CD80 humano (SEQ ID NO: 174) fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO: 185). Los dos monómeros de hCD80-Ig se unen con enlace covalente en conjunto mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero, formando de ese modo el dímero de proteína de fusión de hCD80-Ig. El
20 dímero de proteína de fusión de hCD80-Ig es la forma de la proteína de fusión usada en los ensayos que se describen en estos Ejemplos, a menos que de forma explícita se indique de otro modo.

25 Un ácido nucleico representativo que codifica en polipéptido CD80 humano de longitud completa predicho se muestra en la SEQ ID NO: 196. La secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID NO: 196 codifica el péptido señal, ECD, dominio transmembrana, y dominio citoplasmático de CD80 humano, e incluye el codón de parada TAA en el extremo C-terminal.

Proteína de Fusión CD86-Ig Humana.

30 Una secuencia de ácidos nucleicos representativa que codifica la secuencia de aminoácidos predicha de proteína de fusión de CD86-humana IgG1 humano (generalmente abreviado en el presente documento como "hCD86-Ig") se muestra en la SEQ ID NO: 179. Esta secuencia de ácidos nucleicos incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de la proteína de fusión de CD86 humana-IgG1 humano. La secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión de hCD86-Ig se muestra en la SEQ ID NO: 177, y un nucleico a modo de ejemplo
35 que codifica la proteína de fusión de hCD86-Ig predicha se muestra en la SEQ ID NO: 179.

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

45 El péptido señal de CD86 generalmente se escinde del polipéptido de hCD86-Ig predicho durante el procesamiento y de ese modo la proteína de fusión de CD86-Ig humana secretada (es decir, proteína de fusión madura) normalmente no incluye el péptido señal. La forma madura/secretada de hCD86-Ig, que tiene un total de 454 aminoácidos, comprende los restos de aminoácido 24-477 (la secuencia de longitud completa sin el péptido señal) de la SEQ ID
50 NO: 177, y comienza con la siguiente secuencia de restos de aminoácido: alanina-prolina-leucina. Si se desea, los aminoácidos del proteína de fusión madura se pueden numerar comenzando con el resto de alanina (Ala) de la secuencia Ala-Pro-Leu, designando a Ala como el primer resto (por ejemplo, el ECD comprende los restos de aminoácido numerados de 1-218), al igual que en la forma madura de hCD86-Ig que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 178. La proteína de fusión madura (SEQ ID NO: 178) comprende una
55 proteína de ECD de hCD86 de WT fusionada con enlace covalente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de hIgG1.

60 La proteína de fusión de hCD86-Ig generalmente existe en solución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión de hCD86-Ig maduras monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión de CD86-Ig madura monomérica (SEQ ID NO: 178) comprende un ECD de CD86 humano (SEQ ID NO: 180) fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un Fc de IgG1 humano (SEQ ID NO: 185). Los dos monómeros de hCD86-Ig se unen con enlace covalente en conjunto mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero, formando de ese modo el dímero de proteína de fusión de hCD86-Ig. El
65 dímero de proteína de fusión de hCD86-Ig es la forma de la proteína de fusión usada en los ensayos que se describen en estos Ejemplos, a menos que de forma explícita se indique de otro modo.

En la proteína de fusión de CD86-Ig (por ejemplo, formas predicha inmadura), están presentes tres restos GVT como un artefacto de clonación (o conector) entre el extremo C-terminal del ECD de CD86 y el extremo N-terminal del polipéptido de Fc de IgG1. En otro aspecto, la proteína de ECD de CD86 humano de WT comprende una secuencia de polipéptidos que comprende los restos de aminoácido 1-218 de la SEQ ID NO: 180 (es decir, excluyendo los últimos dos restos de aminoácido C-terminal en el (PP)).

Proteína de Fusión Orenicia®.

Como un control adicional y para fines comparativos, se adquirió una proteína de fusión disponible en el mercado conocida como la proteína de fusión Orenicia® (Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ). La proteína de fusión Orenicia® está formada por el dominio de extracelular de CTLA-4 humano de WT fusionado con enlace covalente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG1 mutante específico. La proteína Orenicia® es una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas unidas con enlace covalente en conjunto mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína presentes en cada proteína de fusión monomérica. La secuencia de polipéptidos de cada monómero de proteína de fusión madura Orenicia® se muestra en la SEQ ID NO: 164 y está formada por los siguientes segmentos: un dominio extracelular de CTLA-4 humano de WT (restos de aminoácido 1-124), secuencia del conector (resto de aminoácido 125), y un polipéptido de Fc de IgG1 mutante (restos de aminoácido 126-357). Cada monómero de proteína de fusión Orenicia® tiene una estructura similar a la del monómero de la proteína de fusión de LEA29Y-Ig que se muestra de forma esquemática en la Figura 2C, excepto porque el ECD de LEA29Y se reemplaza con el ECD de CTLA-4 humano de WT, y no hay presencia de péptido señal en cualquier monómero de proteína de fusión Orenicia®, porque cada monómero es una proteína de fusión secretada o madura. La secuencia de polipéptidos de la forma no madura de un monómero Orenicia® (que incluye un péptido señal) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la forma no madura de un monómero de proteína de fusión Orenicia® se muestran en la SEQ ID NO: 8 y en la SEQ ID NO: 7, respectivamente, del documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874. Los métodos para preparar y usar la proteína de fusión Orenicia® también se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.094.874.

Creación de Secuencias de ADN que Codifican Polipéptidos de CTLA-4 Mutante.

Para generar bibliotecas de polinucleótidos recombinantes y de origen no natural que codifican polipéptidos de dominio extracelular de CTLA-4 dominio mutante recombinante se usaron métodos de evolución dirigida. Las secuencias de proteínas y nucleótidos de un número de homólogos de CTLA-4 de mamíferos de origen natural se conocen. Véase, por ejemplo, National Center for Biotechnology Information (NCBI). La diversidad de secuencia identificada en diversos homólogos de dominio extracelular de CTLA-4 de mamífero de origen natural se usó en métodos de evolución dirigida para generar bibliotecas de polinucleótidos recombinantes que codifican polipéptidos de dominio de ECD de CTLA-4 mutante. Los procedimientos de evolución dirigida incluyen, por ejemplo, procedimientos de recombinación *in vitro* y mutagénesis como se describe esencialmente en Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751 (1994); Chang *et al.*, Nature Biotech 17: 793-797 (1999); Publ. de Sol. de Pat. Internacional N.º WO 98/27230; y en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.117.679 y 6.537.776.

Creación de Bibliotecas de Secuencias de ADN que Codifican Polipéptidos de CTLA-4 Mutante.

Las secuencias de ADN mutante que codifican polipéptidos recombinantes de ECD de CTLA-4 mutante se amplificaron a partir de reacciones de ensamblaje mediante PCR usando cebadores directo e inverso diseñados basándose en homología de secuencia. Los cebadores se diseñaron, prepararon, y ensamblaron usando procedimientos convencionales bien conocidos por las personas con una experiencia habitual en la materia e incluían codones de parada e inicio y sitios de restricción si fuera necesario. En la técnica también se conocen bien los procedimientos de amplificación de PCR usados. Véase, por ejemplo, Berger, Ausubel, y Sambrook, todos mencionados anteriormente. Los cebadores directo e inverso a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: cebador directo (5'-CTATTGCTACGGCCGCTATGGCCMTKACGTCGCTCAACCAGCCGTCGTACTC GCGTCC-3') (SEQ ID NO: 191) y cebador inverso (5'-GTGATGGTGTGCGGCCGCATCAGA-3') (SEQ ID NO: 192). Como molde se usaron 5 µl de reacción de ensamblaje en una reacción de PCR de 100 µl con cebadores directo e inverso 1 µM, tampón Taq (Qiagen; N.º 201225) y dNTPs 200 µM para 15 ciclos de amplificación (94 °C 30 s; 50 °C 30 s; 72 °C 40 s). El ADN amplificado que codifica polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante se digiere con enzimas de restricción (*SfiI* y *NotI*) y los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificaron usando el Kit de Extracción en Gel Qiaquick (Qiagen, N.º 28704) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y se ligaron en vector pSB0124 de presentación de fagos digerido del mismo modo (procedimiento similar al que se describe en Chang *et al.*, Nature Biotech 17: 793-797 (1999)). La ligadura de la biblioteca resultante se transformó mediante electroporación en células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen, Inc; N.º C4040-50) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células transformadas se incubaron en LB (medio de caldo de cultivo Luria) que contenía 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante una noche a 37 °C y a continuación se usó para preparar una solución de reserva maxiprep (Qiagen; N.º 12362) de ADN de biblioteca de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

Identificación Sistemática de Bibliotecas de Fago que Presentan Polipéptidos de CTLA-4 Mutante que Tienen Capacidades de Aidez de Unión CD80 Humano y/o CD86 Humano Mejoradas

Generación de Bibliotecas de Presentación de Fagos de Polipéptidos de CTLA-4 Mutante.

El ADN de biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de secuencias de ADN que codifican mutantes de ECD de CTLA-4) se transformó mediante electroporación en células TG-1 de *E. coli* (Stratagene; N.º 200123) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. El cultivo creció en condiciones de selección de fagémido (medio LB que contiene carbenicilina a 50 µg/ml) durante 1-2 generaciones, se infectó con el fago auxiliar M13KO7 (a una multiplicidad de nivel de infección de 5-10), y se incubó con agitación a 250 rpm durante una noche a 37 °C bajo selección doble para fagémido (carbenicilina a 50 µg/ml) y fago auxiliar (kanamicina a 70 µg/ml). Los cultivos se aclararon mediante centrifugación (6000 rpm, 15 min, 4 °C en un rotor 600TC de Sorvall) y las partículas de fago se precipitaron incubando 32 ml de sobrenadante de cultivo con 8 ml de solución de PEG/NaCl (PEG-8000 al 20 %; NaCl 2,5 M) el hielo durante 30 min seguido de centrifugación (9500 rpm, 40 min, 4 °C en un rotor 600TC de Sorvall). El sedimento de fago se suspendió en 1 ml de PBS que contenía BSA al 1 % (albúmina de suero bovino, Sigma; N.º A7906), se transfirió a un tubo de microcentrifugadora, y se aclaró mediante centrifugación (velocidad máxima, 5 min, TA en una centrifugadora de mesa de Eppendorf).

Selección de Bibliotecas de Fago de Mutante de CTLA-4.

Las bibliotecas de fago se seleccionaron en hasta cinco rondas con respecto a proteínas de fusión de hCD80-Ig o hCD86-Ig usando condiciones convencionales. Véase, por ejemplo, Lowman, *et al.*, *Biochemistry* 12; 30 (45): 10832-10838 (1991); Smith, G.P. *et al.*, *Chem. Rev.* 97: 391-410 (1997). Cada ronda de selección incluyó: (a) unión de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante que presentan fago a ligandos hCD80-Ig o hCD86-Ig; (b) retirada del fago no unido; (c) elución del fago unido; y (d) amplificación del fago eluido para la siguiente ronda de selección. Una alícuota de fago de cada ronda se transdujo en células de *E. coli* para obtener colonias de transductantes individuales.

Identificación de Mutantes de CTLA-4 que tienen Capacidades de Aidez de Unión Mejoradas con respecto a CD80 Humano y/o CD86 Humano mediante ELISA de Fago.

Las colonias individuales obtenidas a partir de cada ronda de selección se inocularon en placas de cultivo de 96 pocillos (NUNC; N.º 243656) que contenían 150 µl/pocillo de 2 x de YT (levadura-triptona) medio que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y se incubaron a 250 rpm durante una noche a 37 °C. Los cultivos durante una noche se usaron para inocular bloques de pocillo profundo (Scienceware; N.º 378600001) que contenían 600 µl/pocillos del mismo medio. Los cultivos se incubaron a 250 rpm durante 2 h a 37 °C, se infectaron con fago auxiliar M13KO7 (multiplicidad de infección (moi) 5-10) y a continuación se incubaron a 250 rpm durante una noche a 37 °C bajo selección doble para marcadores de fagémido y fago auxiliar (carbenicilina a 50 µg/ml y kanamicina a 70 µg/ml, respectivamente). Los cultivos se aclararon mediante centrifugación a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C en un rotor GH 3.8 de Beckman. Las placas de ELISA (NUNC; N.º 449824) se revistieron mediante la adición de 50 µl/pocillo de PBS que contenían 10 µg/ml de hCD80-Ig o hCD86-Ig y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y se bloquearon mediante la adición de 200 µl/pocillo de PBS que contenía leche seca no grasa al 3 % e incubación a TA durante 1 hora (h). 25 µl/pocillos de sobrenadantes de fago del bloque de pocillo profundo se transfirieron a placas de ELISA que contenían 25 µl/pocillo de leche seca no grasa al 6 % nony las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y se incubaron con 50 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con HRP (GE Healthcare, N.º 27-9421-01) diluido a 1:5000 en PBST que contenía leche seca no grasa al 3 % durante 1 h a TA. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de PBST y la señal se detectó usando un kit de sustrato de TMB (Pierce; N.º 34021) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Los polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante que presentan un aumento de la avidez de unión a CD80 humano y/o CD86 humano (tal como se mide mediante un aumento de la avidez con respecto a hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), en comparación con la avidez de unión de CTLA-4 humano con respecto a CD80 humano y/o CD86 humano (tal como se mide mediante la avidez de unión de CTLA-4 humano ECD con respecto a hCD80-Ig y/o hCD86-Ig), se seleccionaron para análisis adicional.

Ejemplo 3Creación de un Vector de Proteína de Fusión de Fc de IgG2.

Un vector de expresión de proteína de fusión de IgG2-Fc plásmido se creó para producir una proteína de fusión que comprendía un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la invención y polipéptido de Fc de IgG2 humano. El ADN que codifica el polipéptido de Fc de IgG2 humano se generó mediante amplificación por PCR de ADNc leucocitario humano (BD Biosciences, N.º de Cat. HL4050AH) usando cebador directo (5'-AAGCTGTCACCGGTGGATCGATCCC GAACCTGCCCTGATTCTGATGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGT-3') (SEQ ID NO: 189) y cebador inverso (5'-CAGAATTCATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTG-3') (SEQ ID NO: 190). Los cebadores se diseñaron, prepararon, y ensamblaron usando técnicas convencionales bien conocidas por las personas con una experiencia habitual en la materia e incluían codones de parada e inicio y sitios de restricción si fuera necesario. En la técnica también se conocen bien los procedimientos de amplificación de PCR usados. Véase, por ejemplo, Berger, Ausubel, y Sambrook, todos mencionados anteriormente. Como molde se usaron 50-100 ng de ADNc en una reacción de PCR de 100 µl con cebadores directo e inverso 1 µM, tampón Taq

(Stratagene; N.º 200435) y dNTPs 200 µM para 25 ciclos de amplificación (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 60 s). El producto de PCR se purificó en Columnas de Centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen N.º 28106) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante y se digiere con enzimas de restricción *AgeI* y *EcoRI*. El fragmento de digestión de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó usando el Kit de Extracción en Gel Qiaquick (Qiagen, N.º 28704) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Una versión modificada del vector pCDNA3.1-LEA (que se ha descrito anteriormente), que contiene un sitio de restricción *AgeI* en la secuencia señal de CTLA-4 (introducido como una mutación silenciosa), se puede digerir con *AgeI* y *EcoRI* y ligar al fragmento que se ha mencionado anteriormente. La ligadura se transforma en células de *E. coli* One-shot TOP10 (Invitrogen N.º de Cat. C4040-03) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células transformadas se incuban en LB (medio de caldo de cultivo de Luria) que contiene 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante una noche a 37 °C y a continuación se usó para preparar una solución de reserva maxiprep (Qiagen; N.º 12362) de ADN de plásmido de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

El vector plásmido de expresión resultante se diseña como el vector de expresión de la proteína de fusión de Fc de IgG2 de pCDNA. Este vector es idéntico al vector plásmido de CTLA-4-IgG2 mutante de pCDNA que se muestra en la Figura 1 excepto porque la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante se retira. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido señal en el vector de fusión de Fc de IgG2 de pCDNA (que en la Figura 1 puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que codifica péptido señal adecuada) es un ácido nucleico que codifica el péptido señal CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 181 o SEQ ID NO: 215). Este vector de fusión de Fc de IgG2 no incluye ningún ácido nucleico que codifique un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de la invención o cualquier otro polipéptido de ECD de CTLA-4.

Clonación de Secuencias de Nucleótidos que Codifican Polipéptidos de CTLA-4 Mutante en el Vector de Fusión de Fc de IgG2.

Para producir polipéptidos de CTLA-4 mutante como proteínas de fusión de Fc soluble, cada una de las secuencias de ADN que codifican polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante identificados como con una mejora de las capacidades de avidez de unión a CD80 humano y/o CD86 humano (en comparación con la avidez de unión de CTLA-4-ECD humano con respecto a CD80 humano y/o CD86 humano) de la identificación sistemática de biblioteca de fago se clonó en el vector de proteína de fusión de Fc de IgG2 que se ha descrito anteriormente usando, por ejemplo, el siguiente procedimiento.

Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante que presentan capacidades de avidez de unión más elevadas a hCD80-Ig y/o hCD86-Ig en primer lugar se recuperaron del vector de presentación de fago mediante amplificación de PCR usando cebadores directo e inverso diseñados basándose en la homología de secuencia de un número de restos de nucleótido (por ejemplo, 30-60 nucleótidos) en los extremos N- y C-terminales del polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante y procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los procedimientos que se describen en, por ejemplo, Berger, Ausubel, y Sambrook, todos mencionados anteriormente. Por ejemplo, en un aspecto a modo de ejemplo, las secuencias de ADN que codifican polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante se recuperaron del vector de presentación de fago mediante amplificación de PCR usando el cebador directo (5'-GGAATACCGGTTTTTTGTAAAGCCATGCACGTCGCTCAACCAGCCGTCGTAATC-3') (SEQ ID NO: 191) y cebador inverso (5'-GGCACTCAGATCATCGATCCCGAA-3') (SEQ ID NO: 192). Como molde se usaron 10 nanogramos (ng) de ADN de plásmido (vector de presentación de fago que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica ECD de CTLA-4 mutante) en una reacción de PCR de 100 µl con cebadores directo e inverso 1 µM como se ha descrito anteriormente, tampón Taq (Stratagene; N.º 200435) y dNTPs 200 µM para 25 ciclos de amplificación (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 60 s). El producto de PCR se purificó en Columnas de Centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen N.º 28106) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante y se digiere con enzimas de restricción *AgeI* y *Clal*. Los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificó usando el Kit de Extracción en Gel Qiaquick (Qiagen, N.º 28704) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante, y se ligaron en vector de fusión de Fc de IgG2 plásmido digerido del mismo modo. La ligadura se transformó en células de *E. coli* One-shot TOP10 (Invitrogen N.º de Cat. C4040-03) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células transformadas se incubaron en LB (medio de caldo de cultivo de Luria) que contenía 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante una noche a 37 °C y a continuación se usó para preparar una solución de reserva maxiprep (Qiagen; N.º 12362) de ADN de plásmido de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

El vector plásmido de expresión resultante, que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante, se diseñó como el vector de expresión de plásmido de Fc de IgG2 de ECD mutante de pCDNA. Un diagrama esquemático de este vector se muestra en la Figura 1. Este vector incluye un promotor *BlaI*; gente resistencia a ampicilina; origen de pUC; secuencia señal de poliadenilación de SV40 (poli A); origen de *f1*; promotor SV40; gen de resistencia a neomicina; promotor de CMV para facilitar la expresión de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (que comprende, por ejemplo, péptido señal de CTLA-4 humano, polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante, y polipéptido de Fc de IgG2 humano); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal de CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 181 o SEQ ID NO: 215); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las SEQ ID NOS: 80-152); una secuencia de ácidos nucleicos a modo de

ejemplo que codifica un polipéptido de Fc de IgG2 humano se muestra en la SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 217; y una secuencia de señal determinación de poli A de hormona de crecimiento bovino (bGH). La secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 183 codifica el polipéptido de Fc de hlgG2 con el resto C-terminal de lisina (K) (SEQ ID NO: 184); la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 217 codifica el polipéptido de Fc de hlgG2 sin el resto de lisina C-terminal (SEQ ID NO: 218).

El vector de proteína de fusión de Fc de IgG2 de plásmido también se puede usar para producir una proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 humano ("hCTLA-4-Ig"). En este caso, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ECD de CTLA-4 humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 193) se clona en el vector de proteína de fusión de Fc de IgG2 de plásmido usando procedimientos de clonación convencionales similares a los que se han descrito anteriormente en lugar de la secuencia de nucleótidos que codifica el ECD de CTLA-4 mutante. La proteína de fusión de hCTLA-4-Ig generalmente existe en solución como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión de hCTLA-4-Ig maduras monoméricas idénticas. En este caso, cada proteína de fusión de hCTLA-4-Ig madura monomérica comprende un ECD de CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 159) fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un Fc de IgG2 humano (SEQ ID NO: 218 o SEQ ID NO: 184). Los dos monómeros de hCTLA-4-Ig se unen con enlace covalente juntos mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero, formando de ese modo el dímero de proteína de fusión de hCTLA-4-Ig. El dímero de proteína de fusión de hCTLA-4-Ig madura es la forma de la proteína de fusión usada en los ensayos que se describen en estos Ejemplos, a menos que de forma explícita se indique de otro modo.

Los inventores han encontrado experimentalmente que una proteína de fusión de CTLA-4-Ig humana o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante preparada en células CHO mediante transfección de un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el hCTLA-4-Ig o proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante y el polipéptido de Fc de hlgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 184 generalmente no incluyen el resto de lisina (K) C-terminal predicho, tal como se determina mediante análisis de LCMS; de ese modo la secuencia de polipéptidos de Fc de hlgG2 de una hCTLA-4-IgG2 o una CTLA-4-IgG2 mutante es la que se muestra en la SEQ ID NO: 218, secuencia de polipéptidos de Fc de hlgG2 que generalmente no incluye el resto de lisina C-terminal en comparación con la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 184.

Transfección Transitoria de Células COS.

Las células COS-7 se cultivaron hasta una confluencia de un 80-90 % en matraces T-175 que contenían 40 ml de Medio de Crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, N.º de Cat. 10565-018) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone N.º de Cat. SV30014,03) y 1x de PSG (penicilina, estreptomycin y glutamina) (Invitrogen, N.º de Cat. 10378-016)). Inmediatamente antes la transfección de las células con un vector plásmido de expresión, el medio se retiró y se reemplazó con 35 ml de Medio de Expresión (medio OptiMem (Gibco N.º 51985) que contenía 1x de PSG). El ADN de plásmido (10 µg) (por ejemplo, un vector de expresión de Fc de IgG2 de ECD de CTLA-4 mutante de pCDNA que codifica una proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante) se mezcló con reactivo de transfección FuGENE6 (Roche N.º 11 815 075 001) en una proporción de volumen de 1:3 y se añadió a 1 ml de Medio de Crecimiento. A continuación esta mezcla se añadió lentamente al matraz T-175 y se giró dando vueltas suavemente para mezclar. Después de incubación a 37 °C durante 3 días, el medio se cosechó, se añadió Medio de Expresión recién preparado, y los cultivos se incubaron durante un periodo adicional de 3 d.

Un procedimiento similar se puede usar para preparar células COS-7 transfectar as con un vector plásmido que codifica CTLA-4-IgG2 humano similar o un vector plásmido pCDNA3.1-LEA que codifica LEA29Y-Ig.

Purificación de Proteínas.

Los sobrenadantes de los cultivos de transfección (por ejemplo, que comprenden células transfectadas con un vector de Fc de IgG2 de ECD de CTLA-4 mutante de pCDNA que codifica proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante) se aclararon mediante centrifugación a 1000x g durante 10 min a TA y filtración a través de membranas de 0,2 µm (Nalgene, VWR N.º 73520-982). Las proteínas se purificaron mediante cromatografía por afinidad de Proteína-A usando un sistema de HPLC AKTA Explorer (GE Healthcare). Una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante se unió a columnas de FF de Proteína A Hitrap (GE Healthcare, N.º 17-5079-01) en tampón PBS, se lavó con el mismo tampón, eluyendo con tampón de ácido cítrico 100 mM (pH 4,0), y a continuación se neutralizó mediante la adición de 1/10 volúmenes de base Tris 2 M. Por último el tampón en la solución de proteína se intercambió por PBS mediante diálisis usando membranas de MWCO de 10 kDa (Pierce, N.º de Cat. PI66810).

Un procedimiento similar se puede usar para purificar proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 o LEA29Y-Ig humano.

Evaluación de Calidad de Proteína.

Análisis de SDS/PAGE.

El peso molecular aparente (PM) de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante purificada se midió mediante análisis de SDS/PAGE en condiciones no reductoras. En condiciones no reductoras, una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante generalmente existe como una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de

fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas. En un aspecto, el dímero es un homodímero que comprende dos monómeros idénticos de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante. En un aspecto, cada monómero de la proteína de fusión de CTLA-4-Ig comprende un ECD de CTLA-4 mutante maduro/secretado fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG2 humano. Los dos monómeros de CTLA-4-Ig mutante se unen con enlace covalente en conjunto mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero. El homodímero es la forma de la molécula de proteína de fusión mutante que se describe generalmente en estos Ejemplos, a menos que de forma explícita se indique de otro modo. Los datos que se muestran en estos Ejemplos pertenecen a homodímeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, a menos que de forma explícita se indique de otro modo.

Los análisis de SDS/PAGE se realizaron como sigue a continuación. 2 µg de proteína purificada se añadieron a 20 µl de Tampón de Muestra LDS (Invitrogen N.º NP0007) y se desarrollaron a través de geles Bis-Tris al 4-12 % NuPAGE (Invitrogen N.º NP0321BOX) en tampón de desarrollo 1x de docecil sulfato sódico MES (SDS) / PAGE (Invitrogen N.º NP0002) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Los geles se tiñeron mediante incubación en 50 ml de SimplyBlue SafeStain (Invitrogen N.º LC6060) durante 1 h con agitación suave a TA. Los geles se destiñeron mediante dos incubaciones con 200 ml de agua durante 1 h con agitación suave a TA y se procesaron en tampón de secado (Bio RAD 161-0752) de acuerdo con condiciones recomendadas por el fabricante.

Un gel de SDS/PAGE representativo de dos homodímeros de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo (denominados clones D3 y D4) y la proteína de fusión Orencia®, que sirve como un control comparativo, se presenta en la Figura 3. El dímero de proteína de fusión D3-Ig comprende dos monómeros de la proteína de fusión de D3-Ig idénticos que se unen con enlace covalente mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero de D3-Ig. Cada monómero de D3-Ig comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (denominado "D3") que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 61 fusionado directamente (es decir, sin resto(s) de aminoácido "conector") en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de Fc de hIgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 218. El dímero de proteína de fusión D4-Ig del mismo modo comprende dos monómeros de D4-Ig idénticos que se unen con enlace covalente mediante enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero de D3-Ig. Cada proteína de fusión de D4-IgG2 monomérica comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (denominado "D4") que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 62 fusionado directamente (es decir, con sin resto(s) de aminoácido "conector") en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de la secuencia de polipéptidos de Fc de hIgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 218.

Como se ha explicado anteriormente, los inventores han encontrado experimentalmente que una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante preparada en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de Fc de hIgG2 predicho que se muestra en la SEQ ID NO: 184 generalmente no incluye el resto de lisina (K) C-terminal predicho, tal como se determina mediante análisis LCMS; de ese modo, la secuencia de polipéptidos de Fc de hIgG2 de un CTLA-4-IgG2 mutante que se describe en el presente documento es la que se muestra en la SEQ ID NO: 218, secuencia de polipéptidos de Fc de hIgG2 que generalmente no incluye el resto de lisina C-terminal, as en comparación con la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 184.

Los análisis de SDS/PAGE se realizaron en todas las preparaciones de proteína para verificar la calidad de la proteína y en términos de peso molecular aparente, concentración de proteína, y pureza. Los resultados de los análisis de SDS/PAGE fueron similares para todas las preparaciones de proteína. A partir de los resultados del gel a modo de ejemplo que se muestran en la Figura 3, los dímeros de proteína de fusión de D3-IgG2 y D4-IgG2 purificados tienen un PM aparente de aproximadamente 80 kDa, que es consistente con el PM predicho de la estructura de proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante homodimérica a modo de ejemplo que se representa en la Figura 10 (PM predicho = 78-79 kDa). (Los monómeros de proteína CTLA-4-IgG2 mutante purificado generalmente tienen PM aparentes de 39-40 kDa.) Las bandas de proteína en el gel que se muestra en la Figura 3 se han teñido con intensidades equivalentes; esto confirma la precisión de la medición de la concentración de proteína para diferentes muestras. Al igual que para la pureza de proteína, una banda de PM inferior se puede observar en la Figura 3 con un PM aparente de aproximadamente 44 kDa, que es consistente con el PM predicho de una proteína de fusión de IgG2 monomérica. La intensidad relativa de esta banda de PM inferior es consistentemente baja y se calcula que es inferior a un 5 % de la proteína total.

Para evaluar la pureza de proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 o LEA29Y-Ig humano, producidas usando métodos similares a los que se han descrito anteriormente se pueden usar análisis de SDS/PAGE análogos.

Análisis de Endotoxina.

Los niveles de endotoxina de proteínas de fusión de CTLA-4 mutante se midieron usando un kit de ensayo de lisado de amebocitos limulus QCL-1000 (Cambrex N.º 50-648U) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. El nivel máximo de endotoxina para proteínas usadas en ensayos basados en célula se estableció en 10 unidades de endotoxina (EU)/mg de proteína.

Para medir los niveles de endotoxina de preparaciones de proteína de CTLA-4-IgG2 o LEA29Y-Ig humano se

pueden usar análisis similares.

Análisis de Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC).

5 Los niveles de agregación de proteína (incluyendo niveles de agregación de polipéptidos de CTLA-4 mutante y polipéptidos de control) se midieron mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando un sistema Dionex BioLC (Dionex). La proteína (5 µg) se desarrolló a través de una columna Tosoh G3000Wxl (Tosoh Bioscience) en tampón de desarrollo de PBS usando un desarrollo isocrático de 20 min y detección mediante absorbancia (A) a 214 nanómetros (nm). El nivel máximo de agregación para proteína usada en ensayos adicionales se estableció en un 10 %.

15 El análisis de SEC se realizó en todas las preparaciones de proteína para verificar la calidad de la proteína en términos de niveles de agregación de proteína. Los resultados fueron similares para todas las preparaciones de proteína y un perfil de elución representativo a partir de un análisis de SEC de un dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (D3-Ig) se muestra en la Figura 4. El eje y muestra unidades de miliAbsorbancia (mAU); el eje x muestra el tiempo de evolución en minutos. La estructura del dímero D3-Ig se ha explicado anteriormente en la sección "Análisis de SDS/PAGE". Este dímero de CTLA-4-Ig mutante purificado tiene un tamaño muy homogéneo y no contiene niveles elevados de especies agregadas. Otras proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante se analizaron del mismo modo y mostraron resultados similares (los datos no se muestran). Se encontró que las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante purificadas tenían un tamaño homogéneo y no contenían niveles elevados (> 10 %) de proteínas agregadas. Es importante verificar los estados de agregación de las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante purificado porque las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante altamente agregadas se pueden unir con mayor avidez a moléculas de CD80 humano y/o CD86 humano y de ese modo pueden presentar mayor actividad biológica.

25 **Ejemplo 4**

30 Medición de las Capacidades de Avidez de Unión de Proteínas de Fusión de CTLA-4-Ig Mutante a CD80-Ig murino Humano (hCD80-mIg) y Proteínas de Fusión de CD86-Ig murino humano (hCD86-mIg) Usando Resonancia por Plasmones Superficiales (SPR) (Análisis Biacore™).

Este ejemplo describe un procedimiento para identificar sistemáticamente proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante para avidez de unión mejorada para ligandos hCD80-mIg y/o hCD86-mIg usando un análisis de interacción Biacore. En la nomenclatura usada para describir este tipo de análisis, el asociado de unión inmovilizado se denomina "ligando", y el asociado de unión en la fase móvil se denomina "analito". Las proteínas de fusión que contienen un dominio de Ig generalmente forman estructuras diméricas en solución en virtud de la fuerte asociación entre dos dominios de Ig. A menos que se indique de otro modo, se espera que tales conformaciones diméricas existan para las proteínas de fusión que se describen en este Ejemplo (es decir, CTLA-4-Ig mutante, proteína de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig, hCD80-mIg, y hCD86-mIg). El término "avidez" generalmente se refiere a la fuerza de unión entre analitos diméricos (por ejemplo, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante) y ligandos diméricos (por ejemplo, proteínas de fusión de hCD80-mIg o hCD86-mIg). Los aumentos en la avidez de unión que se describen para proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante resultan de aumentos en la afinidad de unión entre cada dominio de ECD de CTLA-4 y su ligando correspondiente. La fuerza de avidez de unión se describe generalmente en términos de la constante de disociación en equilibrio (K_D), que describe la concentración molar de analitos a la que se une un 50 % del ligando disponible en equilibrio.

50 En este método de identificación sistemática, los chips de sensor Biacore se derivatizaron con ligandos hCD80-mIg o hCD86-mIg y se permitió que las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante en tampón fluyeran sobre los chips de sensor revestidos con ligando. Se evaluó la capacidad de una molécula de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante para unirse a un asociado de unión específica (es decir, hCD80-mIg o hCD86-mIg). También se permitió que las proteínas de fusión (es decir, proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 humano, proteína de fusión Orenicia®, y proteína de fusión de LEA29Y-Ig mutante) fluyeran sobre los chips de sensor revestidos con ligando y las capacidades de estas moléculas para unirse a hCD80-mIg o hCD86-mIg se evaluaron del mismo modo para comparación. Usando el sistema Biacore, la constante de la tasa de asociación (k_{asoc}) y disociación (k_{dis}) de una proteína de interés que se une a ligandos hCD80-mIg o hCD86-mIg se puede evaluar y usar para calcular la constante de disociación en equilibrio, K_D . La proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 humano, que comprende el polipéptido de ECD de CTLA-4 humano de WT fusionado al polipéptido de IgG2 humana, puede servir como un "control" de CTLA-4-Ig humano de tipo silvestre. Además o como alternativa, dado que la proteína de fusión Orenicia® está formada por el polipéptido de ECD de CTLA-4 humano de WT fusionado a un polipéptido de Fc de IgG1 modificado, también sirve de forma eficaz como un control de CTLA-4-Ig humano de tipo silvestre para fines comparativos. Se identificaron las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que tienen un aumento de las capacidades de avidez de unión para hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, en comparación con CTLA-4-IgG2 humano, proteína de fusión Orenicia®, y/o LEA29Y-Ig.

65 Como se discute con mayor detalle a continuación, el aumento de la avidez de unión de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante hacia hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, en comparación con la avidez de unión de la proteína de fusión Orenicia® (es decir, hCTLA-4-IgG1) y/o LEA29Y-Ig hacia hCD80-mIg y/o hCD86-mIg, no se debió a

diferencias entre IgG2 presente en las moléculas de CTLA-4-Ig mutante y la IgG1 mutante presente en las moléculas de Orenicia® o LEA29Y-Ig.

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

Ensayo Cinético Convencional.

- 10 El ensayo tiene tipo convencional mide la cinética de unión de ligando dimérico (por ejemplo, proteína de fusión de hCD80-mIg o proteína de fusión de hCD86-mIg) revestido en chips de sensor y analitos diméricos (por ejemplo, proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención) en la fase móvil. El anticuerpo de IgG de conejo anti-ratón (GE Healthcare, N.º BR-1005-14) se inmovilizó en chips de sensor CM5 (GE Healthcare, N.º BR-1000-14) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El anticuerpo se diluyó a 30 µg/ml en tampón de inmovilización (acetato
- 15 sódico 10 mM, pH 5,0 (BR-1003-51)). A un caudal de 5 µl/minuto, el chip de sensor CM5 se activó con una inyección de 35 µl de una mezcla de Clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (preparada mezclando volúmenes iguales de 11,5 mg/ml de EDC y 75 mg/ml de NHS) (GE Healthcare, N.º BR-1000-50), seguido de una inyección de 35 µl de anticuerpos sin diluir. Los sitios que no reaccionaron se interrumpieron con 35 µl de etanolamina-HCL 1 M, pH 8,5 (GE Healthcare, N.º BR-1000-50). Este procedimiento
- 20 generalmente proporciona 15.000 unidades de respuesta (UR) de anticuerpo acoplado. Los ligandos de CTLA-4 de CD80-Ig murino humano (hCD80-mIg) (Ansell, N.º 510-820) o CD86-Ig murino humano (hCD86-mIg) (Ansell, N.º 509-820) se unieron a chips de sensor revestidos con anticuerpo por inyección de 10 µl o 16 µl, respectivamente, de solución delirando (2 µg/ml de proteína en tampón HBS-EP [HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM,
- 25 tensioactivo P-20 al 0,005 % (v/v), GE Healthcare, N.º BR-1001-88]) a un caudal de 10 µl/min. Los niveles de captura de ligandos generalmente eran de 135-170 UR. Las proteínas de CTLA-4-Ig mutante (o se diluyeron en tampón HBS-EP influyeron sobre chips de sensor revestidos con ligando durante 2 min a 30 µl/min, seguido de incubación de 5 min con tampón HBS-EP que no contenía proteína al mismo caudal. Para proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que tienen tasas de disociación muy lenta de hCD86-mIg, también se realizaron ensayos genéticos usando
- 30 tiempos de disociación más largos (por ejemplo, 20 min). Los niveles de señal de R_{máx} para proteínas CTLA-4-Ig mutante variaron de aproximadamente 70-100 UR. La regeneración entre ciclos se realizó mediante incubación de 3 min con tampón de glicina 10 mM (pH 1,7) a 50 µl/min. Los nuevos chips se sometieron a 4-5 ciclos de captura/unión/regeneración antes de uso en experimentos reales. Los datos a partir de una célula de referencia que contenía anticuerpo de captura de IgG de conejo anti-ratón solo se resto de los datos obtenidos a partir de células
- 35 de flujo células que contenían hCD80-mIg o hCD86-mIg capturado. Generalmente, 8 diluciones de proteínas de CTLA-4-Ig mutante que variaban de 500 nM a 0,2 nM se analizaron contra un blanco de referencia (tampón HBS-EP solo).

- Las trazas de sensograma de un análisis Biacore habitual se muestran en la Figura 5. Esta figura muestra la respuesta (UR) con respecto al tiempo (en segundos (s)) generada por la unión de las siguientes tres proteínas de
- 40 fusión para la proteína de fusión de hCD86-mIg: (1) proteína de fusión Orenicia® (que sirve como un control y para comparación) (Bristol-Myers Squibb Co.; véase, por ejemplo Larson C.P. *et al.*, Am. J. Trans. 5: 443-453 (2005)); (2) proteína de fusión de LEA29Y-Ig (cara comparación); y (3) una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo denominada "clon D3" (también denominada D3-IgG2). La proteína de fusión de D3-IgG2 comprende dos
- 45 proteínas de fusión monoméricas idénticas que se unen con enlace covalente en conjunto por uno o más enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en cada monómero. Véase la discusión en la sección "Análisis de SDS/PAGE" que se ha mencionado anteriormente. Cada proteína de fusión monomérica comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante maduro que se muestra en la SEQ ID NO: 159 fusionado con enlace covalente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido de IgG2 humana que se muestra en la SEQ ID NO: 184 o
- 50 218. Otras proteínas de fusión diméricas pueden comprender escrituras similares a las de la proteína de D3-IgG2 proteína de fusión dimérica - excepto porque el polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante de D3 de cada proteína de fusión monomérica se reemplaza por un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante diferente.

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

- La fase de disociación del análisis comienza en el momento marcado por la flecha en la Figura 5. durante la fase de disociación, el analito y el ligando se disocian de su conformación unida. En la Figura 5, la tasa a la que un analito se disocia del ligando hCD86-mIg se representa por la disminución en unidades de respuesta (tasa de disminución de
- 60 las unidades de respuesta con respecto al tiempo). Basándose en estos datos, la constante de la tasa de disociación relativa (velocidades de "disociación", k_{dis} o k_d) y constantes de tasa de asociación (velocidades de "asociación", k_{asoc} o k_a) se pueden determinar. La avidez total de la interacción se puede describir mediante la K_D , (k_{dis}/k_{asoc}). El aumento de las capacidades de avidez de unión a menudo se manifiesta en tasas de disociación más lentas. Si la tasa de disociación más lenta va acompañada por una tasa de asociación igual, superior, o ligeramente más lenta,
- 65

de modo que la constante de disociación en equilibrio calculada K_D es menor, la avidéz será mayor. En este caso, una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante que tiene una avidéz de unión hacia el ligando hCD86-mIg que es mayor que la avidéz de unión de la proteína de fusión Orencea® para el mismo ligando también tendrá una tasa de disociación más lenta del ligando que la proteína Orencea®. Una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante que tiene una avidéz de unión hacia el ligando hCD86-mIg que es mayor que la avidéz de unión de LEA29Y-Ig para el mismo ligando también tendrá una tasa de disociación más lenta del ligando que LEA29Y-Ig.

La Figura 5 muestra que la tasa de disociación de LEA29Y-Ig del ligando hCD86-mIg es significativamente menor que la tasa de disociación de la proteína Orencea® del mismo ligando. LEA29Y-Ig también tiene una tasa de asociación para unión a hCD86-mIg similar a la observada para la proteína de fusión Orencea®. Por lo tanto, LEA29Y-Ig tiene una avidéz más elevada hacia hCD86-mIg que la proteína Orencea®. Este hallazgo es consistente con estudios previos que describen que LEA29Y-Ig tiene una avidéz de unión más elevada hacia el ligando hCD86-mIg que la proteína de fusión Orencea® (Larson C.P. *et al.*, Am. J. Trans. 5: 443-453 (2005)). La Figura 5 también muestra que la proteína de fusión de D3-IgG2 mutante tiene una tasa de disociación más lenta del ligando hCD86-mIg que cualquiera de la proteína de fusión Orencea® o LEA29Y-Ig. La pérdida de fusión de D3-IgG2 también tiene una tasa de asociación similar (pero en cierto modo más rápida) para unión al ligando hCD86-mIg en comparación con las tasas de asociación de cualquiera de las proteínas de fusión Orencea® o LEA29Y-Ig para el ligando hCD86-mIg. Por lo tanto, la proteína de fusión de D3-IgG2 presenta una avidéz de unión más elevada para el ligando hCD86-mIg que cualquiera de las proteínas de fusión Orencea® o LEA29Y-Ig. Por lo tanto, se espera que la proteína de fusión de D3-IgG2 sea una a CD86 nativo, incluyendo, por ejemplo, CD86 como se expresa *in vivo* en las APC en mamíferos, tales como seres humanos, con una avidéz de unión más elevada. Esta visión está apoyada adicionalmente por los ensayos basados en células funcionales que se discuten en los Ejemplos que siguen a continuación.

Los análisis Biacore se realizaron usando otras proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante. Además, los análisis Biacore se realizaron usando chips de sensor revestidos con hCD80-mIg y proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante. Las tasas de disociación y las capacidades de avidéz de unión de estas moléculas mutantes se determinaron y se compararon con las tasas de disociación y las capacidades de avidéz de unión de las proteínas de fusión Orencea® y LEA29Y-Ig. Los resultados representativos se muestran en las Tablas 3 y 4 y se discuten con mayor detalle a continuación.

Análisis de Datos de Biacore Convencionales.

Después de delección de las porciones de regeneración y captura de los sensorgramas, las curvas se llevaron a cero a un promedio de 5 s de todas las curvas aproximadamente 10 s antes de la inyección de muestra. Una curva de blanco se restó de cada curva de ensayo. Los datos se analizaron con el software BIAevaluation (v4.1, disponible en GE Healthcare) usando la función "Cinética de ajuste, k_a/k_d Simultánea". El tiempo de inicio de inyección se definió como un tiempo antes de la fase de asociación en el que todas las curvas eran cercanas a cero. La selección de datos para la fase de asociación comenzó aproximadamente 10 s después del tiempo de inicio de inyección y terminó aproximadamente 10 s antes del tiempo de parada de inyección. El tiempo de parada de inyección se definió como un tiempo antes de la aparición de cualquier adición de señal asociada con la fase de disociación. La fase de disociación se seleccionó para que comenzara 10 s después del tiempo de parada de inyección e incluía 280-295 s de la fase de disociación de 5 min. El modelo de Langmuir a 1:1 describe la reacción $A + B \rightleftharpoons AB$. Este modelo representa un solo ligando que se une a una sola proteína de interés (por ejemplo, receptor). El modelo de Langmuir a 1:1 a partir del software BIAevaluation se usó para determinar la constante de la tasa de asociación (k_a) y la constante de la tasa de disociación (k_d) y para calcular la constante de disociación en equilibrio, K_D . $K_D = k_d/k_a$. $K_D = ([A] \cdot [B])/[AB]$. La constante de disociación en equilibrio, K_D , es igual a la inversa de la constante de asociación en equilibrio, K_A . $K_D = 1/K_A$. Las ecuaciones de la tasa para la reacción (analito A más ligando B que proporciona complejo AB), en las que A = analito inyectado, B = ligando libre, y t = tiempo, son: $d[B]/dt = - (k_a [A][B] - k_d [AB])$ y $d[AB]/dt = k_a[A][B] - k_d[AB]$. Sustituyendo R, las unidades de respuesta (UR) de Biacore a un momento dado, para [AB], $R_{m\acute{a}x} - R$ para [B], y C (concentración de analito) para [A], la expresión de la tasa neta en unidades de Biacore es $dR/dt = k_a C(R_{m\acute{a}x} - R) - k_d R$, en la que R a $t_0 = 0$, $B[0] = R_{m\acute{a}x}$, y $AB[0] = 0$ UR, con la respuesta total = [AB] + RI. El desplazamiento masivo (RI) se estableció en cero, y $R_{m\acute{a}x}$, k_a y k_d se ajustaron globalmente para todas las curvas.

Los ensayos de cinética y análisis de datos convencionales que se han descrito anteriormente se realizaron en reparaciones de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, así como proteínas de fusión de LEA29Y-Ig y Orencea®. Las Tablas 3 y 4 resumen los datos de unión para proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante, representativas.

La Tabla 3 presenta capacidades de avidéz de unión de las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante, representativas para hCD86-mIg, tal como se mide mediante el ensayo de Biacore convencional que se ha descrito anteriormente. De forma específica, la Tabla 3 muestra del nombre de cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante; el número de identificación de la secuencia (SEQ ID NO) que corresponde a la secuencia de polipéptidos de la proteína de fusión de ECD de CTLA-4 mutante monomérica; la constante de disociación en equilibrio (K_D (Molar (M))) determinada basándose en la avidéz de unión de la proteína mutante con respecto a hCD86-mIg; y la avidéz de

unión de cada CTLA-4-Ig mutante para hCD86-mlg con respecto a la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® para hCD86-mlg. La avidéz de unión relativa (que se muestra en la columna en el extremo derecho) se muestra como un factor de mejora en la avidéz de unión de la proteína de fusión mutante para hCD86-mlg en comparación con la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® para hCD86-mlg. Cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante en la Tabla 3 generalmente existe en solución como una proteína de fusión dimerica que comprende dos proteínas de fusión monoméricas idénticas, en la que cada proteína monomérica comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, denominado D1, D1T, D2, D3, D4, etc.) fusionado directamente en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG2 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 184 o 218. Cada CTLA-4-Ig mutante dimerico de ese tipo se puede preparar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Como alternativa, cada dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante dimerica de ese tipo se puede preparar usando métodos que se presentan en el Ejemplo 3 que se ha mencionado anteriormente. En resumen, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un ECD de CTLA-4 mutante en particular identificado en la Tabla 3 (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante identificada en la Tabla 3) se puede clonar en el vector de fusión de Fc de IgG2, las células de mamífero se pueden transfectar con el vector, y la proteína de fusión resultante se puede expresar, purificar, y evaluar como se describe en el Ejemplo 3. Una secuencia de ácidos nucleicos a modo de ejemplo para cada ECD de CTLA-4 mutante se presenta en el Listado de Secuencias que se incluye con el presente documento. La proteína de fusión Orenicia®, que comprende dos proteínas de fusión monoméricas, cada proteína de fusión monomérica comprendiendo un ECD de CTLA-4 humano de tipo silvestre fusionado a un Fc de IgG1 modificado, sirve como la referencia, es decir, con la avidéz de unión a hCD86-mlg establecida en 1. También se muestran los valores de K_D para la proteína de fusión de LEA29Y-Ig y la proteína de fusión de CTLA-4-Ig humano proteína de fusión. Además, también se muestra el factor de mejora en la avidéz de unión a hCD86-mlg de LEA29Y-Ig en comparación con la avidéz de unión a hCD86-mlg de la proteína Orenicia®. Las capacidades de avidéz de unión de las proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 y Orenicia® para hCD86-mlg son aproximadamente iguales, lo que confirma que las diferencias entre el polipéptido de IgG2 humana presente en CTLA-4-IgG2 humano y la IgG1 modificada presente en la proteína Orenicia® contribuyen poco, si no en absoluto, a las respectivas afinidades de unión a hCD86-mlg de estas moléculas. Como se discute con mayor detalle en el Ejemplo 5 que sigue a continuación, los inventores han confirmado que las diferencias en las actividades funcionales inmunosupresoras entre polipéptidos de CTLA-4-Ig mutante y la proteína Orenicia® (o LEA29Y-Ig) no se pueden atribuir a sus respectivas regiones de Fc de Ig que comprenden diferentes isotipos de IgG.

Como se muestra en la Tabla 3, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante representativas tienen capacidades de avidéz de unión a hCD86-mlg que son: (1) al menos aproximadamente iguales o mayores que la avidéz de unión de CTLA-4-IgG2 humano ("hCTLA-4-IgG2") (que comprende dos proteínas de fusión monoméricas unidas con enlace covalente, cada una de tales proteínas monoméricas comprendiendo el polipéptido de ECD de CTLA-4 humano fusionado a un polipéptido de Fc de IgG2); (2) al menos aproximadamente iguales o mayores que la avidéz de unión de la proteína Orenicia® al ligando hCD86-mlg; y/o (3) al menos aproximadamente iguales o mayores que la avidéz de unión del LEA29Y-Ig con respecto al ligando hCD86-mlg. El factor de aumento de la avidéz de unión al ligando hCD86-mlg con respecto a la avidéz de unión de la proteína Orenicia® a hCD86-mlg se indica para cada mutante de CTLA-4-Ig (4ª columna en la Tabla 3).

Se encontró que una mayoría de las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante tenían una tasa de disociación de proteína de fusión de hCD86-mlg que es más lenta que la tasa de disociación de la proteína de fusión Orenicia® de hCD86-mlg (los datos no se muestran). Se encontró que un número de las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante tenían una tasa de asociación a hCD86-mlg mayor que la tasa de asociación de la proteína de fusión Orenicia® al mismo ligando (los datos no se muestran).

Todas las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 3 presentaban constantes de disociación en equilibrio (K_D) de hCD86-mlg que eran menores que la constante de disociación en equilibrio de hCD86-mlg de CTLA-4-IgG2 humano u proteína de fusión Orenicia®. Además, la mayoría de las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 3 presentaban constantes de disociación en equilibrio de hCD86-mlg que eran menores que la constante de equilibrio de hCD86-mlg de LEA29Y-Ig.

Todas las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 3 tenían capacidades de avidéz de unión hacia hCD86-mlg que eran mayores que las capacidades de avidéz de unión de la proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 humana u Orenicia® para hCD86-mlg (el factor de aumento calculado en la avidéz de unión de hCD86-mlg con respecto a la proteína de fusión Orenicia® se muestra en la 4ª columna en la Tabla 3). Además, muchas de las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 3 presentaban capacidades de avidéz de unión para hCD86-mlg que son mayores que la avidéz de unión de LEA29Y-Ig para hCD86-mlg (4ª columna en la Tabla 3).

Un CTLA-4-Ig mutante de la invención que tiene una avidéz de unión mayor para el ligando hCD86-mlg que la de la proteína de fusión Orenicia® o LEA29Y-Ig probablemente tendrá un aumento de la potencia inmunosupresora *in vivo* en comparación con la proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2, Orenicia®, o LEA29Y-Ig, respectivamente, tal como, por ejemplo, en métodos terapéuticos y/o profilácticos para suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunológico de mamíferos, tales como

por ejemplo, seres humanos, en los que la inmunoinhibición o inmunosupresión es deseable), métodos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano), y otros métodos que se describen en cualquier parte en el presente documento.

5

Tabla 3.

Proteína de Fusión (dímero)	SEQ ID NO* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	K _D de hCD86-mIg (M)	Avidez de Unión hacia hCD86-mIg (Con respecto al dímero de proteína de fusión Orencea®)
CTLA-4-IgG2 Humana	162	3,95 x 10 ⁻⁹	1,32x
Dímero proteína de fusión Orencea®	164	5,23 x 10 ⁻⁹	1
LEA29Y-Ig	166	1,05 x 10 ⁻⁹ - 5,23 x 10 ⁻¹⁰	5x - 10x
D1-IgG2	58	2,65 x 10 ⁻⁹ - 5,23 x 10 ⁻¹⁰	2x - 10x
D1T-IgG2	59	5,23 x 10 ⁻¹⁰ - 2,62 x 10 ⁻¹⁰	10x - 20x
D2-IgG2	60	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-IgG2	61	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D4-IgG2	62	2,65 x 10 ⁻⁹ - 5,23 x 10 ⁻¹⁰	2x - 10x
D5-IgG2	63	2,65 x 10 ⁻⁹ - 5,23 x 10 ⁻¹⁰	2x - 10x
D6-IgG2	64	2,65 x 10 ⁻⁹ - 5,23 x 10 ⁻¹⁰	2x - 10x
D20-IgG2	65	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D21-IgG2	66	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D23-IgG2	67	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D24-IgG2	68	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D26-IgG2	69	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D27-IgG2	70	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D28-IgG2	71	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D29-IgG2	72	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D31-IgG2	73	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-1-IgG2	1	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-2-IgG2	2	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-3-IgG2	3	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-4-IgG2	4	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-5-IgG2	5	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-6-IgG2	6	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-7-IgG2	7	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-8-IgG2	8	2,62 x 10 ⁻¹⁰ - 1,31 x 10 ⁻¹⁰	20x - 40x
D3-9-IgG2	9	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-11-IgG2	10	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x
D3-12-IgG2	11	< 1,31 x 10 ⁻¹⁰	> 40x

ES 2 688 721 T3

D3-14-IgG2	12	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-15-IgG2	13	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-16-IgG2	14	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-17-IgG2	15	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-19-IgG2	16	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-20-IgG2	17	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-21-IgG2	18	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-22-IgG2	19	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-23-IgG2	20	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-24-IgG2	21	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-25-IgG2	22	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-26-IgG2	23	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-27-IgG2	24	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-28-IgG2	25	$5,23 \times 10^{-10} - 2,62 \times 10^{-10}$	10x - 20x
D3-29-IgG2	26	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-30-IgG2	27	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-31-IgG2	28	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-32-IgG2	29	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-33-IgG2	30	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-34-IgG2	31	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-39-IgG2	32	$5,23 \times 10^{-10} - 2,62 \times 10^{-10}$	10x - 20x
D3-50-IgG2	33	$2,62 \times 10^{-10} - 1,31 \times 10^{-10}$	20x - 40x
D3-52-IgG2	34	$5,23 \times 10^{-10} - 2,62 \times 10^{-10}$	10x - 20x
D3-53-IgG2	35	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-54-IgG2	36	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-56-IgG2	38	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-62-IgG2	44	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-65-IgG2	47	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-66-IgG2	48	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-69-IgG2	50	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-70-IgG2	51	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-71-IgG2	52	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-72-IgG2	53	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-73-IgG2	54	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-74-IgG2	55	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-75-IgG2	56	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$
D3-76-IgG2	57	$< 1,31 \times 10^{-10}$	$> 40x$

*Nota: Los números de identificación de secuencia (SEQ ID NOS) que se muestran en la Tabla 3 para proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 humana, Orenicia®, y LEA29Y-Ig son las de las secuencias del polipéptido de estas proteínas de fusión de Ig, respectivamente. La SEQ ID NO que se muestra en la Tabla 3 para cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante identifica la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante identificada. Los datos pertenecen a una CTLA-4-Ig mutante que comprende un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-48 y 58-73) fusionado en su extremo N-terminal al extremo C-terminal del polipéptido de Fc de IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 184 o 218. Los métodos para preparar tales proteínas de fusión se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, los inventores han encontrado experimentalmente que un CTLA-4-Ig mutante preparado en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de Fc de hlgG2 predicho que se muestra en la SEQ ID NO: 184 generalmente no incluye el resto de lisina (K) C-terminal predicho; de ese modo, la secuencia de polipéptidos de Fc de hlgG2 de un CTLA-4-IgG2 mutante es la que se muestra en la SEQ ID NO: 218, secuencia de polipéptidos de Fc de hlgG2 que no incluye el resto de lisina C-terminal en comparación con la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 184. Las secuencias de proteínas de fusión a modo de ejemplo que no incluyen el resto de lisina C-terminal se muestran en las SEQ ID NOS: 205-214, 219, y 221.

La Tabla 4 presenta capacidades de avidéz de unión de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a hCD80-mIg, tal como se mide con el ensayo de Biacore convencional. De forma específica, la Tabla 4 of muestra en nombre del clon de una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante; el número de identificación de la secuencia (SEQ ID NO) que corresponde a la secuencia de polipéptidos de la proteína de fusión de ECD de CTLA-4 mutante monomérica; la constante de disociación en equilibrio (K_D (Molar (M)) para el ensayo de avidéz de unión a ligando hCD80-mIg; y la avidéz de unión del proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante al ligando hCD80-mIg con respecto a la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® al mismo ligando. Para cada proteína mutante, el factor de mejora en la avidéz de unión al ligando hCD80-mIg en comparación con la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® al ligandos hCD80-mIg se muestra (4ª columna en la Tabla 4). La proteína de fusión Orenicia® sirve como la referencia, es decir, con la avidéz de unión a hCD80-mIg establecida en 1. Las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante por lo general existen como proteínas de fusión diméricas en solución. Como se muestra en la Tabla 4, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante diméricas como se desvela en el presente documento tiene capacidades de avidéz de unión al ligando hCD80-mIg que son: (1) al menos aproximadamente iguales o mayores que la avidéz de unión de CTLA-4-IgG2 humano; (2) al menos aproximadamente iguales o mayores que la avidéz de unión de la proteína de fusión Orenicia® al ligando hCD80-mIg; y/o (3) al menos aproximadamente iguales o mayores que la avidéz de unión del LEA29Y-Ig al ligando hCD80-mIg. Como se ha discutido anteriormente, cada dímero de CTLA-4-Ig mutante dimérica se puede preparar usando métodos que se presentan en el Ejemplo 3 mencionado anteriormente.

Se encontró que un número de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante tenían una tasa de disociación de proteína de fusión hCD80-mIg que es aproximadamente igual a o mayor que la tasa de disociación de la proteína de fusión Orenicia® del mismo ligando (los datos no se muestran). Se encontró que algunas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante tienen una tasa de asociación a hCD80-mIg aproximadamente igual o mayor que la tasa de asociación de la proteína de fusión Orenicia® al mismo ligando (los datos no se muestran).

Muchas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 4 presentaban constantes de disociación en equilibrio (K_D) de hCD80-mIg que eran menores que la constante de disociación en equilibrio de hCD80-mIg de proteína de fusión CTLA-4-IgG2 humano u Orenicia®. Además, varias proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 4 presentaban constantes de disociación en equilibrio de hCD80-mIg que eran al menos aproximadamente iguales a la constante de equilibrio de hCD80-mIg de LEA29Y-Ig.

Muchas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 4 presentaban capacidades de avidéz de unión hacia hCD80-mIg que son mayores que las capacidades de avidéz de unión de proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 humano u Orenicia® para el mismo ligando (el factor de mejora en la avidéz de unión de hCD80-mIg con respecto a la proteína de fusión Orenicia® se muestra en la 4ª columna). Además, varias proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 4 presentaban capacidades de avidéz de unión para hCD80-mIg que son al menos aproximadamente iguales a la avidéz de unión de LEA29Y-Ig para el mismo ligando.

Un CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento que tiene una avidéz de unión mayor con respecto al hCD80-mIg que la de la proteína de fusión de hCTLA-4-IgG1, Orenicia®, o LEA29Y-Ig probablemente tendrá un aumento de la potencia inmunosupresora *in vivo* en comparación con la proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2, Orenicia®, o LEA29Y-Ig, respectivamente, tal como, por ejemplo, en métodos terapéuticos y/o profilácticos para suprimir una respuesta inmunológica en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunológico de mamíferos, tal como por ejemplo, seres humanos, en los que la inmunoinhibición o inmunosupresión es deseable), métodos para inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano), y otros métodos que se describen en cualquier parte en el presente documento.

Tabla 4.

ES 2 688 721 T3

Proteína de Fusión (dímero)	SEQ ID NO* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	K _D de hCD80-mIg (M)	Avidéz de Unión hacia hCD80-mIg (Con respecto al dímero de proteína de fusión Orencia®)
hCTLA-4-IgG2	162	$6,55 \times 10^{-10}$	1,34x
Dímero de proteína de fusión Orencia®	164	$8,77 \times 10^{-10}$	1
LEA29Y-Ig	166	$4,39 \times 10^{-10} - 2,19 \times 10^{-10}$	2x - 4x
D1-IgG2	58	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D1T-IgG2	59	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D2-IgG2	60	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-IgG2	61	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D4-IgG2	62	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D5-IgG2	63	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D6-IgG2	64	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D20-IgG2	65	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D21-IgG2	66	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D23-IgG2	67	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D24-IgG2	68	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D26-IgG2	69	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D27-IgG2	70	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D28-IgG2	71	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D29-IgG2	72	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D31-IgG2	73	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-1-IgG2	1	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-2-IgG2	2	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-3-IgG2	3	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-4-IgG2	4	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-5-IgG2	5	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-6-IgG2	6	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-7-IgG2	7	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-8-IgG2	8	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-9-IgG2	9	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x

ES 2 688 721 T3

D3-11-IgG2	10	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-12-IgG2	11	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-14-IgG2	12	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-15-IgG2	13	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-16-IgG2	14	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-17-IgG2	15	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-19-IgG2	16	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-20-IgG2	17	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-21-IgG2	18	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-22-IgG2	19	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-23-IgG2	20	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-24-IgG2	21	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-25-IgG2	22	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-26-IgG2	23	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-27-IgG2	24	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-28-IgG2	25	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-29-IgG2	26	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-30-IgG2	27	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-31-IgG2	28	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-32-IgG2	29	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-33-IgG2	30	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-34-IgG2	31	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-39-IgG2	32	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-50-IgG2	33	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-52-IgG2	34	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-53-IgG2	35	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-54-IgG2	36	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-56-IgG2	38	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	0,5x - 2x
D3-62-IgG2	44	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x
D3-65-IgG2	47	$< 4,39 \times 10^{-10}$	> 2x

D3-66-IgG2	48	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-69-IgG2	50	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-70-IgG2	51	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-71-IgG2	52	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-72-IgG2	53	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-73-IgG2	54	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-74-IgG2	55	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-75-IgG2	56	$< 4,39 \times 10^{-10}$	$> 2x$
D3-76-IgG2	57	$1,75 \times 10^{-9} - 4,39 \times 10^{-10}$	$0,5x - 2x$

* Nota: Las SEQ ID NOS que se muestran en la Tabla 4 para proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 humano, Orenzia®, y LEA29Y-Ig son las de las secuencias de polipéptidos de estas proteínas de fusión, respectivamente. La SEQ ID NO que se muestra en la Tabla 4 para cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante identifica la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante de la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante identificada. Los datos pertenecen a un CTLA-4-Ig mutante que comprende un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-48 y 58-73) fusionado en su extremo N-terminal al extremo C-terminal del polipéptido de Fc de IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 184 o 218. Sin embargo, los inventores han encontrado experimentalmente mediante análisis de LCMS que un CTLA-4-Ig mutante preparado en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de Fc de hIgG2 predicho que se muestra en la SEQ ID NO: 184 por lo general no incluye el resto de lisina (K) C-terminal predicho; de ese modo, la secuencia de polipéptidos de Fc de hIgG2 de un CTLA-4-IgG2 mutante es la que se muestra en la SEQ ID NO: 218, secuencia de polipéptidos de Fc de hIgG2 no incluye generalmente el resto de lisina C-terminal en comparación con la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 184. Las secuencias de proteínas de fusión a modo de ejemplo que no incluyen el resto de lisina C-terminal se muestran en las SEQ ID NOS: 205-214, 219, y 221.

Ensayos Cinéticos Monoméricos.

5 La confirmación adicional de las propiedades de unión de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante se obtuvo mediante ensayos de unión cinéticos monovalentes. Estos ensayos miden la cinética de unión de una proteína de ensayo divalente (por ejemplo, una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante dimérica) revestida sobre chips de sensor y ligando monovalente (hCD86-mIg digerido con papaína) en la fase móvil. El anticuerpo de IgG anti-humana de cabra (Jackson ImmunoResearch, N.º 109-005-098) se acopló con chips de sensor de CM5 de acuerdo con los protocolos del fabricante, proporcionando generalmente 15.000 unidades de respuesta (UR). El ligando se capturó por incubación de chips descensos revestidos con anticuerpo con 10 µl de una solución de 2 µg/ml de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante diméricas en tampón HBS-EP a un caudal de 10 µl/min. Los niveles de captura de ligando generalmente eran de 25-80 UR. Los ligandos de hCD86-mIg monoméricos (creados mediante digestión con papaína y adsorción de proteína-A sepharose de hCD86-mIg, como se describe en Hermanson, G.T. BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, 1996) se diluyeron en tampón HBS-EP influyeron a través de chips de sensor revestidos con proteína de ensayo durante 2 min a 30 µl/min, seguido de 2 min de incubación con tampón HBS-EP que no contenía proteína al mismo caudal. La regeneración entre ciclos se realizó mediante incubación durante 3 min con tampón de glicina 10 mM (pH 1,7) a 30 µl/min. Generalmente, 8 diluciones de proteínas de analito monomérico que variaban de 3000 nM a 0,2 nM se analizaron contra un blanco de referencia (solo tampón HBS-EP) por duplicado. Los niveles de la señal de R_{máx} para unión a proteínas de CTLA-4-Ig mutante variaron de 10-60 UR.

25 Para análisis cinético, los datos de ensayos de unión monoméricos se seleccionaron como se ha descrito anteriormente excepto porque la selección de datos de asociación comenzó y terminó 5 s desde los tiempos de inicio y parada de inyección, y la selección de datos de disociación comenzó 5 s después del tiempo de parada de inyección, y generalmente incluía 1-60 s del periodo de disociación. Tales datos también se analizaron para afinidades de equilibrio en estado estacionario usando el software BIAevaluation. Se hizo un promedio de los niveles de unión en estado estacionario para cada concentración (valores de Respuesta_{eq} ("Req")) con respecto a un intervalo de 5-20 s cerca del final de la inyección demuestra usando la función "Ajuste general: promedio" de BIAevaluation. La afinidad del estado estacionario se determinó a partir de representación de Req con respecto a la concentración usando el software BIAevaluation de acuerdo con la fórmula $Req = K_A \times C \times R_{máx} / (K_A \times C \times n + 1)$, en la que C es la concentración de analito y n, el factor de interferencia estérica, es 1, si $K_D = 1 / K_A$. En algunos casos, se observó la unión no específica sustancial, representada por una traza de valor R plano residual después de disociación. Tales datos se corrigieron restando los valores de R residual de los valores de Req. A continuación la K_D se calculó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) usando el modelo de "unión específica de un sitio".

Este ensayo de unión monomérico se realizó en un subconjunto de proteínas de CTLA-4-Ig mutante representativo y

los resultados se resumen en la Tabla 5. En general, el grado de mejora en la unión de ECD de hCD86 a proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante con respecto a LEA29Y-Ig observado en los ensayos de unión monomérica era similar al observado para la unión de hCD86-mIg a proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante con respecto a LEA29Y-Ig en los ensayos genéticos convencionales. Tal los resultados apoyan la conclusión de que las mejoras observadas en cinética de unión para las proteínas mutantes se deben a mejoras reales en las afinidades de unión de las proteínas mutantes (por ejemplo, en comparación con las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig) and Y no se deben a artefactos potenciales causados por una valencia más elevada de las preparaciones de proteína agregada.

Tabla 5.

Proteína de Fusión (dímero)	SEQ ID NO* (por ejemplo, de ECD de CTLA-4 mutante)	K _D de ECD de hCD86 monomérico (M)	Afinidad de Unión hacia ECD de hCD86 Monomérico (Con respecto a LEA29Y-Ig)
LEA29Y-Ig	166	1,68 x 10 ⁻⁶	1
D3-IgG2	61	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-4-IgG2	4	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-11-IgG2	10	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-12-IgG2	11	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-14-IgG2	12	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-17-IgG2	15	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-20-IgG2	17	8,4 x 10 ⁻⁷ - 3,36 x 10 ⁻⁷	2x-5x
D3-27-IgG2	24	8,4 x 10 ⁻⁷ - 3,36 x 10 ⁻⁷	2x-5x
D3-29-IgG2	26	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-31-IgG2	28	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x
D3-53-IgG2	35	< 3,36 x 10 ⁻⁷	> 5x

*Nota: La SEQ ID NO que se muestra en la Tabla 5 para LEA29Y-Ig es la de la secuencia de polipéptidos de la proteína de fusión de LEA29Y-Ig. La SEQ ID NO que se muestra en la Tabla 5 para cada proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante identifica la secuencia de polipéptidos del ECD de CTLA-4 mutante presente en la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante identificada. Los datos pertenecen a un CTLA-4-Ig mutante que comprende un ECD de CTLA-4 mutante (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOS: 4, 10-12, 15, 17, 24, 26, 28, 35, y 61) fusionado en su extremo N-terminal al extremo C-terminal del polipéptido de Fc de IgG2 que se muestra en la SEQ ID NO: 184 o 218. Sin embargo, los inventores han encontrado por vía experimental mediante análisis de LCMS que un CTLA-4-Ig mutante preparado en células CHO usando un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de Fc de hIgG2 predicho que se muestra en la SEQ ID NO: 184 por lo general no incluye el resto de lisina (K) C-terminal predicho; de ese modo, la secuencia de polipéptidos de Fc de hIgG2 de un CTLA-4-IgG2 mutante es la que se muestra en la SEQ ID NO: 208, secuencia de polipéptidos de Fc de hIgG2 que por lo general no incluye el resto de lisina C-terminal en comparación con la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 184. Las secuencias de proteína de fusión a modo de ejemplo que no incluyen el resto de lisina C-terminal se muestran en las SEQ ID NOS: 205-214, 219, y 221. Las secuencias de proteína de fusión a modo de ejemplo que incluyen el resto de lisina C-terminal se muestran en las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 220, y 222.

Ejemplo 5

Medición de la Actividad Biológica de Mutantes de CTLA-4 usando Ensayos de Proliferación de PBMC Humanas (Estimulación de Anticuerpo Anti-CD3).

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

La sangre humana (recién recogida de un programa donante) se diluyó con un volumen igual de PBS y se fraccionó para aislar las PBMC usando un gradiente de Ficoll Histopaque (Sigma, N.º 10771) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las PBMC se diluyeron en Medio de Crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, N.º 10565-018) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone N.º SV30014.03) y 1x de PSG (Invitrogen, N.º 10378-016) y se añadió a placas de cultivo de 96 pocillos (BD Biosciences, N.º 353077) a una densidad de 1 x 10⁵ células/pocillo. Los compuestos de ensayo se diluyeron en serie en Medio de Crecimiento y se añadieron a pocillos por triplicado. La proliferación celular comenzó mediante la adición de anticuerpo de ratón anti-CD3 humano (BD Pharmingen: 555329) hasta una concentración final de 5 µg/ml. Después de incubación a 37 °C durante 2 días (d), timidina ³H (GE Healthcare, N.º TRK758-5MCI) se añadió a 1 µCi/pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo adicional de 16 h. Las células se cosecharon con un cosechador celular (Cosechador FilterMate

Omnifilter-96) usando condiciones recomendadas por el fabricante y se midió para incorporación de timidina ^3H usando un contador de centelleo (Wallac Trilux, N.º 1450-421). El grado de incorporación de timidina ^3H (absorción de timidina ^3H) es indicativo del grado de proliferación de linfocitos T. La incorporación de timidina ^3H se mide mediante técnicas convencionales. La proliferación de linfocitos T se expresa como la media de recuentos por minuto (cpm) de pocillos por triplicado.

Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando un modelo de ajuste de curva de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea, pendiente variable) y el método de ajuste por mínimos cuadrados. Los parámetros de CI50 (también conocida como CI_{50}) y sus intervalos de confianza de un 95 % asociados se indican (Tabla 6). La Figura 6 muestra curvas de proliferación celular de un ensayo de proliferación de PBMC representativo (usando estimulación con anticuerpo anti-CD3) que implica un conjunto de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo - es decir, proteínas de fusión de D3-04-IgG2, D3-11-IgG2, D3-12-IgG2, y D3-14-IgG2. El gráfico es una representación de incorporación de timidina ^3H (recuentos por minuto (cpm)) con respecto a la concentración de proteína (nanoMolar (nM)). La incorporación de timidina ^3H (absorción de timidina ^3H), que es indicativo del grado de proliferación celular, se mide mediante técnicas convencionales.

Las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación. Estos resultados demuestran que las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig Ig mutante de la invención tienen una potencia significativamente más elevada o mayor capacidad que la proteína de fusión(s) Orenicia® y/o LEA29Y-Ig en la inhibición o supresión de activación de linfocitos T policlonales o proliferación de los linfocitos T *in vitro*.

El ensayo de proliferación de PBMC se realizó usando otras proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante. La Tabla 6 proporciona un resumen de los datos de un conjunto representativo de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante. La Tabla 6 presenta comparaciones de valores medios de CI50 (nanomolar (nM)) para proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplos con respecto a controles (proteínas de fusión Orenicia®, hCTLA-4-IgG2, y LEA29Y-Ig) en el ensayo de proliferación de PBMC (con estimulación con anticuerpo anti-CD3). Un valor de CI50 representa la concentración de un compuesto (por ejemplo, proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante, hCTLA-4-IgG2, Orenicia®, o LEA29Y-Ig) que se requiere para una inhibición de un 50 % de la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Se hizo el promedio de los valores de CI50 de experimentos individuales para proporcionar valores medios de CI50, que se usaron con fines estadísticos. Un ANOVA de una vía con ensayo de Dunnett o Bonferroni *a posteriori* se usó para comparar proteínas de fusión de CLTA-4-Ig mutante y hCTLA-4-IgG2 con respecto a la proteína de fusión Orenicia® o LEA29Y-Ig, respectivamente (C.W. Dunnett, *New Tables for Multiple Comparisons with a Control*, Biometrics 20 (3): 482-491 (Sept. 1964); Abdi, Herve, "The Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons", en *ENCYCLOPEDIA OF MEASUREMENT AND STATISTICS* (N.J. Salkind ed., Thousand Oaks, CA 2007); también disponible en la página web mundial en la dirección web utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf). El análisis estadístico de la proteína de fusión de Ig formada por uno de los siguientes polipéptidos de ECD de CTLA-4 mutante - clones D24, D3-07, D3-15 y D3-16 - no se realizó como $n = 1$. El término "DT (CI50 log media)" representa la desviación estándar en valores de CI50 log media.

Tabla 6. Sumario de Datos De Ensayos de Proliferación de PBMC a Modo de Ejemplo Usando Estimulación de Anticuerpo Anti-CD3

Proteína de Fusión (dímero)	CI50 Media (nM)	CI50 Log Media (nM)	DT (CI50 Log Media) (nM)
Dímero de proteína de fusión Orenicia®	5,16	0,71	0,51
hCTLA-4-IgG2	8,46	0,93	0,43
LEA29Y-Ig	0,48 ¹	-0,32	0,54
D3-4-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,27	0,45
D3-7-IgG2	0,12	-0,93	ND
D3-11-IgG2	0,08 ^{1,2}	-1,07	0,40
D3-12-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,27	0,17
D3-14-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,17	0,15
D3-15-IgG2	0,21	-0,69	ND
D3-17-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,36	0,37
D3-20-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,19	0,37
D3-26-IgG2	0,15 ¹	-0,83	0,49
D3-27-IgG2	0,10 ^{1,2}	-1,00	0,41
D3-29-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,13	0,53
D3-30-IgG2	0,18 ¹	-0,74	0,35
D3-31-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,42	0,25
D3-32-IgG2	0,10 ¹	-1,00	0,47

D3-33-IgG2	0,12 ¹	-0,94	0,69
D3-34-IgG2	0,41 ¹	-0,39	0,18
D3-39-IgG2	0,47 ¹	-0,33	0,21
D3-50-IgG2	0,35 ¹	-0,46	0,23
D3-52-IgG2	0,49 ¹	-0,31	0,20
D3-53-IgG2	0,02 ^{1,2}	-1,69	0,24
D3-54-IgG2	0,17 ¹	-0,77	0,22
D3-56-IgG2	0,08 ¹	-1,08	0,20
D3-62-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,29	0,23
D3-69-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,34	0,19
D3-70-IgG2	0,08 ¹	-1,10	0,10
D3-71-IgG2	0,05	-1,32	ND
D3-72-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,54	0,19
D3-73-IgG2	0,23 ¹	-0,64	0,25
D3-75-IgG2	0,08 ¹	-1,11	0,33
D3-76-IgG2	0,13 ¹	-0,88	0,36
D3-IgG2	0,14 ¹	-0,85	0,13
D24-IgG2	0,12	-0,93	ND

Los superíndices que se muestran en la Tabla 6 son como sigue a continuación: ¹Estadísticamente diferente a Orenca con $p < 0,05$, como se determina mediante ANOVA de 1 vía con ensayo de Dunnett *a posteriori*. ²Estadísticamente diferente a LEA con $p < 0,05$, como se determina mediante ANOVA de 1 vía con ensayo de Bonferroni *a posteriori*. Las proteínas de fusión que comprenden los ECD de CTLA-4 de D3-7, D3-15, D3-71 y D24 mutantes se sometieron a ensayo una vez y por lo tanto no se pudo realizar comparación estadística. Nota: El término "ND" en la Tabla 6 significa "no disponible".

El análisis estadístico desveló que todas las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se sometieron a ensayo en al menos dos ensayos separados y se designaron con el superíndice (1) (véase la Tabla 6) eran estadísticamente superiores en potencia a las proteínas de fusión Orenca® y hCTLA-4-IgG2 ($p < 0,05$) (es decir, tienen una capacidad mayor para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de PBMC *in vitro* que las proteínas de fusión Orenca® y hCTLA-4-IgG2). Las designadas con el superíndice (2) (véase la Tabla 6) también eran estadísticamente superiores en potencia a la proteína de fusión de LEA29Y-Ig ($p < 0,05$) (es decir, tienen una capacidad mayor para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de PBMC *in vitro* que la proteína de fusión de LEA29Y-Ig), como se determina mediante ANOVA de una vía con ensayos de Dunnett y Bonferroni *a posteriori* que se han discutido anteriormente. No había diferencia estadística entre proteínas de fusión de CTLA-4 Humano que comprenden cualquiera del Fc de IgG1 modificado (como en Orenca®) o el Fc de IgG2 de tipo silvestre (como en hCTLA4-IgG2). Este hallazgo implica que las diferencias en actividades funcionales que se muestran en la Tabla 6 entre las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante (cada una de las cuales comprende un Fc de IgG2 humano) y cualquiera de Orenca® o hCTLA4-IgG2 se producían como consecuencia directa de cambios de aminoácido (es decir, sustituciones de aminoácido) realizadas en la región de ECD de CTLA-4. Las diferencias en actividades funcionales entre estas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante y, por ejemplo, Orenca® (que comprende un Fc de IgG1 modificado) no se debían a diferencias en sus respectivas secuencias de polipéptidos de Fc de Ig.

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

Aplicando los mismos análisis estadísticos, los inventores no encontraron diferencia estadística entre la proteína de fusión Orenca® (que comprende IgG1 de ECD de CTLA-4 mutante humano) y CTLA-4-IgG2 humano. Por lo tanto, se cree que las diferencias entre los dominios de Ig de estas moléculas (es decir, la IgG1 mutante de la proteína de

fusión Orenzia® y la IgG2 humana de hCTLA-4-IgG2) no influyen en la funcionalidad de estas moléculas. Véase la Figura 11. A inhibición de la proliferación observada con dosis crecientes de la proteína de fusión Orenzia® no era significativamente diferente de la observada con CTLA-4-IgG2, lo que indica que sus respectivas actividades inmunosupresoras no están sesgadas de acuerdo con sus diferentes isotipos de IgG, sino que en su lugar resultan

- 5 de sus polipéptidos de ECD de hCTLA-4. Por lo tanto, las diferentes actividades inmunosupresoras entre polipéptidos de CTLA-4-Ig mutante que se desvelan en el presente documento y la proteína de fusión Orenzia® (o LEA29Y-Ig, ya que contiene la misma Ig que en la proteína Orenzia®) no se pueden atribuir a sus respectivas regiones de Fc que comprenden diferentes isotipos de IgG.
- 10 La divulgación incluye proteínas de ECD de CTLA-4 mutante monomérico que tienen una capacidad y, en algunos casos, una capacidad más elevada para suprimir o inhibir activación o proliferación de linfocitos T que una proteína CTLA-4 humana monomérica o a un dominio extracelular de las mismas. También se proporcionan proteínas de fusión de ECD de CTLA-4 mutante monoméricas que tienen una capacidad y, en algunos casos, una capacidad más elevada para suprimir o inhibir activación o proliferación de linfocitos T que una proteína de fusión de hCTLA-4 Ig
- 15 monomérica o a un dominio extracelular de las mismas. También se incluyen dímeros de proteína de ECD de CTLA-4 mutante que tienen una capacidad y, en algunos casos, una capacidad más elevada para suprimir o inhibir activación o proliferación de linfocitos T que un dímero que comprende dos dominios extracelulares de CTLA-4 humano. Algunos dímeros de proteína de fusión de ECD de CTLA-4 mutante que se desvelan en el presente documento (por ejemplo, dímeros de proteína de fusión de CTLA-4-ECD-Ig mutante) tienen una capacidad y, en
- 20 algunos casos, una capacidad más elevada para suprimir o inhibir activación o proliferación de linfocitos T que un dímero de proteína de fusión de hCTLA-4-IgG2, dímero de proteína de fusión Orenzia®, y/o dímero de proteína de fusión de LEA29YIg.

Ejemplo 6

- 25 Medición de Actividad Biológica de Moléculas de CTLA-4-Ig Mutante Usando Ensayos de Proliferación de Linfocitos T CD4⁺ Humanos.

Se ha mostrado que el CTLA-4 humano-Ig y variantes particulares del mismo inhiben la proliferación de los linfocitos T bloqueando la señalización de CD80 y CD86 a través de CD28 (Linsley P.S., Immunity 1: 793-801 (1994); Larson C. P. *et al.*, Am. J. Transplant. 5: 443-453 (2005)). Dado que las proteínas de CTLA-4-Ig mutante que se desvelan en el presente documento presentan una mejora de la avidéz de unión para el ligando CD86-Ig, un ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺ se desarrolló para medir la actividad de las proteínas de CTLA-4-Ig mutante bloqueando la señalización a través de CD86.

- 35 *Creación de Secuencia de ADN que Codifica una Proteína CD86 Humana de Longitud Completa.*

El pCDNA3.1 hB7.2 FL plásmido se creó para codificar la proteína CD86 humana de longitud completa para expresión en la superficie de células transfectadas. El ADN que codifica CD86 humano se generó mediante

40 amplificación por PCR de ADNc obtenido a partir de leucocitos humanos (BD Biosciences, N.º de Cat HL4050AH) usando cebadores de oligonucleótido directo e inverso diseñados basándose en homología de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CD86 que se presenta en la SEQ ID NO: 176. Los cebadores se diseñaron, prepararon, y ensamblaron usando técnicas convencionales bien conocidas por las personas con una experiencia habitual en la materia e incluían codones de parada e inicio y sitios de restricción si fuera necesario. En

45 la técnica también se conocen bien los procedimientos de amplificación de PCR usados. Tales técnicas se describen en, por ejemplo, Berger, Ausubel, y Sambrook, todos mencionados anteriormente. Como molde se usaron 50 nanogramos (ng) de ADNc en una reacción de PCR de 100 µl con cebadores directo e inverso 1 µM, tampón de Polimerasa Herculase (Stratagene; N.º 600260) y dNTPs 200 µM para 30 ciclos de amplificación (94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 60 s). El producto de PCR se purificó en Columnas de Centrifugación de PCR QiaQuick (Qiagen N.º 28106) y se digiere con enzimas de restricción *KpnI* y *NotI*. Los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificaron usando el Kit de Extracción en Gel Qiaquick (Qiagen, N.º 28704) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y se ligaron en plásmido pCDNA 3.1(+) (Invitrogen, N.º de Cat. V790-20) digerido del mismo modo. Las ligaduras se transformaron en células TOP10 de *E. coli* (Qiagen, N.º de Cat. C4040-10) de acuerdo con las recomendaciones del fabricantes. Las células transformadas se incubaron en LB (medio de caldo de

50 cultivo de Luria) que contenía 50 µg/ml de carbenicilina a 250 rpm durante una noche a 37 °C y a continuación se usó para preparar una solución de reserva maxiprep (Qiagen; N.º 12362) de ADN de plásmido de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

- 60 La secuencia de aminoácidos predicha de la proteína CD86 humana de longitud completa se muestra en la SEQ ID NO: 175. En esta secuencia, los restos de aminoácido 1-23 comprenden la secuencia señal predicha, los restos de aminoácido 24-241 comprenden el dominio extracelular de CD86 humano, los restos de aminoácido 242-270 comprenden el dominio transmembrana, y los restos de aminoácido 271-329 comprenden el dominio citoplasmático.

Creación de Líneas Celulares Estables que Expresan CD86 Humano en la Superficie Celular.

- 65 Las células HEK293 se cultivaron hasta una confluencia de un 80-90 % en matraces T-75 que contenían 20 ml de

Medio de Crecimiento (medio DMEM/F12 (Invitrogen, N.º de Cat. 10565-018) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone Cat. N.º SV30014,03) y 1x de PSG (Invitrogen, N.º de Cat. 10378-016)). Las células se transfectaron con 10 µg de ADN plásmido (pCDNA3.1 hB7.2 FL) mezclado con 60 µl de Fugene 6 (ROCHE, N.º 11814443001) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las células se incubaron durante 2 días (d) a 37 °C en Medio de Crecimiento y se incubaron adicionalmente durante 10 d a 37 °C en Medio de Selección (Medio de Crecimiento que contenía 300 µg/ml de Geneticina (Invitrogen, N.º 10131-027), cambiando el medio cada 2 d. Para permitir la separación de FACS, las células transfectadas se tiñeron con anticuerpo anti-CD86 etiquetado con FITC (BD Biosciences, N.º 555) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Usando un separador celular (Dako, MoFlo) seleccionado para señal de FITC, las células positivas para CD86 se separaron individualmente en placas de cultivo de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, N.º CLS-3596) que contenían 200 µl/pocillo de Medio de Crecimiento que contenía Medio Acondicionado al 25 % (Medio de Crecimiento cosechado previamente a partir de cultivos de células sin transfectar (o sin tratamiento previo)). Después de incubación a 37 °C durante 13-19 d, las células se dispersaron mediante hidrólisis con tripsina y se transfirieron a placas de cultivo de 24 pocillos que contenían 0,5 ml/pocillo de Medio de Crecimiento. Después de incubación a 37 °C durante 7 d, las células se dispersaron mediante hidrólisis con tripsina y se transfirieron a matraces T-75 que contenían 20 ml de Medio de Crecimiento. Las líneas celulares finales se seleccionaron basándose en los altos niveles de expresión de CD86 de superficie celular tal como se mide mediante análisis de FACS de células teñidas con anticuerpo anti-CD86 etiquetado con FITC usando FACS Caliber (BD Biosciences), de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante.

Ensayos de Proliferación de linfocitos T CD4⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ se enriquecieron hasta > 96 % a partir de preparaciones de capa leucocítica humana (Stanford University Blood Center, Stanford, CA) usando el Kit de Selección positiva de CD4 Humano EasySep (StemCell Technologies, N.º 18052R) con un separador de células magnético (RoboSep, StemCell Technologies, N.º 20000) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los linfocitos T CD4⁺ enriquecidos se ajustaron hasta una densidad de 1 x 10⁶ células/ml en medio de Yssel (Gemini Bio-Products, N.º 400-102) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone SV30014,03) y se añadió a placas de cultivo tisular de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. Las células HEK293 que expresan CD86 humano unido a membrana se irradiaron a 6000 rads (Stanford Research Institute, Menlo Park, CA), ajustado a 1 x 10⁶ células/ml en el mismo medio y se añadió a las placas de cultivo a 50 µl/pocillo. Los compuestos de ensayo se diluyeron en serie en el mismo medio y se añadieron a pocillos por triplicado. La proliferación celular comenzó mediante la adición de anticuerpo CD3 de ratón anti-humano (BD Pharmingen: 555329) hasta una concentración final de 5 µg/ml. Después de incubación a 37 °C durante 3 d, se añadió timidina ³H (GE Healthcare, N.º TRK758-5MCI) a 1 µCi/pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo adicional de 18 h. Las células se cosecharon usando un cosechador celular (Perkin Elmer Filter Harvester D961962) y la timidina ³H se midió usando un contador de centelleo líquido (Wallac Trilux 1450) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando una ecuación de pendiente variable ($Y = \text{Parte Inferior} + (\text{Parte Superior} - \text{Parte Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogCI50} - X) \cdot (\text{HillSlope}))})$) para generar una CI50 para cada compuesto de ensayo. La expresión “(LogCI50-X)(HillSlope)” es un exponente en la ecuación.

La Figura 7 muestra curvas de proliferación celular de ensayos representativos de proliferación de linfocitos T CD4⁺ implican un conjunto a modo de ejemplo de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutantes - es decir, de D3-04-IgG2, D3-11-IgG2, D3-12-IgG2, y D3-14-IgG2. Las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación. El gráfico es una representación de incorporación de timidina ³H (cpm) con respecto a concentración (nM) de proteína. La incorporación de timidina ³H es indicativo del grado de proliferación celular y se mide mediante técnicas convencionales. Estos resultados demuestran que las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento tienen una potencia significativamente más elevada o mayor capacidad de las proteínas de fusión Orenicia® y/o LEA29Y-Ig en la inhibición o supresión de coestimulación de CD86 *in vitro*.

Este ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺ se realizó en un número de otras proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante. La Tabla 7 proporciona un sumario de los datos de un conjunto de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo. La Tabla 7 presenta comparaciones de valores medios de CI50 (nanomolar (nM)) para proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo con respecto a controles de referencia (proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig, y CTLA-4-IgG2 humano) usando el ensayo de proliferación de linfocitos T CD4⁺. Se hizo el promedio de las CI50 de experimentos individuales para proporcionar valores medios de CI50, que se usaron con fines estadísticos. El término “DT (CI50 log media)” representa la desviación estándar en valores de CI50 log media.

Tabla 7. Sumario de Datos De Ensayos de Proliferación de Linfocitos T CD4⁺ a Modo de Ejemplo

Proteína de Fusión (dímero)	CI50 Media (nM)	CI50 Log Media (nM)	DT (CI50 Log Media) (nM)
Dímero de proteína de fusión Orenicia®	1,56	0,19	0,22
hCTLA-4-IgG2	2,24	0,35	0,28

LEA29Y-Ig	0,21 ¹	-0,67	0,25
D3-02-IgG2	0,03	-1,56	ND
D3-03-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,40	0,11
D3-04-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,47	0,02
D3-06-IgG2	0,05 ¹	-1,32	0,03
D3-11-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,52	0,07
D3-12-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,45	0,09
D3-14-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,37	0,11
D3-15-IgG2	0,02 ^{1,2}	-1,62	0,08
D3-17-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,47	0,11
D3-20-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,40	0,11
D3-27-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,37	0,10
D3-29-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,36	0,13
D3-31-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,58	0,21
D3-34-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,28	0,13
D3-39-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,35	0,10
D3-50-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,23	0,24
D3-52-IgG2	0,07 ^{1,2}	-1,14	0,24
D3-53-IgG2	0,02 ^{1,2}	-1,70	0,25
D3-54-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,40	0,12
D3-56-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,41	0,07
D3-62-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,44	0,09
D3-65-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,26	0,14
D3-69-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,59	0,14
D3-70-IgG2	0,05 ^{1,2}	-1,30	0,06
D3-71-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,43	0,09
D3-72-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,48	0,05
D3-73-IgG2	0,06 ^{1,2}	-1,26	0,18
D3-75-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,51	0,12
D2-IgG2	0,03 ^{1,2}	-1,52	0,18
D3-IgG2	0,04 ^{1,2}	-1,45	0,17

Los superíndices que se muestran en la Tabla 7 son como sigue a continuación: ¹Estadísticamente diferente a Orenca con $p < 0,05$, como se determina mediante ANOVA de 1 vía con ensayo de Dunnett *a posteriori*.

²Estadísticamente diferente a LEA con $p < 0,05$, como se determina mediante ANOVA de 1 vía con ensayo de

5 Bonferroni *a posteriori*. La proteína de fusión que comprende el ECD de CTLA-4 mutante D3-02 se sometió a ensayo vez y por lo tanto no se pudo realizar comparación estadística.

El análisis estadístico desveló que todas las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se sometieron a ensayo en al menos dos ensayos separados y se designaron con el superíndice (1) (véase la Tabla 7) eran estadísticamente

10 superiores en potencia a las proteínas de fusión Orenca® y hCTLA-4-IgG2 ($p < 0,05$) (es decir, tienen una capacidad mayor para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de linfocitos T CD4⁺ *in vitro* que las

proteínas de fusión Orenca® y hCTLA-4-IgG2). Las designadas con el superíndice (2) (véase la Tabla 7) también eran estadísticamente superiores en potencia a la proteína de fusión de LEA29Y-Ig ($p < 0,05$) (es decir, tienen una

15 capacidad mayor para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T en ensayos de linfocitos T CD4⁺ *in vitro* que la proteína de fusión de LEA29Y-Ig), como se determina mediante ANOVA de una vía con ensayos de Dunnett y

Bonferroni *a posteriori* que se ha discutido anteriormente. No había diferencia estadística entre proteínas de fusión CTLA-4 humanas que comprenden cualquiera del Fc de IgG1 modificado (como en Orenca®) o el Fc de IgG2 de

20 tipo silvestre (como en hCTLA4-IgG2). Este hallazgo implica que las diferencias en actividades funcionales que se muestran en la Tabla 7 entre las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante (cada una de las cuales comprende un Fc de IgG2 humana) y cualquiera de Orenca® o hCTLA4-IgG2 se producían como consecuencia directa de cambios

de aminoácido (es decir, sustituciones de aminoácido) realizadas en la región de ECD de CTLA-4. Las diferencias en actividades funcionales entre estas proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante y, por ejemplo, Orenca® (que

comprende un Fc de IgG1 modificado) no se debían a diferencias en sus respectivas secuencias de polipéptidos de Fc de Ig.

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

Ejemplo 7

Medición de la Actividad Biológica de Moléculas de CTLA-4-Ig Mutante Usando Ensayos de Proliferación de PBMC Humanas (Estimulación de Antígeno de Recuerdo).

La activación de linfocitos T de memoria es un aspecto importante de la autoinmunidad (Rogers N.J., *et al.*, Eur. J. Immunol 35: 2909-2919 (2005)). Para medir la actividad inmunosupresora de proteínas CTLA-4-Ig mutante en este sentido, se desarrolló un ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando estimulación con antígeno PPD.

La sangre humana (recién recogida de un programa donante) se diluyó con un volumen igual de PBS y se fraccionó para aislar las PBMC usando un gradiente de Ficoll Histopaque (Sigma, N.º 10771) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las PBMC se diluyeron en medio RPMI (Sigma, N.º R8758) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone N.º SV30014,03) y 1x de PSG (penicilina, estreptomycin y glutamina) (Invitrogen, N.º 10378-016) y se añadieron a placas de cultivo de 96 pocillos (BD Biosciences, N.º 353077) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Los compuestos de ensayo se diluyeron en serie en el mismo medio y se añadieron a pocillos por cuadruplicado. La proliferación celular comenzó mediante la adición de antígeno de PPD (proteína purificada obtenida a partir de *Mycobacterium tuberculosis*, Mycos, N.º P-1000-001) hasta una concentración final de 5 µg/ml. Después de incubación a 37 °C durante 5 d, se añadió timidina ³H (GE Healthcare, N.º TRK758-5MCI) a 1 µCi/pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo adicional de 18 h. Las células se cosecharon con un cosechador celular (Cosechador FilterMate Omnifilter-96, Perkin Elmer) usando condiciones recomendadas por el fabricante y se midió para incorporación de timidina ³H usando un contador de centelleo (Wallac Trilux, N.º 1450-421). Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando un modelo de ajuste de curva de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea, pendiente variable) y el método de ajuste por mínimos cuadrados. Se informan los parámetros de CI50 (o "CI50") y sus intervalos de confianza de un 95 % asociados.

La Figura 8 muestra curvas de proliferación celular de ensayos de proliferación de PBMC representativos que implican un conjunto de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo- es decir, proteínas de fusión D3-IgG2, D3-12-IgG2, D3-17-IgG2, y D3-29-IgG2. Las proteínas de fusión Orencia® y LEA29Y-Ig se incluyeron como controles para comparación. El gráfico es una representación de incorporación de timidina ³H (cpm) con respecto a la concentración de proteína (nM). La incorporación de timidina ³H, que es indicativo del grado de proliferación celular, se mide mediante técnicas convencionales. Estos resultados demuestran que, en un aspecto, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento tienen una potencia significativamente más elevada que las proteínas Orencia® y/o LEA29Y-Ig en la inhibición o supresión de proliferación de linfocitos T de memoria *in vitro* (por ejemplo, las proteínas CTLA-4-Ig mutantes tienen una mayor capacidad que las proteínas Orencia® y/o LEA29Y-Ig en la inhibición o supresión de proliferación de linfocitos T de memoria *in vitro* en ensayos de proliferación de PBMC humanas (estimulación de antígeno de recuerdo)).

Este ensayo de proliferación de PBMC con estimulación con antígeno PPD se realizó en un número de otras proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante. La Tabla 8 proporciona un sumario de los datos de un conjunto de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo. La Tabla 8 presenta comparaciones de valores medios de CI50 (nanomolar (nM)) para proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo con respecto a controles de referencia (proteínas de fusión Orencia® y LEA29Y-Ig) usando el ensayo de proliferación de PBMC con estimulación con antígeno de recuerdo. Se hizo el promedio de los valores de CI50 de experimentos individuales para proporcionar valores de medios de CI50, que se usaron con fines estadísticos. El término "DT (CI50 log media)" representa la desviación estándar en valores de CI50 log media.

Tabla 8. Sumario de Datos De Ensayos de Proliferación de PBMC A Modo de Ejemplo Usando Estimulación con Antígeno PPD

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

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

Los análisis estadísticos desvelaron que todas las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante sometidas a ensayo eran estadísticamente superiores en potencia para proteínas de fusión tanto Orencea® como LEA29Y-Ig con $p < 0,05$, como se determina mediante ANOVA de 1 vía con ensayos de Dunnett y Bonferroni *a posteriori*, respectivamente, que se ha discutido anteriormente (por ejemplo, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad mayor que las proteínas de fusión Orencea® y/o LEA29Y-Ig en la inhibición o supresión de proliferación de linfocitos T de memoria *in vitro* en ensayos de proliferación de PBMC humanas (estimulación con antígeno de recuerdo)).

- 5
- 10 Se cree que dado el aumento de capacidades de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T de memoria (por ejemplo, linfocitos T de memoria humanos) en ensayos *in vitro* en comparación con las proteínas de fusión Orencea® y/o LEA29Y-Ig, tales proteínas mutantes también deberían presentar un aumento de las potencias inmunosupresoras en métodos o aplicaciones terapéuticos y/o profilácticos *in vivo* en comparación con las proteínas de fusión Orencea®, LEA29Y-Ig,
- 15 y/o CTLA-4-Ig humano (por ejemplo, CTLA-4-IgG2 humano). En un aspecto, se cree que las proteínas de CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento tienen una capacidad mayor para suprimir o inhibir la proliferación de linfocitos T de memoria (por ejemplo, linfocitos T de memoria humanos) en un método o aplicación *in vivo* en comparación con las proteínas de fusión Orencea®, LEA29Y-Ig, y/o CTLA-4-Ig humano (por ejemplo, CTLA-4-IgG2 humano), tal como en, por ejemplo, métodos terapéuticos y/o profilácticos para suprimir o inhibir una
- 20 respuesta inmunológica en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunológico en, por ejemplo, un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano), métodos para suprimir o inhibir el rechazo de un trasplante de tejido u órgano de un donante por un receptor (por ejemplo, por un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano), y/o otros métodos de tratamiento o diagnóstico que se describen en cualquier parte en el presente documento.

25

Ejemplo 8

Medición de la Actividad Biológica de Moléculas de CTLA-4-Ig Mutante Usando Ensayos de MLR (Reacción Linfocitaria Mixta) Humana.

30

CTLA-4-Ig y variantes del mismo son potentes inhibidores de alorrespuestas primarias *in vitro* (Vaughan, A. N. *et al.*, J. Immunol. 165: 3175-3181 (2000); Wallace P. M., *et al.*, Transplantation 58: 602-610 (1994)). Para medir la mejora de la actividad de proteínas de CTLA-4-Ig mutante en tales ensayos, se desarrolló un ensayo de proliferación celular de reacción linfocitaria mixta (MLR) humana.

35

La sangre humana (recién recogida de un programa donante humano) se diluyó con un volumen igual de PBS y se fraccionó para aislar las PBMC usando un gradiente de Ficoll Histopaque (Sigma, N.º 10771) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Las PBMC de un donante se diluyeron en medio RPMI (Sigma,

N.º R8758) suplementado con FBS al 10 % (Hyclone N.º SV30014,03) y 1x de PSG (Invitrogen, N.º 10378-016) y se añadió a placas de cultivo de 96 pocillos (BD Biosciences, N.º 353077) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Las PBMC de un talante diferente se irradiaron a 2500 rads, se diluyeron en el mismo medio se añadieron a las mismas placas a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Los compuestos de ensayo se diluyeron en serie en el mismo medio y se añadieron a pocillos por cuadruplicado. Después de incubación a 37 °C durante 5 d, la timidina ^3H (GE Healthcare, N.º TRK758-5MCI) se añadió a 1 μCi /pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo adicional de 18 h. Las células se cosecharon con un cosechador celular (Cosechador FilterMate Omnifilter-96 Harvester, Perkin Elmer) usando condiciones recomendadas por el fabricante y se midió para incorporación de timidina ^3H usando un contador de centelleo (Wallac Trilux, N.º 1450-421). Los datos de proliferación celular se analizaron con el software GraphPad Prism 5 usando un modelo de ajuste de curva de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea, pendiente variable) y el método de ajuste por mínimos cuadrados. Se informan los parámetros de CI50 y sus intervalos de confianza de un 95 % asociados.

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

Este ensayo de MLR se realizó se realizó en un número de otras proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se desvelan en el presente documento. La Tabla 9 proporciona un sumario de los datos de un conjunto de proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo. La Tabla 9 presenta comparaciones de valores medios de CI50 (nanomolar (nM)) para proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a modo de ejemplo con respecto a controles de referencia (proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig) en el ensayo de MLR. Se hizo el promedio de los valores de CI50 de los experimentos separados para proporcionar valores medios de CI50. El término "DT (CI50 log media)" representa la desviación estándar en valores de CI50 log media. Los valores medios de CI50 para las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante que se muestran en la Tabla 9 eran menores que los respectivos valores de CI50 media de las proteínas de fusión Orenicia® y LEA29Y-Ig.

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

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

En un aspecto, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante como se desvela en el presente documento tienen una potencia significativamente más elevada que las proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig, y/o CTLA-4-Ig humano (por ejemplo, CTLA-4-IgG2 humano) para inhibir o suprimir la aloestimulación primaria de linfocitos T *in vitro* (por ejemplo, las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante tienen una capacidad mayor para suprimir o inhibir la aloestimulación primaria de la proliferación de linfocitos T en un ensayo de MLR *in vitro* que las proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig, y/o CTLA-4-Ig humano). En un aspecto, se desvela un CTLA-4-Ig mutante como en el presente documento que se cree que tiene una capacidad mayor para suprimir o inhibir la aloestimulación primaria de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T humanos) en un método o aplicación *in vivo* en comparación con las proteínas de fusión Orenicia®, LEA29Y-Ig, y/o CTLA-4-Ig humano, tal como, por ejemplo, en un método terapéutico y/o profiláctico para suprimir o inhibir una respuesta inmunológica en un sujeto (por ejemplo, en el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos del sistema inmunológico en un mamífero, tal como por ejemplo, un ser humano), un método para suprimir o inhibir el rechazo de un trasplante de un tejido u órgano de un donante receptor (por ejemplo, por un mamífero, tal como por ejemplo, un ser humano), y/o otros métodos de tratamiento o diagnóstico que se describen en cualquier parte en el presente documento.

Tabla 9. Sumario de Datos De Ensayos de MLR A Modo de Ejemplo

Proteína de Fusión (dímero)	CI50 Media (nM)	CI50 Log Media (nM)	DT (CI50 Log Media) (nM)
fusión de Orenicia®		1,05	0,23
Dímero de proteína	12,53		

LEA29Y-Ig	0,92	-0,19	0,48
D3-IgG2	0,06	-1,26	ND
D3-12-IgG2	0,09	-1,11	0,34
D3-14-IgG2	0,08	-1,20	0,43
D3-17-IgG2	0,09	-1,15	0,43
D3-20-IgG2	0,14	-1,11	0,64
D3-27-IgG2	0,13	-1,29	0,86
D3-29-IgG2	0,11	-1,14	0,54
D3-34-IgG2	0,10	-1,09	0,39
D3-53-IgG2	0,02	-1,64	0,11
D3-54-IgG2	0,07	-1,13	ND
D3-56-IgG2	0,06	-1,23	ND
D3-69-IgG2	0,04	-1,41	ND
D3-71-IgG2	0,05	-1,32	ND
D3-75-IgG2	0,08	-1,11	ND
D3-76-IgG2	0,08	-1,11	ND

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

Ejemplo 9

Un paciente humano adulto que padece artritis reumatoide se puede tratar con una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble como sigue a continuación. Una composición farmacéutica que comprende a proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS) se prepara. Una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble a modo de ejemplo comprende dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas idénticas unidas en conjunto por uno o más enlaces disulfuro, en la que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-73 fusionadas en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG2 humano. Las proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen las que comprenden secuencias de polipéptidos que se presentan en cualquiera de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222. Tales proteínas de fusión por lo general se expresan en forma dimérica. La concentración de la proteína de fusión en la composición farmacéutica puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, y similares. Por ejemplo, la concentración de la proteína de fusión en la composición farmacéutica puede ser de aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, o 200 mg/ml. El pH de tal composición farmacéutica es aproximadamente de pH 4 a aproximadamente pH 10, incluyendo de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, preferentemente de aproximadamente pH 6,0 a pH 8,0, de aproximadamente 6,5 a pH 7,5, o de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0.

El tratamiento de la artritis reumatoide del paciente se realiza mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del CTLA-4-Ig mutante al paciente (por ejemplo, dosis eficaz) mediante inyección intravenosa o subcutánea. El sitio de inyección puede ser, por ejemplo, el brazo, torso, o pierna del paciente. La dosis eficaz del proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante administrada por lo general es, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente humano adulto, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg, de aproximadamente 0,01-3,0 mg/kg, de aproximadamente 0,05-2,5 mg/kg, de aproximadamente 0,1-2,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1-1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,01-0,05 mg/kg, de aproximadamente 0,5-1,5 mg/kg, de aproximadamente 1,0-4,0 mg/kg, de aproximadamente 1,0-3,0 mg/kg, de aproximadamente 1,0-2,0 mg/kg, que incluyen, pero no se limitan a, de aproximadamente 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,25 mg/ml, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, o 100 mg/kg de peso corporal del paciente se administra al paciente. Como alternativa, se puede usar una cantidad o dosis o intervalo de dosis eficaces que se describe en la sección de "Métodos" que se ha mencionado anteriormente. La dosis de la proteína de fusión a administrar se determina basándose en la potencia de la proteína de fusión y/o la gravedad de los síntomas o signos de artritis reumatoide del paciente. La cantidad total de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante administrada al paciente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, por lo general de aproximadamente 1 mg a

100 mg, de aproximadamente 10 mg a 100 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 75 mg, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg. El volumen de composición farmacéutica administrada al paciente se determina basándose en la concentración de proteína de fusión en la composición y la dosis de proteína de fusión a administrar. Para inyección subcutánea, por lo general se administran de uno a dos mililitros de la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión por inyección. Para inyección intravenosa, se puede administrar un volumen apropiado de la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión.

Después de inyección de la dosis inicial, una segunda dosis idéntica de la proteína de fusión se puede administrar al paciente por vía subcutánea (por ejemplo, inyección s.c.) o por vía intravenosa (por ejemplo, inyección i.v.) a, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 semanas después de la dosis inicial. El programa de dosificación puede ser una dosis cada dos semanas, una dosis/mes, una dosis cada dos meses, etc. dependiendo, por ejemplo, del estado del paciente. Si fuera necesario, se pueden administrar dosis posteriores cada cuatro semanas o con más o menos frecuencia. La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo del estado del paciente y puede depender de la gravedad de los síntomas o signos de artritis reumatoide del paciente.

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

En otro aspecto a modo de ejemplo, una cantidad de una composición farmacéutica que comprende un dímero de proteína de fusión de CTLA-4-Ig (tal como D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, etc.) y un excipiente farmacéuticamente aceptable suficiente para proporcionar una dosis del dímero de proteína de fusión de aproximadamente 10 mg/kg se administra por vía intravenosa a un ser humano que padece artritis reumatoide una vez a la semana o una vez al mes, según sea necesario, dependiendo del estado del paciente y de la respuesta al fármaco. Para una administración de ese tipo se pueden usar procedimientos i.v. convencionales. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede infundir en el ser humano con otro fluido, tal como una solución salina estéril, solución de dextrosa, u otra solución isotónica, usando un goteo intravenoso continuo convencional a través de un dispositivo de acceso intravenoso convencional.

Se espera que cada método de tratamiento que se ha descrito anteriormente mediante inyección s.c. o i.v. se espera que reduzca o alivie uno o más signos, síntomas, o respuestas biológicas asociados con la artritis reumatoide, tales como, por ejemplo, inflamación, sensibilidad de articulación, hinchazón de articulación, dolor, atrofia tisular, y rigidez, en el paciente. Un tratamiento de ese tipo puede reducir la progresión adicional de la enfermedad en el paciente, particularmente en los tejidos conectivo, muscular, y esquelético. Por ejemplo, un tratamiento de ese tipo puede reducir la progresión del daño o deterioro del tejido conectivo, atrofia muscular de tejido, hueso, articulaciones, cartílago, y/o columna vertebral con el similar en el paciente. Los síntomas clínicos adicionales de la enfermedad, incluyendo el daño causado a la piel, sistema nervioso central u órganos, también se puede reducir o aliviar. Un tratamiento de ese tipo también puede mejorar el funcionamiento físico del paciente.

Ejemplo 10

Un paciente humano adulto sometido a terapia de mantenimiento para prevención del rechazo al trasplante de órgano se puede tratar con una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble como sigue a continuación. Se prepara una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, PBS o similar). Una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante soluble a modo de ejemplo comprende dos proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante monoméricas idénticas unidas en conjunto por uno o más enlaces disulfuro, en la que cada una de tales proteínas de fusión monoméricas comprende un polipéptido de ECD de CTLA-4 mutante que comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-73 fusionada en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un polipéptido de Fc de IgG2 humano. Las proteínas de fusión a modo de ejemplo incluyen las que comprenden secuencias de polipéptidos que se presentan en cualquiera de las SEQ ID NOS: 74-79, 197-200, 205-214, y 219-222. La concentración de la proteína de fusión en la composición farmacéutica puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, y similares. Por ejemplo, la concentración de la proteína de fusión en la composición farmacéutica puede ser de aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, o 200 mg/ml. El pH de tal composición farmacéutica es aproximadamente de pH 4 a aproximadamente pH 10, incluyendo de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 6,0 a pH 8,0, de aproximadamente 6,5 a pH 7,5, o de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,0.

La terapia de mantenimiento para prevención o supresión de rechazo al trasplante de órgano se realiza mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del CTLA-4-Ig mutante al paciente (por ejemplo, dosis eficaz) que ha recibido un trasplante de órgano (por ejemplo, trasplante de riñón) mediante inyección intravenosa o subcutánea. El sitio de inyección puede ser, por ejemplo, el brazo, torso, o pierna del paciente. La dosis eficaz del

5 proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante administrada por lo general es, pero no se limita a, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente humano adulto, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg, de aproximadamente 0,01-3,0 mg/kg, de aproximadamente 0,05-2,5 mg/kg, de aproximadamente 0,1-2,0 mg/kg, de aproximadamente 0,1-1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,01-0,05 mg/kg, de aproximadamente 0,5-1,5 mg/kg, de aproximadamente 1,0-4,0 mg/kg, de aproximadamente 1,0-3,0 mg/kg, de aproximadamente 1,0-2,0 mg/kg, que incluyen, pero no se limitan a, de aproximadamente 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 1,25 mg/ml, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, o 100 mg/kg de peso corporal del paciente se administra al paciente. Como alternativa, una cantidad o

10 dosis o intervalo de dosis eficaces que se describe en la sección de "Métodos" que se ha mencionado anteriormente se puede usar. La dosis de la proteína de fusión a administrar se determina basándose en la potencia de la proteína de fusión y/o la gravedad de los síntomas o signos de rechazo al trasplante de órgano del paciente. La cantidad total de proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante administrada al paciente puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, por lo general de aproximadamente 1 mg a 100 mg, de aproximadamente 10 mg a 100 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 75 mg, o de aproximadamente 10 a

15 aproximadamente 50 mg. El volumen de composición farmacéutica administrado al paciente se determina basándose en la concentración de proteína de fusión en la composición y la dosis de proteína de fusión a administrar. La proteína de fusión se puede administrar cualquier día después del trasplante, por ejemplo, día 1, 4, 7, 14, 28, 56, 84, etc., después del trasplante. Para inyección subcutánea, generalmente se administran de uno a dos mililitros de la composición farmacéutica. Para inyección intravenosa, se puede administrar un volumen apropiado de

20 la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión.

Después de la inyección de la dosis inicial, una segunda dosis idéntica de la proteína de fusión se puede administrar al paciente por vía subcutánea o por vía intravenosa a 1, 2, 3 o 4 semanas después de la dosis inicial. El programa de dosificación puede ser una dosis cada dos semanas, una dosis/mes, una dosis cada dos meses, etc.

30 dependiendo, por ejemplo, del estado del paciente. Se pueden administrar dosis posteriores cada cuatro semanas o con más o menos frecuencia, según sea necesario, y continuar, si se desea, en una base mensual. La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo del estado del paciente y puede depender de la gravedad de los síntomas o signos de rechazo al trasplante de órgano del paciente.

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

40 inmunológico del paciente.

Ejemplo 11

Evaluación Farmacocinética de Proteínas de Fusión CTLA-4-IgG2 Mutante en Ratas.

45 La concentración en suero de un agente terapéutico después de administración externa a un organismo vivo influye en gran medida en la eficacia terapéutica, y se determina mediante evaluación farmacocinética (PK). En el siguiente procedimiento, los perfiles PK se evaluaron en ratas para artículos de ensayo de CTLA-4-IgG2 mutante representativos D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, y D3-75-IgG2 en comparación con los artículos

50 de ensayo tanto de proteína de fusión hCTLA-4-IgG2 como Orencia®. El diseño del estudio, y la generación e interpretación de datos se describen en el acto.

Diseño del estudio En Vida.

55 Se usaron ratas Hans Wistar macho, emparejadas por peso después de un período de aclimatación de al menos 5 días. Los volúmenes de dosificación del artículo de ensayo se calcularon para animales individuales basándose en su peso de modo que todos recibieron 1 mg/kg de artículo de ensayo. Por lo tanto una rata con un peso habitual de 150 gramos (g) recibió un volumen de dosificación de 150 µl ya que cada artículo de ensayo se preparó a 1 mg/ml en PBS. Se administró una sola administración de un artículo de ensayo de CTLA-4-IgG2 mutante que se ha

60 descrito anteriormente, proteína de fusión hCTLA-4-IgG2, u Orencia®, como un bolo intravenoso (i.v. o IV), o mediante la vía subcutánea (abreviado como "s.c." o "SC"). El tamaño del estudio fue suficiente para un mínimo de cuatro tomas de muestras de sangre de 300 µl por momento temporal, aunque limitando el volumen de sangre extraído de cualquier rata a no más de un 10 % de volumen de sangre total. El período de tiempo de la toma de muestra de sangre fue cualquiera de antes de la dosis, 5 minutos (min), 30 min, 2 horas (h), 4 h, 8 h, 1 día (d), 2 d, 3 d, 4 d, 6 d, 8 d, 10 d, 12 d, y 14 d después de la dosis, o 5 min, 30 min, 2 h, 4 h, 8 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 6 d, 8 d, 10 d,

65 11 d, 12 d, 13 d, 14 d y 15 d después de la dosis para administraciones i.v y s.c., respectivamente. El suero se

preparó a partir de muestras de sangre individuales, y se sometió al ensayo mediante ELISA para cuantificar la presencia del artículo de ensayo administrado.

Método de ELISA PK.

5 La proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante, hCTLA-4IgG2, u Orencia® presentes en las muestras de suero se unieron a CD80 humano-IgG murino (descrito anteriormente) revestido previamente sobre placas de microtitulación. La detección se consiguió mediante la adición de una IgG (HRP) de cabra anti-humana conjugada con Peroxidasa de Rábano Picante (Jackson ImmunoResearch N.º 109-035-098). La cuantificación se realizó mediante el uso de un
10 sustrato de HRP cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), más peróxido de hidrógeno (Kem-En-Tec N.º 4390A), de modo que la reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 0,2 N (H₂SO₄), y la absorbancia óptica se midió a 450 nm con un espectrofotómetro. Las muestras de suero se diluyeron previamente a 1/20 antes de su adición a la placa de ELISA de modo que la matriz se normalizó a un 5 % de sueros de rata, y se diluyó adicionalmente en un 5 % de sueros de rata para un total de ocho diluciones. La concentración de cada
15 muestra de suero diluido se cuantificó con respecto a la curva patrón preparada usando valoraciones del mismo artículo de ensayo con adiciones en un 5 % de sueros de rata. La curva patrón variaba de 10 a 0,078 ng/ml, y se determinó que el intervalo de precisión era de dos veces el fondo a 5 ng/ml en un 5 % de sueros de rata. La calidad de la curva patrón se evaluó mediante controles de calidad (QC) del mismo artículo de ensayo preparado en un 5 % de sueros de rata a concentración es elevada, media y baja del intervalo de precisión de la curva patrón. Se observó
20 que el criterio de aceptación del QC para la concentración de QC observada estaba dentro de un 20 % de la concentración del QC esperada. La concentración de una muestra de suero desconocida individual se generó haciendo el promedio de las concentraciones asignadas a dilución es con densidades ópticas (las DO) dentro del intervalo de precisión de la curva patrón. Al menos 4 muestras de suero individuales se usaron para calcular la concentración media de suero en cada momento temporal nominal.

25

Parámetros PK.

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

35

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

40

Tabla 10. Sumario oscuras Parámetros PK para Proteína de Fusión Orencia®, hCTLA-4- IgG2, y Proteínas de Fusión de CTLA-4-IgG2 Mutante Administradas a 1 mg/kg como un Solo Bolo I.V. o S.C. a Ratas

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

45 Cmáx se refiere a la concentración en suero máxima del artículo de ensayo. El valor de la semivida (T1/2) terminal es el tiempo necesario en horas para que la concentración del artículo de ensayo en el suero disminuya a la mitad durante la fase de terminación del perfil de concentración-tiempo. El área bajo la curva de concentración en suero-

tiempo (AUC) se cuantificó desde el momento cero hasta el infinito usando la regla trapezoidal. La eliminación (Cl) se calculó usando la ecuación dosis/AUC, mientras que el volumen de distribución (Vz) de la fase terminal se calculó usando la ecuación Cl/k.

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

Tabla 11. Comparación de Biodisponibilidad de Proteína de Fusión Orencia®, Proteínas de Fusión de hCTLA-4-Ig2, D3-29-IgG2, D3-54-IgG2, D3-56-IgG2, D3-69-IgG2, y D3-75-IgG2

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

- 10 El CTLA-4IgG2 humano y la proteína de fusión Orencia® presentan perfiles PK similares a pesar de su diferencia en marcos de IgG, lo que implica que las partes de IgG2 humana y Fc de IgG1 humano mutado de estos artículos de ensayos respectivos tienen actividad PK comparable cuando el dominio funcional es constante. Por deducción, cualquier cambio observado en el perfil PK para proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante en comparación con la proteína de fusión Orencia® por lo tanto debería ser atribuible a diferencias en el dominio funcional, y no en la parte del Fc.

- 20 Para cada proteína de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante, la eliminación era lenta tal como se sugiere por los valores de semivida largos y el área bajo las curvas grande. Las semividas variaron de 11,2 a 56,4 h a la dosificación SC, y de 15,3 a 83,0 horas (h) para dosificación IV en comparación con la proteína de fusión Orencia®, que presentaba una semivida de 70,0 o 42,3 horas cuando se administraba por las vías SC o IV, respectivamente. Los valores del AUC para las proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante fueron como promedio superior a los de la proteína de fusión Orencia®. Después de dosificación SC, la media fue 879,5 +/- 281,6 h*kg*ng/l/mg en comparación con 391 h*kg*ng/L/mg para la proteína de fusión Orencia® por SC, mientras que una administración IV proporcionó un AUC promedio de 1645,5 +/- 641,1 h*kg*ng/l/mg en comparación con 728 h*kg*ng/l/mg para la proteína de fusión Orencia® por IV.

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

- 35 La biodisponibilidad también era similar a la mayoría de las proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante, con un promedio de 0,6 +/- 0,1, que se comparaba favorablemente con la biodisponibilidad de 0,53 de la proteína de fusión Orencia®.

- 40 Por último, la Cmáx era generalmente más elevada para las proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante en comparación con la proteína de fusión Orencia®. Los valores de Cmáx variaron de 4,5 a 9,3 ug/l a la dosificación SC, y de 20,6 a 81,9 ug/l para dosificación IV en comparación con la proteína de fusión Orencia®, que presentaba una Cmáx de 3,3 o 22,3 ug/l cuando se administraba por las vías SC o IV, respectivamente.

- 45 En general, los datos PK mostraron que todas las proteínas de fusión de CTLA-4-IgG2 mutante evaluadas generalmente tenían un perfil PK no inferior al de la proteína de fusión Orencia® cuando se administraba a ratas a 1 mg/kg mediante las vías SC o IV, y que las porciones Fc de IgG1 o IgG2 eran comparables cuando el dominio funcional era constante.

Ejemplo 12

- 50 Este ejemplo describe un método para crear una línea celular transfectada de forma estable para expresión de proteínas de fusión de CTLA4-Ig mutante de la invención, usando la línea celular para producción a escala de laboratorio de rutina de la proteína de fusión de CTLA4-Ig mutante, y purificando las proteínas de fusión de CTLA-4-Ig mutante a partir de medios de expresión celular. Aunque este ejemplo describe de forma específica un método para crear una línea de células CHO-K1 transfectadas de forma estable para expresar la proteína de fusión de D3-54-IgG2, usando tal célula para producción a escala de laboratorio y purificando la proteína a partir del medio, los

métodos que se describen en el presente documento se pueden usar con cualquier proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante de la invención y/o cualquier línea celular apropiada que se ha desvelado anteriormente.

Creación de Línea Celular Transfectada de Forma Estable.

5

Materiales.

10 Células CHO-K1 sin tratamiento previo (sin transfectar): las células CHO-K1 adaptadas a crecimiento en suspensión sin suero en medio químicamente definido (ID de la Célula: M4-PeM-0436-112-01) se almacenaron en nitrógeno líquido en fase vapor (Dewar MVE1536P). Un vial de M4-PeM-0436-112-01 se les conjuró y se cultivo con medio CD OptiCHO™ (Invitrogen, N.º 12681) en Matracas de agitación. Los cultivos proporcionaron células para transfección y medio acondicionado para crecimiento y clonación. Todos los cultivos se cultivaron a 37 °C, CO₂ al 5 %.

15 Plásmido: el ADN que codifica el ECD de CTLA-4 mutante de D3-54 fusionado a una región Fc de IgG2a humano se insertó en el vector CET1019AS UCOE (Millipore) y el plásmido resultante CET1019AS-D3-54-IgG2 se usó para todas las transfecciones.

20 Medio de cultivo celular: para todos los cultivos se usó medio sin componente animal químicamente definido CD Opti-CHO (Invitrogen N.º 12681), suplementado con un 2 % en v/v de L-glutamina 200 mM (Invitrogen N.º 25031).

25 Medio acondicionado: El medio acondicionado se obtuvo cultivando la línea de células CHO-K1 precursora en medio CD Opti-CHO. A recuentos celulares > 5 x 10⁵ células/ml, el cultivo celular se centrifugó y el sobrenadante del medio acondicionado que se filtró en entorno estéril. El medio acondicionado se preparó cada día de forma reciente para su uso o se almacenó a 2-8 °C hasta 7 días.

30 Medio acondicionado al 50 %: Medio acondicionado (mencionado anteriormente) combinado con un volumen igual de medio de cultivo celular recién preparado; se usa recién preparado cada día.

Métodos Analíticos.

30

La determinación del recuento celular y la viabilidad se realizaron con un aparato de recuento celular Cedex o Cedex HiRes (Innovatis).

35 La identificación sistemática inicial de clones que expresan la proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (D3-54-IgG2) Para producción se realizó mediante ELISA. Las placas de ELISA se revistieron con proteína de fusión de hCD80-Ig murino durante una noche. Al día siguiente, las muestras a analizar se transfectaron a las placas de ELISA a dilución desde 50 y 200 veces por duplicado. Después de dos horas de incubación, se añadió anticuerpo IgG-HRP anti-humano y se incubó durante 30 minutos. Las placas se desarrollaron con TMB y se leyeron a 450 nm. Se informaron las densidades ópticas sin procesar (DO).

40

45 La determinación cuantitativa de la concentración de proteína de fusión de D3-54-IgG2 se realizó mediante un método de HPLC de Proteína A usando una columna Poros A/20 (ABI N.º 1-5024-12). Se usaron dos tampones: Tampón A: ácido fosfórico 50 mM, cloruro potásico 150 mM, pH 7,6 ± 0,1 y Tampón B: ácido fosfórico 50 mM, cloruro potásico 150 mM, pH 2,5 ± 0,1. Ambos tampones tenían adicionalmente un 5 % de isopropanol añadido. El equilibrio y el lavado después de la inyección de muestra se realizó con un 42 % de Tampón A y un 58 % de Tampón B (pH 6,5). La elución era un gradiente lineal a un 12 % de Tampón A y un 88 % de Tampón B durante 1 minuto.

Procedimiento.

50

55 Las células CHO-K1 adherentes sin tratamiento previo usadas para la creación de líneas celulares estables usadas en la producción de GMP de proteína de fusión de D3-54-IgG2 se adaptaron a crecimiento en suspensión en medio CD OptiCHO™ químicamente definido. Un vial de estas células CHO-K1 sin tratamiento previo se descongeló y se cultivaron en matraces de agitación de 125 ml que contenían medio CD OptiCHO™ a una densidad de 5 x 10⁵ células viables/ml. 2 x 10⁶ células viables se volvieron a suspender en 400 µl de medio acondicionado al 50 % y se combinaron con 20 µg de ADN de plásmido (D3-54-IgG2 en un vector CET1019AS UCOE) en una cubeta. La electroporación se realizó con un Pulsador Gene Xcell (BioRad) a 320 voltios (V) con una longitud de pulso de onda cuadrado de 15 milisegundos (ms). Se realizaron transfecciones por duplicado y a continuación las células se combinaron. Las células combinadas se transfirieron a un matraz T-25 que contenía 5 ml de medio acondicionado al 50 % y se incubaron durante dos días.

60

65 Las células transfectadas se dispensaron directamente en placas de 96 pocillos para clonación o se cultivaron con selección de antibiótico hasta obtener una combinación estable, y a continuación se dispensaron en placas de 96 pocillos. Dos días después de la electroporación, el cultivo se diluyó a 1250 células/ml en medio acondicionado que contenía 8 µg/ml de puomicina para presión de selección. Las células se dispensaron en placas de 96 pocillos a 200 µl por pocillo (250 células/pocillo). Las placas se incubaron durante aproximadamente 10 días para destruir las

células sin transfectar y las transfectar as de forma transitoria. Después de 10-12 días, cada pocillo en cada placa se inspeccionó por vía visual para identificar los cuchillos con colonias individuales. Estos pocillos se volvieron a inspeccionar posteriormente para verificar si contenían colonias sanas, individuales adecuadas para expansión en placas de 24 pocillos.

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

15 Después de un día, cada pocillo en cada placa se inspeccionó por vía visual para identificar los pocillos con células o colonias individuales. Al día siguiente, se seleccionaron pocillos con colonias individuales de 2-4 células. Cualquier pocillo con más de dos colonias se eliminó. Un segundo operador verifico las elecciones. Los pocillos se volvieron a inspeccionar posteriormente para verificar que contenían colonias sanas, individuales adecuadas a la expansión en
20 placas de 24 pocillos.

Los clones de placas de 96 pocillos se expandieron en placas de 24 pocillos que contenían 1 ml de medio acondicionado por pocillo con 8 µg/ml de puromicina. Todos los contenidos de los pocillos seleccionados de las placas de 96 pocillos con colonias individuales se transfirieron a pocillos individuales en las placas de 24 pocillos. Se tomaron 200 µl De cada nuevo pocillo en la placa de 24 pocillos para lavar el pocillo correspondiente en la placa de
25 96 pocillos y se transfirieron de nuevo. Para reserva, se añadieron de nuevo 200 µl de medio acondicionado que contenía 8 µg/ml de puromicina a cada pocillo en las placas de 96 pocillos.

Después de 1-3 días, se hizo el muestreo de cada pocillo en las placas de 24 pocillos y se sometió a ensayo para expresión de D3-54-IgG2 mediante ELISA. Los planes para expansión adicional se seleccionaron basándose en los valores de DO de ELISA sin procesar así como demostración de crecimiento adecuado.
30

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

El número de clones se redujo adicionalmente seleccionando clones con la productividad más elevada. Las células se volvieron a suspender el medio recién preparado a $1-2 \times 10^5$ células viables/ml y se sembraron en matraces T25 (de cultivo de 5 ml) o matraces de agitación de 125 ml (cultivo de 12 ml). Los cultivos se incubaron durante 22-24 horas y a continuación una densidad celular final y la determinación de viabilidad se realizó y se tomó una muestra para determinación de concentración de producto mediante HPLC de Proteína A. La productividad se calculó dividiendo la cantidad total de proteína producida entre el número total de células viables en el matraz y dividiendo entre la duración del cultivo. Las unidades se convirtieron a picogramos por célula al día o "pcd". Los clones se clasificaron de acuerdo con sus valores de pcd, pero los clones que no presentaban un crecimiento significativo Se omitieron. Los clones principales se expandieron a matraces de agitación de 125 ml para
45 crioconservación y evaluación adicional de crecimiento y productividad.

Los clones a evaluar adicionalmente se sembraron en matraces de agitación de 250 ml a 1×10^5 células viables/ml en 50 ml de medio recién preparado. Cuando la densidad celular alcanzó 1×10^6 células viables/ml, el cultivo se pasó a un nuevo matraz de agitación, de nuevo a 1×10^5 células viables/ml en 50 ml de medio recién preparado. El paso se repitió una vez más. Durante este tercer paso, se tomaron muestras del cultivo diariamente para recuento celular, viabilidad, y determinación de concentración de producto mediante HPLC de Proteína A.
50

Los clones principales que expresan proteína de fusión de D3-54-IgG2 basándose en el crecimiento y las tasas de producción específicas se seleccionaron para subclonación. La subclonación se realizó mediante dilución limitante tal como se ha descrito en la sección mencionada anteriormente para combinaciones estables, con la excepción de que puromicina no se usó en ningún momento. También se realizaron expansión, identificación sistemática, y evaluación de subclones como se ha descrito anteriormente.
55
60

Los subclones Seleccionados se pasaron repetidamente en Matraces de agitación durante aproximadamente 90 días para evaluar la estabilidad de producción. En cada paso, las células se sembraron en matraces de agitación de 125 ml a 1×10^5 células viables/ml en 25 ml de medio recién preparado. Los cultivos se pasaron cada 3-4 días. Antes de cada paso, la densidad celular y la viabilidad se midieron y se tomó una muestra para determinación de concentración de producto mediante HPLC de Proteína A.
65

Los clones y subclones seleccionados se crioconservaron desde el momento de la clasificación mediante valores de pcd con respecto a diversos momentos en la evaluación de estabilidad. El medio de congelación se preparó en el momento con un 90 % en medio de crecimiento y un 10 % de DMSO (Sigma). Las células de los cultivos en matraz de agitación se centrifugaron y se volvieron a suspender el medio de congelación a densidades que variaban de 2 - 10 x 10⁶ células/ml. La suspensión celular se dispensó en alícuotas de 1 ml en viales criogénicos. Los viales criogénicos se colocaron en recipientes de congelación con isopropanol y se almacenaron a -80 °C durante una noche. Los viales congelados se transfirieron para almacenamiento con nitrógeno líquido en fase vapor al día siguiente.

10 Producción de Proteínas de Fusión de CTLA4-IgG2 Mutante.

Un crivial que contenía 1 ml de volumen de células CHO-K1 que expresan proteína de fusión de D3-54-IgG2 se descongela y se cultiva en matraces de agitación de 125 ml que contienen medio CD OptiCHO™ a 37 °C y un 5 % de CO₂ a una densidad de 5 x 10⁵ células viables/ml. Varios matraces se combinan para inocular una bolsa de agitación con ondulación a 1-2 x 10⁵ células/ml en un volumen de 5 o 10 l de medio CD OptiCHO™ con glutamina 4 mM. El cultivo con bolsa de agitación con ondulación se mantiene en una incubadora a 37 °C suplementada con un 5 % de CO₂ en una plataforma de balanceo con un ajuste de 18-22 rpm y un ángulo de 8 grados para equipo adquirido en Sartorius Stedim Biotech. Se tomaron muestras del cultivo diariamente para recuento celular, viabilidad, nivel de nutriente, perfil de metabolito y nivel de expresión de la CTLA-4-IgG2 mutante (es decir, D3-54-IgG2) usando un ensayo de HPLC de Proteína A. El cultivo se cosecha cuando la viabilidad disminuye a -50 % generalmente 9-11 días después de la inoculación. El material de cultivo celular se aclara por filtración usando una combinación de filtración de profundidad y filtración estéril y se usa inmediatamente para procesamiento adicional o se almacena a 2-8 °C.

25 Purificación de Proteínas de Fusión de CTLA4-IgG2 Mutante.

Las proteínas de fusión de CTLA4-IgG2 mutante (D3-54-IgG2) se purificaron mediante cromatografía por afinidad hacia Proteína A usando un sistema de HPLC AKTA Explorer (GE Healthcare). Una proteína de fusión de CTLA-4-Ig mutante (D3-54-IgG2) se unió a columnas de FF de Proteína A MabSelect (GE Healthcare, N.º 17-5079-01) en tampón de PBS (Invitrogen), se cargó a ~10 mg/ml de medio de cromatografía, se lavó con el mismo tampón, eluyendo con tampón de ácido cítrico 100 mM (pH 4,0), y a continuación se neutralizó mediante la adición de 1/10 volúmenes de base de Tris 2 M base. La muestra purificada de Proteína A se procesa adicionalmente mediante diafiltración usando sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) con un intercambio de tampón en Tris-Cl 20 mM, pH 7,5.

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

La pureza de la proteína se confirma mediante análisis SDS-PAGE y el contenido de monómeros se determina usando un método de HPLC de exclusión por tamaño. Las muestras se almacenan en alícuotas a 2-8 °C o a -20 °C durante periodos de tiempo prolongados antes de su uso.

45 **Listado de secuencias**

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

50 <120> POLIPÉPTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS INMUNOSUPRESORES

<130> 0364.210WO

<150> US 60/984.631

55 <151> 01-11-2007

<150> US 61/051.215

<151> 07-05-2008

60 <160> 228

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

65 <211> 124

<212> PRT

ES 2 688 721 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> D3-1 mutante de ECD de CTLA-4

5

<400> 1

```

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

10

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

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

<400> 2

20

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15

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

25

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

30

ES 2 688 721 T3

<400> 3

```

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

```

5 <210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 4

```

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

```

20 <210> 5
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> D3-5 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 5

ES 2 688 721 T3

```

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

```

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

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

<400> 6

```

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

```

15 <210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-7 mutante de ECD de CTLA-4

25 <400> 7

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 8
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-8 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 8

```

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

```

15 <210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-9 mutante de ECD de CTLA-4

25 <400> 9

ES 2 688 721 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60

Ile Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

5 <210> 10
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-11 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 10

```

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

```

15 <210> 11
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-12 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 11

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 12
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-14 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 12

```

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

```

15 <210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-15 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 13

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 14
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-16 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 14

```

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

```

15 <210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-17 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 15

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 16
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-19 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 16

```

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

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

15 <210> 17
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-20 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 17

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 18
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-21 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 18

```

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

```

15 <210> 19
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-22 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 19

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-23 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 20

```

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

```

15 <210> 21
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-24 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 21

ES 2 688 721 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Phe Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

5 <210> 22
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-25 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 22

```

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

```

15 <210> 23
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-26 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 23

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 24
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-27 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 24

```

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

```

15 <210> 25
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-28 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 25

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 26
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-29 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 26

```

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

```

15 <210> 27
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-30 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 27

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 28
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-31 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 28

```

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

```

115 120

15 <210> 29
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-32 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 29

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 30
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-33 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 30

```

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

```

15 <210> 31
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-34 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 31

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 32
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-39 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 32

```

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

```

15 <210> 33
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-50 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 33

ES 2 688 721 T3

```

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

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

5 <210> 34
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-52 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 34

```

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

```

15 <210> 35
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-53 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 35

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 36
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-54 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 36

```

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

```

15 <210> 37
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-55 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 37

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 38
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-56 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 38

```

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

```

15 <210> 39
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-57 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 39

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 40
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-58 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 40

```

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

```

15 <210> 41
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-59 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 41

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 42
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-60 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 42

```

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

```

15 <210> 43
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-61 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 43

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 44
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-62 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 44

```

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

```

15 <210> 45
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-63 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 45

ES 2 688 721 T3

```

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

          85          90          95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
          100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

5 <210> 46
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-64 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 46

```

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

```

15 <210> 47
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-65 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 47

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 48
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-66 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 48

```

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

```

15 <210> 49
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-68 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 49

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 50
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-69 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 50

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45

Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65          70          75          80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85          90          95
Met Tyr Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

15 <210> 51
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-70 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 51

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 52
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-71 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 52

```

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

```

15 <210> 53
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-72 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 53

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 54
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D3-73 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 54

```

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

```

15 <210> 55
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3-74 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 55

25 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

ES 2 688 721 T3

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

<210> 56
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> D3-75 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 56

10

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

<210> 57
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> D3-76 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 57

20

ES 2 688 721 T3

```

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

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115          120

```

5 <210> 58
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D1 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 58

```

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

```

15 <210> 59
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220> D1T mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 59

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 60
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D2 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 60

```

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

```

15 <210> 61
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D3 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 61

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 62
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D4 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 62

```

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

```

15 <210> 63
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D5 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 63

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 64
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D6 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 64

```

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

```

15 <210> 65
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220> D20 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 65

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 66
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D21 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 66

```

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

```

15 <210> 67
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D23 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 67

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15

```

ES 2 688 721 T3

```

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

```

- 5 <210> 68
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> D24 mutante de ECD de CTLA-4
- <400> 68

```

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

```

- 15 <210> 69
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> D26 mutante de ECD de CTLA-4
- <400> 69

ES 2 688 721 T3

```

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

          100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
          115          120

```

5 <210> 70
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D27 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 70

```

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

```

15 <210> 71
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D28 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 71

ES 2 688 721 T3

```

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

```

5 <210> 72
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> D29 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 72

```

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

```

15 <210> 73
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> D31 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 73

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 74

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión de D3-12-IgG2 (con lisina C-terminal)

<400> 74

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50          55          60

```

ES 2 688 721 T3

Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Phe	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
65					70					75					80
Gly	Leu	Arg	Ala	Ala	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
			85						90					95	
Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
			100					105					110		
Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Glu	Arg	Lys	Cys
		115					120					125			
Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser
		130				135					140				
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
145					150					155					160
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
				165					170					175	
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
			180					185					190		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val
		195					200					205			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
						215					220				
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
225					230					235					240
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
				245					250					255	
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
			260					265					270		
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
		275					280					285			
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp
	290				295						300				
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
305					310					315					320
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
				325					330					335	
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
			340					345					350		

<210> 75

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión de D3-14-IgG2 (con lisina C-terminal)

<400> 75

ES 2 688 721 T3

```

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

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

```

<210> 76

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión de D3-17-IgG2 (con lisina C-terminal)

<400> 76

ES 2 688 721 T3

```

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
225          230          235          240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
245          250          255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
260          265          270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
275          280          285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
290          295          300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
305          310          315          320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325          330          335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340          345          350

```

<210> 77

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión de D3-20-IgG2 (con lisina C-terminal)

<400> 77

ES 2 688 721 T3

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

<210> 78

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión de D3-27-IgG2 (con lisina C-terminal)

<400> 78

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 79
 <211> 352
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína de fusión de D3-29-IgG2 (con lisina C-terminal)

10 <400> 79

ES 2 688 721 T3

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

<210> 80

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de D3-1 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 80

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccgga caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180

```


ES 2 688 721 T3

```

cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 81
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-2 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 81

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccacc gaaattagag tcacagtgct ccgccaaagg 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 82
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-3 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 82

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaaagg 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 83
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-4 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 83

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaaagg 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

35 <210> 84
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 688 721 T3

<220>
<223> secuencia codificante de D3-5 mutante de ECD de CTLA-4

5 <400> 84

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgctgctgc acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

<210> 85
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> secuencia codificante de D3-6 mutante de ECD de CTLA-4

15

<400> 85

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgctgctgc acatacatga tgggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

<210> 86
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> secuencia codificante de D3-7 mutante de ECD de CTLA-4

25

<400> 86

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgctgctgc acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

<210> 87
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> secuencia codificante de D3-8 mutante de ECD de CTLA-4

40

<400> 87

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatt ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 88

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de D3-9 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 88

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 89

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia codificante de D3-11 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 89

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 90

<211> 372

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D3-12 mutante de ECD de CTLA-4

35 <400> 90

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 91

ES 2 688 721 T3

<211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-14 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 91

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccgcgatcac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgcgcc cgaaccctgc 360
10 cctgattctg at 372
    
```

<210> 92
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> mutante de ECD de CTLA-4

<400> 92

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatcac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgcgcc cgaaccctgc 360
20 cctgattctg at 372
    
```

<210> 93
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-16 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 93

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatcac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgcgcc cgaaccctgc 360
35 cctgattctg at 372
    
```

<210> 94
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-17 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 94

45

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 95

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de D3-19 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 95

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 96

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia codificante de D3-20 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 96

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 97

<211> 372

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D3-21 mutante de ECD de CTLA-4

35 <400> 97

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 98

ES 2 688 721 T3

<211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-22 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 98

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
10  cctgattctg at 372
    
```

<210> 99
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-23 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 99

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
    cctgattctg at 372
    
```

<210> 100
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-24 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 100

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
35  cctgattctg at 372
    
```

<210> 101
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-25 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 101

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5
<210> 102
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> secuencia codificante de D3-26 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 102

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15
<210> 103
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> secuencia codificante de D3-27 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 103

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120

gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgata ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30
<210> 104
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<223> secuencia codificante de D3-28 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 104

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
ctcgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 105

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de D3-29 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 105

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 106

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia codificante de D3-30 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 106

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 107

<211> 372

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D3-31 mutante de ECD de CTLA-4

35 <400> 107

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcgcaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 108

ES 2 688 721 T3

<211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-32 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 108

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccgcggtatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
10  cctgattctg at 372
    
```

<210> 109
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-33 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 109

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccgcggtatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
20  cctgattctg at 372
    
```

<210> 110
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-34 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 110

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
30  cctgattctg at 372
    
```

<210> 111
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-39 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 111

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatc cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
40  cctgattctg at 372
    
```

<210> 111
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-39 mutante de ECD de CTLA-4

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 112

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de D3-50 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 112

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 113

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia codificante de D3-52 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 113

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 114

<211> 372

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D3-53 mutante de ECD de CTLA-4

35 <400> 114

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggataggt taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 115

ES 2 688 721 T3

<211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-54 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 115

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg cgtcaccgga caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgctgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgcgcc cgaaccctgc 360
10  cctgattctg at 372
    
```

<210> 116
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-55 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 116

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg agtcaccgga caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgctgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgcgcc cgaaccctgc 360
20  cctgattctg at 372
    
```

<210> 117
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-56 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 117

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
    tgtgaatatg cgtcaccgga caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgctgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgcgcc cgaaccctgc 360
35  cctgattctg at 372
    
```

<210> 118
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-57 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 118

45

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggy caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 119

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de D3-58 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 119

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggy caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 120

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia codificante de D3-59 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 120

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccggy caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 121

<211> 372

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D3-60 mutante de ECD de CTLA-4

35 <400> 121

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccggy caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 122

ES 2 688 721 T3

<211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-61 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 122

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    
```

```

ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

10

<210> 123
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> secuencia codificante de D3-62 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 123

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

25

<210> 124
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-63 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 124

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctgcg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372
    
```

35

<210> 125
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> secuencia codificante de D3-64 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 125

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccg cggtcaccg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga tggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 126
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-65 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 126

```

15 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60

tgtgaatatg cgtcaccg cggtcaccg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatag taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

20 <210> 127
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-66 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 127

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg cgtcaccg cggtcaccg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatag taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30 <210> 128
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-68 mutante de ECD de CTLA-4
 <400> 128

```

40 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcaccg cggtcaccg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

ES 2 688 721 T3

<210> 129
 <211> 372
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-69 mutante de ECD de CTLA-4
 10 <400> 129

 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
 tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
 gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
 cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

 <210> 130
 15 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> secuencia codificante de D3-70 mutante de ECD de CTLA-4

 <400> 130

 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
 tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
 gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
 cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

 25 <210> 131
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> secuencia codificante de D3-71 mutante de ECD de CTLA-4

 <400> 131
 35 <400> 131

 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
 tgtgaatatg cgtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
 gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
 cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

 <210> 132
 40 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-72 mutante de ECD de CTLA-4
 45 <400> 132

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5 <210> 133
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-73 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 133

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 134
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-74 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 134

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggatttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30 <210> 135
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> secuencia codificante de D3-75 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 135

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcgtg 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaaaatga actaaccttc 180
cttgacgatc ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```


ES 2 688 721 T3

<210> 136
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia codificante de D3-76 mutante de ECD de CTLA-4

10

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggtg 60
    tgtgaatatg cgtcaccccg caaagccaac gaagttagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
    gatagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga aggaagatga actaaccttc 180
    cttgacgatc ccatctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactact tgggtattgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
    cctgattctg at 372
  
```

15

<210> 137
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> secuencia codificante de D1 mutante de ECD de CTLA-4

25

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggtt 60
    tgtgaatatg agtcacccca taaagccacc gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
    aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
    ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
    cctgattctg at 372
  
```

30

<210> 138
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> secuencia codificante de D1T mutante de ECD de CTLA-4

```

    atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggtt 60
    tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct cgcccaagcc 120
    aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
    ctggacgatc ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
    ggacttcgag ccgcggatac cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
    ccttactacc tgggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
    cctgattctg at 372
  
```

40

<210> 139
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> secuencia codificante de D2 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 139

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcacccca taaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
aacagtcaag tgacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
ctggacgac ccttctgcac aggtaccttt tccggaaatc aggttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtata cggactctat atctgtaaag tcgaactcat gtatcccccc 300
ccttactacc tgggtatggg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 140

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D3 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 140

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
ggaagtcaag ttacagaagt ctgcgctatg acatacatga agggagatga actaaccttc 180
cttgacgac ccagctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgcggtata cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactact tgggttttgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 141

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D4 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 141

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatata gtcacccgg gaaagccgac gaaattagag tcacagtgct ccgccaagcc 120
tctagtcaag tcacagaagt ctgcgctatg acatacatgg agggagatga actaaccttc 180
cttgacgacc ccacctgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag ccgctgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc tgggtttcgg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360

```

cctgattctg at

372

<210> 142

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D5 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 142

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg catcccccg gaaagccact gaagttagag tcacagtctt ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatatatga tgggcgacga actcaccttc 180
ctcgacgacc caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgacct cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

ES 2 688 721 T3

<210> 143
 <211> 372
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia codificante de D6 mutante de ECD de CTLA-4
 10 <400> 143

 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
 tgtgaatatg catcccccg gaaagccact gaaattagag tcacagtcct ccgccaggct 120
 gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tgggcgacga actcaccttc 180
 ctcgacgacc caatttgac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

 <210> 144
 15 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> secuencia codificante de D20 mutante de ECD de CTLA-4

 <400> 144

 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
 tgtgaatatg agtccccca caaagccact gaaattagag tcacagtgct ccgccaggct 120
 gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga tggaggacga actcaccttc 180
 ctcgacgacc caatttgac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacc ttggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

 25 <210> 145
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> secuencia codificante de D21 mutante de ECD de CTLA-4

 <400> 145
 35
 atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
 tgtgaatatg ccgccccca caacgcgcgac gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
 tcttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg aagaagatga actcaccttc 180

 ctcgacgacc ccacctgcac aggtacctt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
 ggacttcgag ccgtcgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
 ccttactacc tgggttcg gtaatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
 cctgattctg at 372

 <210> 146
 40 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia codificante de D23 mutante de ECD de CTLA-4

ES 2 688 721 T3

<400> 146

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatt ccgccccca caacgccgcc gaaatcagag tcacagtcct ccgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggcttagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

5

<210> 147

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia codificante de D24 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 147

15

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcacccgg caaagccaac gaaattagag tcacagtgct ccgcaaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatga aagaagacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggcttagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 148

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> secuencia codificante de D26 mutante de ECD de CTLA-4

25

<400> 148

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg aggcacccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgcaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatatatgg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttggcttagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

30

<210> 149

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> secuencia codificante de D27 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 149

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg agtcaccccg caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatataatg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttgggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 150

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de D28 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 150

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccaac gaagttagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggatcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatataatg tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag cagccgatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttgggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

15 <210> 151

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia codificante de D29 mutante de ECD de CTLA-4

<400> 151

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg aggcccccca caaagccgat gaaattagag tcacagtcct ccgccaagct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatataatg tggaggacga actcaccttc 180
ctcgacgacc cgtcctgcac aggtaccttc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttgggtctagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

25 <210> 152

<211> 372

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de D31 mutante de ECD de CTLA-4

35 <400> 152

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg aggcccccca caacccgat gaaatcagag tcacagtcct ccgccaagct 120
ggttcacaag taacagaagt ctgcgctatg acatataatg tcgaggacga actcaccttc 180
ctcgacaagt caatttgcac aggtaccttt tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacc ttgggtatagg taatggcact cagatctacg tcattgaccc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 153

<211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia codificante de proteína de fusión de D3-12-IgG2
 <400> 153

```

atggcttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgctc 120
gctcaaccag ccgctgtaact cgcgctcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cggaagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgctgata cgggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatgac ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170
    
```

10 <210> 154
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia codificante de proteína de fusión de D3-14-IgG2

20 <400> 154

```

atggcttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgctc 120
gctcaaccag ccgctgtaact cgcgctcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccgctgata cgggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatgac ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170
    
```

<210> 155
 <211> 1170

ES 2 688 721 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> secuencia codificante de proteína de fusión de D3-17-IgG2

<400> 155

atggcttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgtctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120

gctcaaccag ccgctcgtact cgcgctcctct agaggtatcg cttccttctgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgccccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170

10 <210> 156
<211> 1170
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> secuencia codificante de proteína de fusión de D3-20-IgG2

<400> 156

20 atggcttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgtctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgctcgtact cgcgctcctct agaggtatcg cttccttctgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgccccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170

ES 2 688 721 T3

<210> 157
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia codificante de proteína de fusión de D3-27-IgG2

<400> 157

10

```

atggccttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgtctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
    
```

```

ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctgt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170
    
```

<210> 158
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> secuencia codificante de proteína de fusión de D3-29-IgG2

<400> 158

20

ES 2 688 721 T3

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccgggtt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgctcgtaact cgcgctcctct agaggtatcg cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcaccgc gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aagggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatgat ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaagcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccagctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1170

```

5 <210> 159
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> ECD de CTLA-4 humano de tipo silvestre
 <400> 159

```

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

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
  100          105          110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
  115          120

```

15 <210> 160
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

20 <220>
 <223> CTLA-4 de longitud completa humano de tipo silvestre
 <400> 160

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 161

<211> 389

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión de CTLA4-IgG2 humana de WT predicha

<400> 161

```

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

```


ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 163

<211> 1167

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante de proteína de fusión de CTLA4-IgG2 humana de WT

<400> 163

ES 2 688 721 T3

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccgggtt tttgtaaagc catgcacgctc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatatc cttccttcgt ttgtgaatat 180
gcatcccccg gaaaagccac tgaagttaga gtcacagtcc tccgccaggc tgattcaaaa 240
gtaacagaag tctgcgctgc aacatatatg atgggcaacg aactcacctt cctcgacgac 300
tcaatttgca caggtaacctc ctccggaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
cttggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttggtg cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccacaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacggtcg tgggtgtgga cgtgagccag gaagaccctc aggtccagtt caactggtag 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaaa 1167

```

<210> 164

<211> 357

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Orenzia(R) (Bristol-Myers Squibb Co.)

<400> 164

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 165

<211> 394

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión de LEA29Y-Ig predicha

<400> 165

```

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1          5          10          15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

```

ES 2 688 721 T3

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

<210> 166

<211> 357

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de fusión de LEA29Y-Ig madura

10

<400> 166

ES 2 688 721 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
 20          25          30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35          40          45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

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

```

<210> 167
 <211> 1182
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia codificante de proteína de fusión de LEA29Y-Ig
 10 <400> 167

ES 2 688 721 T3

```

atggccttgc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc atcccagttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttctg ttgtgaatat 180
gcatcccccg gaaaatatac tgaagttaga gtcacagtcc tccgccaggc tgattcacia 240
gtaacagaag tctgcgctgc aacatatatg atgggcaacg aactcacctt cctcgacgac 300
tcaatttgca caggtacctc ctccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gcaatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcattgacc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatcaggagc ccaaactctc tgacaaaact cacacatccc caccgtcccc agcacctgaa 540
ctcctgggtg gatcgtcagt cttcctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc 600
tcccggacc ctaggtcac atgctggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 660
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 720
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 780
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 840
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 900

```

```

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 960
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1020
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1080
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtctc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1140
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1182

```

<210> 168
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ECD de LEA29Y

<400> 168

```

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

```

<210> 169
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia codificante de ECD de LEA29Y

<400> 169

ES 2 688 721 T3

```

atgcacgtcg ctcaaccagc cgtcgtactc gcgtcctcta gaggtatcgc ttccttcggt 60
tgtgaatatg catcccccg  aaaatatact gaagttagag tcacagtcct ccgccaggct 120
gattcacaag taacagaagt ctgcgctgca acatatatga tgggcaacga actcaccttc 180
ctcgacgact caatttgac  aggtacctcc tccggaaatc aagttaatct tactattcaa 240
ggacttcgag caatggatac cggactctat atttgtaaag tcgaactcat gtaccccccc 300
ccttactacg agggtatagg taatggcact cagatctacg tcatcgatcc cgaaccctgc 360
cctgattctg at 372

```

<210> 170

<211> 476

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220

10 <223> Proteína de fusión de CD80 humano-IgG1 humana de WT predicha

<400> 170

```

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1           5           10           15
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
      20           25           30
Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
      35           40           45

```

ES 2 688 721 T3

```

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
  50                               55                               60
Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
  65                               70                               75                               80
Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
  85                               90                               95
Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
  100                              105                              110
Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
  115                              120                              125
Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
  130                              135                              140
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
  145                              150                              155                              160
Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
  165                              170                              175
Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
  180                              185                              190
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
  195                              200                              205
Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
  210                              215                              220
Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
  225                              230                              235                              240
Asp Asn Gly Val Thr Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
  245                              250                              255
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
  260                              265                              270
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
  275                              280                              285
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
  290                              295                              300
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
  305                              310                              315                              320
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
  325                              330                              335
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
  340                              345                              350
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
  355                              360                              365
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
  370                              375                              380
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
  385                              390                              395                              400
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
  405                              410                              415
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
  420                              425                              430
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
  435                              440                              445
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
  450                              455                              460
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
  465                              470                              475

```

<210> 171

<211> 442

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de CD80 humano-IgG1 humana de WT madura

<400> 171

Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
1				5					10					15	
Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp
			20					25					30		
Gln	Lys	Glu	Lys	Lys	Met	Val	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Gly	Asp	Met	Asn
		35					40					45			
Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn
	50					55					60				
Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr
65					70					75					80
Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His
				85					90					95	
Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser
			100					105					110		
Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys
		115					120					125			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn
	130					135					140				
Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu
145				150						155					160
Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr
				165					170					175	
Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn
			180					185					190		
Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
		195					200					205			
Gly	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	210					215					220				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
225				230						235					240
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			245						250					255	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
			260					265					270		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
		275					280					285			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	290					295					300				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305					310					315					320
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				325					330					335	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
			340					345					350		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
		355					360					365			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
	370					375					380				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385					390					395					400
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			405					410						415	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			420					425					430		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
		435					440								

5

<210> 172
 <211> 1428
 <212> ADN

ES 2 688 721 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante de proteína de fusión de CD80 humano-IgG1 humana de WT

5

<400> 172

```

atggggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtggtatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcy cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atgtgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctggt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaaataca cgaagcaaga gcattttcct 720
gataacgggg tgaccccaaa gagctgcgac aaaactcaca catgccacc gtgccagca 780
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc 840
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct 900
gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 960
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1020
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc 1080
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1140
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc 1200
ttctatccc gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggagccgga gaacaactac 1260
aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggtccttct tcctctacag caagctcacc 1320
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1380
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaa 1428

```

10 <210> 173

<211> 726

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia codificante de péptido señal de CD80 humano de WT y ECD de CD80 humano de WT

<400> 173

```

atggggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtggtatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
atcgtgatcc tggctctgcy cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atgtgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctggt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaaataca cgaagcaaga gcattttcct 720
gataac 726

```

20

<210> 174

<211> 208

<212> PRT

25 <213> Homo Sapiens

<220>

<223> ECD de CD80 humano de WT

ES 2 688 721 T3

<400> 174

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

5

<210> 175
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10

<220>
 <223> CD86 humano de WT de longitud completa predicho

15

<400> 175

ES 2 688 721 T3

```

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

Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
          275          280          285
Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
          290          295          300
Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
 305          310          315          320
Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe
          325

```

<210> 176

<211> 987

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia codificante de CD86 humano de WT de tipo silvestre de longitud completa

<400> 176

ES 2 688 721 T3

```

atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctgggtgctg ctctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcaccc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcctt ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatggt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cttttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780
atggttttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840
aatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900
atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtgttt ttaaaagttc gaagacatct 960
tcatgcgaca aaagtgatac atgtttt 987

```

<210> 177

<211> 477

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de CD86 humano-IgG1 humana de WT predicha

<400> 177

```

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

```


ES 2 688 721 T3

145						150					155				160
His	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Lys	Lys	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Lys
				165					170					175	
Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Tyr	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Lys	Ser	Gln	Asp	Asn
			180					185					190		
Val	Thr	Glu	Leu	Tyr	Asp	Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Pro
		195					200					205			
Asp	Val	Thr	Ser	Asn	Met	Thr	Ile	Phe	Cys	Ile	Leu	Glu	Thr	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser	Pro	Phe	Ser	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro	Gln
225					230					235					240
Pro	Pro	Pro	Gly	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
			245						250					255	
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
			260					265					270		
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
		275					280					285			
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
	290					295					300				
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
305					310					315					320
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
				325					330					335	
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
			340					345					350		
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
		355					360						365		
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
	370					375					380				
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
385					390					395					400
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				405					410					415	
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
			420					425					430		
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
		435					440					445			
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
	450					455					460				
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
465					470					475					

<210> 178

<211> 454

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de CD86 humano-IgG1 humana de WT madura

<400> 178

ES 2 688 721 T3

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

100 105 110
 Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
 115 120 125
 Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
 130 135 140
 Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
 145 150 155 160
 Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
 165 170 175
 Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
 180 185 190
 Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

ES 2 688 721 T3

<211> 1431
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de CD86 humano-IgG1 humana de WT

<400> 179

```

atggatcccc agtgcaactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctgggtgctg ctctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcattcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgtctg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
    
```

```

gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatggt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctccccag gggtgacccc aaagagctgc gacaaaactc acacatgcc accgtgccc 780
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 840
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 900
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 960
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1020
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1080
cccacgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1140
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa 1200
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1260
tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 1320
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1380
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 1431
    
```

10
 <210> 180
 <211> 220
 <212> PRT
 15 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223 > ECD de CD86 humano de WT

20 <400> 180

ES 2 688 721 T3

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

<210> 181
 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de péptido señal de CTLA-4 humano de WT

<400> 181

atggccttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60

ccttgctactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgt 105

<210> 182
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223> péptido señal de CTLA-4 humano de WT

<400> 182

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1 5 10 15
 Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30
 Val Phe Cys
 35

<210> 183
 <211> 684
 <212> ADN

ES 2 688 721 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante de polipéptido de Fc de IgG2 humano (con lisina C-terminal)

5

<400> 183

```

gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 60
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acgtgctggg tgggtgacgt gagccacgaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacia aggcctcca gcccctatcg agaaaacct ctccaaaacc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 540
tccgacggct cttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684
    
```

10

<210> 184

<211> 228

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

15

<220>

<223> Polipéptido de Fc de IgG2 humano (con lisina C-terminal)

<400> 184

20

```

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

ES 2 688 721 T3

<210> 185
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5

<220>
 <223> Polipéptido de Fc de IgG1 humano

<400> 185

10

```

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

<210> 186
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido de Fc de IgG1 mutante

<400> 186

20

ES 2 688 721 T3

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

<210> 187
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 187

ctattgctac ggccgctatg gccmtkcaag tcgctcaacc agccgtogta ctcgctcc 59

<210> 188
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 188

gtgatggtga tgggtgcgg ccgcatcaga 30

<210> 189
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 189

ES 2 688 721 T3

aagctgtcac cggatgatcg atcccgaacc ctgccctgat tctgatgagc gcaaatgttg 60
 tgtcagagtgc ccaccgt 77

5 <210> 190
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 190

15 cagaattcat tattaccg gagacagga gaggctctc tg 42

<210> 191
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 191

25 ggaataccg tttttgtaa agccatgcac gtcgctcaac cagccgtcgt actc 54

<210> 192
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 192

ggcactcaga tctacgtcat cgatcccga 30

40 <210> 193
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia codificante de ECD de CTLA-4 humano
 <400> 193

atgcacgtgg cccagcctgc tgtggtactg gccagcagcc gaggcacgc cagctttgtg 60
 tgtgagtatg catctccagg caaagccact gaggtccggg tgacagtgct tcggcaggct 120
 gacagccagg tgactgaagt ctgtgaggca acctacatga tggggaatga gttgaccttc 180
 ctatgatgatt ccatctgcac gggcacctcc agtggaaatc aagtgaacct cactatccaa 240
 ggactgaggg ccatggacac gggactctac atctgcaagg tggagctcat gtaccaccg 300
 ccatactacc tgggcatagg caacggaacc cagatttatg taattgatcc agaaccgtgc 360
 ccagattctg ac 372

50 <210> 194
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia codificante de CTLA-4 humano de longitud completa

ES 2 688 721 T3

<400> 194

atggcttgcc ttggatttca ggggcacaag gctcagctga acctggctac caggacctgg 60
 ccctgcactc tcctgttttt tcttctcttc atccctgtct tctgcaaagc aatgcacgtg 120
 gccagcctg ctgtggtact ggccagcagc cgaggcatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180

gcatctccag gcaaagccac tgaggtccgg gtgacagtgc ttcggcaggc tgacagccag 240
 gtgactgaag tctgtgcggc aacctacatg atggggaatg agttgacctt cctagatgat 300
 tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcaactatcca aggactgagg 360
 gccatggaca cgggactcta catctgcaag gtggagctca tgtaccacc gccatactac 420
 ctgggcatag gcaacggaac ccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480
 gacttcctcc tctggatcct tgcagcagtt agttcggggt tgttttttta tagctttctc 540
 ctcacagctg tttctttgag caaatgcta aagaaaagaa gccctcttac aacaggggtc 600
 tatgtgaaaa tgcccccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttattttatt 660
 cccatcaatt ga 672

- 5 <210> 195
- <211> 288
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens

- 10 <220>
- <223> CD80 humano de longitud completa predicho
- <400> 195

ES 2 688 721 T3

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

<210> 196
 <211> 867
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de CD80 humano de longitud completa

10 <400> 196

ES 2 688 721 T3

```

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcctt 60
cagctcctgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtggtatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
caaaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atgtgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctggt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacctgc tcccatcctg ggccattacc ttaatctcag taaatggaat ttttgtgata 780
tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg 840
agaagggaaa gtgtacgccc tgtataa 867

```

<210> 197
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de D3-54-IgG2 (con lisina C-terminal)

10

<400> 197

ES 2 688 721 T3

```

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

305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340      345      350

```

<210> 198
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de D3-56-IgG2 (con lisina C-terminal)

10

<400> 198

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 199

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de D3-69-IgG2 (con lisina C-terminal)

<400> 199

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 200
 <211> 352
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión de D3-75-IgG2 (con lisina C-terminal)

10 <400> 200

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1          5          10          15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Glu Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Val
          20          25          30

```

ES 2 688 721 T3

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

<210> 201
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de D3-54-IgG2

10

<400> 201

ES 2 688 721 T3

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcaccocg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccacatgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840

```

```

accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170

```

<210> 202
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de D3-56-IgG2
 <400> 202

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtaactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc cttccttcgt gtgtgaatat 180
gcgtcaccocg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacatcgc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170

```

<210> 203
 <211> 1170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de D3-69-IgG2
 <400> 203

ES 2 688 721 T3

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgacagtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaattaga gtcacagtgc tccgccaaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
gagggtatag gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140

```

aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170

- 5 <210> 204
- <211> 1170
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de D3-75-IgG2

<400> 204

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgacagtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatcgc cttccttcgt gtgtgaatat 180
gagtcacccg gcaaagccaa cgaagttaga gtcacagtgc tccgccaaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaaaatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1170

```

- 15 <210> 205
- <211> 351
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Proteína de fusión de D3-12-IgG2 (sin lisina C-terminal)

ES 2 688 721 T3

<400> 205

```

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

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

```

5 <210> 206
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión de D3-14-IgG2 (sin lisina C-terminal)

<400> 206

ES 2 688 721 T3

```

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

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275         280         285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290         295         300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305         310         315
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325         330         335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 340         345         350

```

<210> 207
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión de D3-17-IgG2 (sin lisina C-terminal)

10

<400> 207

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 208

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de D3-20-IgG2 (sin lisina C-terminal)

<400> 208

ES 2 688 721 T3

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

<210> 209

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de D3-27-IgG2 (sin lisina C-terminal)

<400> 209

ES 2 688 721 T3

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

<210> 210

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de D3-29-IgG2 (sin lisina C-terminal)

<400> 210

ES 2 688 721 T3

```

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1      5      10      15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Asn Glu Ile
 20      25      30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35      40      45
Ala Met Thr Tyr Met Lys Gly Asp Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Pro
 50      55      60
Ser Cys Thr Gly Thr Phe Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65      70      75      80
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85      90      95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100      105      110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Arg Lys Cys
 115      120      125
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 130      135      140
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 145      150      155      160
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 165      170      175
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 180      185      190
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 195      200      205
Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 210      215      220
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 225      230      235      240
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 245      250      255
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 260      265      270
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 275      280      285
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 290      295      300
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305      310      315      320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 340      345      350

```

<210> 211

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de D3-54-IgG2 (sin lisina C-terminal)

10

<400> 211

ES 2 688 721 T3

```

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

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

```

<210> 212

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de D3-56-IgG2 (sin lisina C-terminal)

10

<400> 212

ES 2 688 721 T3

```

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

305          310          315          320
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325          330          335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 340          345          350

```

<210> 214

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de D3-75-IgG2 (sin lisina C-terminal)

10

<400> 214

ES 2 688 721 T3

```

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

```

<210> 215

<211> 111

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia codificante de secuencia de péptido señal hCTLA-4 de WT que comprende los restos de aminoácido 1-37 de proteína hCTLA-4 de longitud completa

<400> 215

```

atggcttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgacttc ttctcttttt tctcctcttc ataccgggtt tttgtaaagc c 111

```

15

<210> 216

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 688 721 T3

<220>

<223> secuencia de péptido señal hCTLA-4 de WT que comprende los restos de aminoácido 1-37 de proteína hCTLA-4 de longitud completa

5

<400> 216

```

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1           5           10           15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
          20           25           30
Val Phe Cys Lys Ala
          35
    
```

10

<210> 217

<211> 684

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia codificante de polipéptido de Fc de IgG2 humano

<400> 217

```

gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 60
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 120
acgtgctggg tgggggacgt gagccacgaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcca gcccccacg agaaaaccat ctccaaaacc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 540
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
20 agcctctccc tgtctccggg taaa 684
    
```

20

<210> 218

<211> 227

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de Fc de IgG2 humano (sin lisina C-terminal)

30

<400> 218

```

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1           5           10           15
Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
          20           25           30
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
          35           40           45
    
```

ES 2 688 721 T3

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

<210> 219

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de D3-71-IgG2 (sin lisina C-terminal)

<400> 219

ES 2 688 721 T3

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

<210> 220
 <211> 352
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión de D3-71-IgG2 (con lisina C-terminal)

10 <400> 220

ES 2 688 721 T3

```

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 325      330      335
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340      345      350

```

<210> 221

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de D3-76-IgG2 (sin lisina C-terminal)

<400> 221

ES 2 688 721 T3

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

<210> 222

<211> 352

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de D3-76-IgG2 (con lisina C-terminal)

10

<400> 222

ES 2 688 721 T3

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

<210> 223

<211> 1170

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de D3-71-IgG2

<400> 223

```

atggcttgctc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgacttc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgctc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggatog cttccttctg gtgtgaaat 180
gcgtcaccgg gcaaagccaa cgaaattaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggagatg aactaacctt ccttgacgat 300

```

ES 2 688 721 T3

```

cccagctgca caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
gagggatag gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa

```

<210> 224

<211> 1170

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia codificante de proteína de fusión de D3-76-IgG2

<400> 224

```

atggcttgtc ttggatttca acgccacaaa gctcaactca atctcgctac ccgaacatgg 60
ccttgtactc ttctcttttt tctcctcttc ataccggttt tttgtaaagc catgcacgtc 120
gctcaaccag ccgtcgtact cgcgtcctct agaggtatcg cttccttctg gtgtgaatat 180
gcgtcaccog gcaaagccaa cgaagtaga gtcacagtgc tccgccaagc cgatagtcaa 240
gttacagaag tctgcgctat gacatacatg aaggaagatg aactaacctt ccttgacgat 300
cccattctga caggtacctt ttccggaaat caagttaatc ttactattca aggacttcga 360
gccatggata ccggactcta tatttgtaaa gtcgaactca tgtaccccc cccttactac 420
ttgggtattg gtaatggcac tcagatctac gtcacgatc ccgaaccctg ccctgattct 480
gatgagcgca aatggtgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 540
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 600
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccc aggtccagtt caactggtac 660
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 720
acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 780
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaa 840
accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggaggagatg 900
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 960
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1020
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1080
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1140
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa

```

15 <210> 225

<211> 485

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Proteína de fusión de CD86 humano-Ig de murino

<400> 225

ES 2 688 721 T3

Met	Asp	Pro	Gln	Cys	Thr	Met	Gly	Leu	Ser	Asn	Ile	Leu	Phe	Val	Met
1				5					10					15	
Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Lys	Ile	Gln	Ala	Tyr	Phe
			20					25					30		
Asn	Glu	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro	Cys	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Gln	Asn	Gln
		35					40					45			
Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Glu	Asn	Leu	Val
	50					55					60				
Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly	Lys	Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val	His	Ser
65					70					75					80

ES 2 688 721 T3

Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg
 85 90 95
 Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile
 100 105 110
 His His Lys Lys Pro Thr Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser
 115 120 125
 Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile
 130 135 140
 Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile
 145 150 155 160
 His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys
 165 170 175
 Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn
 180 185 190
 Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
 195 200 205
 Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
 210 215 220
 Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
 225 230 235 240
 Pro Pro Pro Gly Val Thr Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys
 245 250 255
 Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly
 260 265 270
 Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
 275 280 285
 Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 290 295 300
 Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 305 310 315 320
 His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
 325 330 335
 Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
 340 345 350
 Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile
 355 360 365
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val
 370 375 380
 Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser
 385 390 395 400
 Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp
 405 410 415
 Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr
 420 425 430
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 435 440 445
 Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val
 450 455 460
 His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser
 465 470 475 480
 Leu Gly Lys Ser Gly
 485

<210> 226
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión de CD80 humano-Ig de murino

<400> 226

ES 2 688 721 T3

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
20 25 30
Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
35 40 45
Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60
Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80
Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95
Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110
Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125
Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
130 135 140
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160
Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175
Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
180 185 190
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205
Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220
Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
225 230 235 240
Asp Asn Gly Val Thr Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro
245 250 255
Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly
260 265 270
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
275 280 285
Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
290 295 300
Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
305 310 315 320
Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
325 330 335
Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
340 345 350
Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu
355 360 365
Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
370 375 380
Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu
385 390 395 400
Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp
405 410 415
Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val
420 425 430
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln
435 440 445
Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His
450 455 460
Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu
465 470 475 480
Gly Lys Ser Gly

ES 2 688 721 T3

<210> 227
 <211> 1458
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de CD86 humano- Ig de murino

<400> 227

10

```

atggatcccc agtgcaactat gggactgagt aacatttctct ttgtgatggc cttcctgctc 60
tctggtgctg ctctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120
caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180
gaaaacttgg ttctgaatga ggtataactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240
aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300
cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360
attcgcattcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420
atagtaccaa tttctaataat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480
cacggctacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540
gagtatgatg gtattatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600
atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatggt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660
gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720
cctccccag gggtgacccc cagagtgcc ataacacaga acccctgtcc tccactcaaa 780
gagtggtccc catgcgcagc tccagacctc ttgggtggac catccgtctt catcttccct 840
ccaaagatca aggatgtact catgatctcc ctgagcccca tggtcacatg tgtgggtggg 900
gatgtgagcg aggatgaccc agacgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta 960
cacacagctc agacacaaac ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt 1020
gccctcccc tccagcacca ggactggatg agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac 1080
aacagagccc tcccatcccc catcgagaaa accatctcaa aaccagagg gccagtaaga 1140
gctccacagg tatatgtctt gcctccacca gcagaagaga tgactaagaa agagttcagt 1200
ctgacctgca tgatcacagg cttcttacct gccgaaattg ctgtggactg gaccagcaat 1260
gggcgtacag agcaaaaacta caagaacacc gcaacagtcc tggactctga tggttcttac 1320
ttcatgtaca gcaagctcag agtacaaaag agcacttggg aaagaggaag tcttttcgcc 1380
tgctcagtggt tccacgaggg tctgcacaat caccttacga ctaagaccat ctcccgggtct 1440
ctgggtaaat ccggataa                                     1458
    
```

<210> 228
 <211> 1455
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia codificante de proteína de fusión de CD80 humano- Ig de murino

<400> 228

20

ES 2 688 721 T3

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60
 cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
 gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180
 caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
 atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
 atcgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
 tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttadc agtcaaagct 420
 gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
 atttgctcaa cctctggagg ttttcctgag cctcacctct cctggctgga aaatggagaa 540
 gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
 ggacatthaa gagtgaatca gaccttcaac tggaaataca ccaagcaaga gcattttcct 720
 gataacgggg tgacccccag agtgcccata acacagaacc cctgtcctcc actcaaagag 780
 tgtccccat gcgcagctcc agacctcttg ggtggacct cctcttcat cttccctcca 840
 aagatcaagg atgtactcat gatctccctg agccccatgg tcacatgtgt ggtggtggat 900
 gtgagcgagg atgaccacaga cgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 960
 acagctcaga cacaaaccca tagagaggat tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc 1020
 ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac 1080
 agagccctcc catccccat cgagaaaacc atctcaaac ccagagggcc agtaagagct 1140
 ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagca gaagagatga ctaagaaaga gttcagtctg 1200
 acctgcatga tcacaggctt cttacctgcc gaaattgctg tggactggac cagcaatggg 1260
 cgtacagagc aaaactacaa gaacaccgca acagtccctg actctgatgg ttcttacttc 1320
 atgtacagca agctcagagt acaaaaagagc acttgggaaa gaggaagtct tttcgctgc 1380
 tcagtggtcc acgaggggtc gcacaatcac cttacgacta agaccatctc ccggtctctg 1440

ggtaaatccg gataa

1455

REIVINDICACIONES

1. Un dímero de proteína de fusión aislado o recombinante que comprende dos proteínas de fusión monoméricas unidas mediante al menos un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína presentes en cada proteína de fusión mutante monomérica, en donde cada proteína de fusión monomérica comprende (a) un polipéptido que comprende una secuencia de polipéptidos que se diferencia de la SEQ ID NO: 50 en no más de 6 restos de aminoácido y que incluye restos en las posiciones 24, 30, 32, 41, 50, 54, 55, 56, 64, 65, 70, 85, 104 y 106 que son idénticos a los restos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la SEQ ID NO: 50 y (b) un polipéptido de Fc de Ig, y en donde el dímero de proteína de fusión se une a CD80 humano o CD86 humano o a un dominio extracelular de cualquiera de ellos y tiene una capacidad mayor para suprimir una respuesta inmunológica que un dímero de proteína de fusión de LEA29Y-Ig, en donde el dímero de proteína de fusión LEA29Y-Ig comprende dos proteínas de fusión de LEA29Y-Ig monoméricas comprendiendo cada una la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 166.
2. El dímero de proteína de fusión de la reivindicación 1, en el que cada proteína de fusión monomérica comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en las SEQ ID NO: 199 o 213.
3. Un polipéptido aislado o recombinante que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 50.
4. Un dímero de polipéptido aislado o recombinante que comprende dos polipéptidos de la reivindicación 3.
5. Una proteína de fusión aislada o recombinante que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 50 y un segundo polipéptido, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido de Fc de Ig.
6. Un dímero de proteína de fusión aislado o recombinante que comprende dos proteínas de fusión monoméricas unidas mediante al menos un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína presentes en cada proteína de fusión mutante monomérica, en donde cada proteína de fusión monomérica comprende (a) un polipéptido que comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en la SEQ ID NO: 50 y (b) un polipéptido de Fc de Ig.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 5 o el dímero de proteína de fusión de la reivindicación 6, en donde cada proteína de fusión monomérica comprende la secuencia de polipéptidos que se muestra en las SEQ ID NO: 199 o 213.
8. Un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la reivindicación 3, un dímero de polipéptido de la reivindicación 4, una proteína de fusión de la reivindicación 5 o un dímero de proteína de fusión de las reivindicaciones 1, 2, 6 o 7 o una proteína de fusión monomérica del dímero de proteína de fusión de las reivindicaciones 1 o 2, o una secuencia de polinucleótidos complementaria del mismo.
9. Un vector que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Una célula hospedadora aislada o recombinante que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 8 y/o un vector de la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable o un vehículo farmacéuticamente aceptable y un dímero de proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
12. Un dímero de proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en:
- (i) un tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un mamífero;
 - (ii) el tratamiento de una enfermedad o un trastorno del sistema inmunológico; o
 - (iii) el tratamiento de rechazo a trasplante de tejido u órgano en un mamífero.
13. Uso de un dímero de proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para la preparación de un medicamento para:
- (i) un tratamiento profiláctico o terapéutico para inhibir o suprimir una respuesta inmunológica en un mamífero;
 - (ii) el tratamiento de una enfermedad o trastorno del sistema inmunológico; o
 - (iii) el tratamiento de rechazo a trasplante de tejido u órgano en un mamífero.
14. Un método para producir un polipéptido de la reivindicación 3, un dímero de polipéptido de la reivindicación 4, una proteína de fusión de la reivindicación 5 o un dímero de proteína de fusión de las reivindicaciones 1, 2, 6 o 7 o una proteína de fusión monomérica del dímero de proteína de fusión de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende el cultivo de una célula hospedadora de la reivindicación 10 en un medio de cultivo y recuperar el polipéptido o la

proteína expresados por la célula.

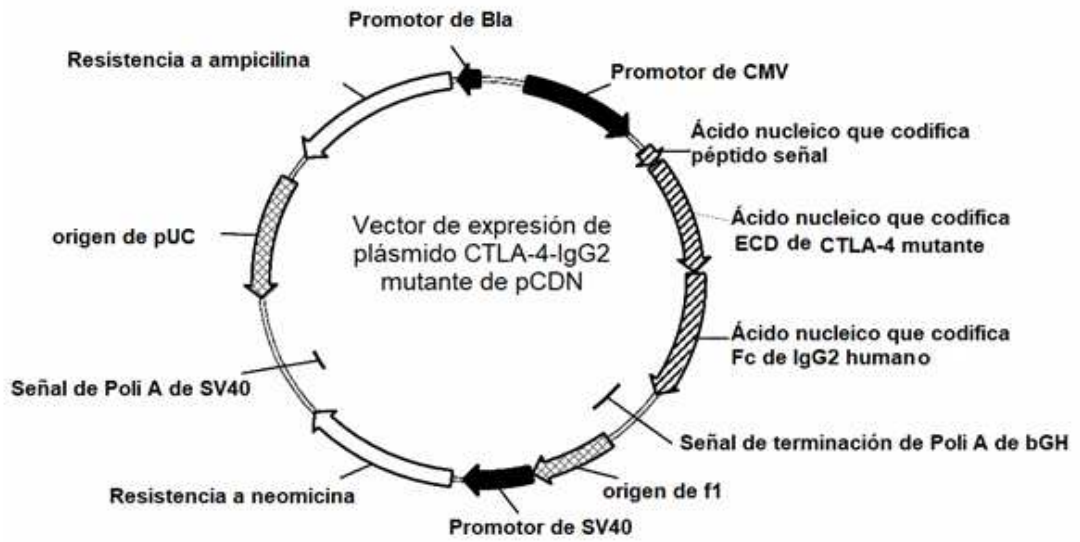


Figura 1

Figura 2A

...FCSG	VIHVT.....HFPDN	GVT	PKSCD.....LSPGK
Señal	ECD de CD80 Humano	Conector	Fc de IgG1 Humano
(1 – 34)	(35 – 242)	(243-245)	(246-476)

Figura 2B

...LSGA	APLKI.....EDPQPPP	GVT	PKSCD.....LSPGK
Señal	ECD de CD86 Humano	Conector	Fc de IgG1 Humano
(1 – 23)	(24 – 243)	(244-246)	(247-477)

Figura 2C

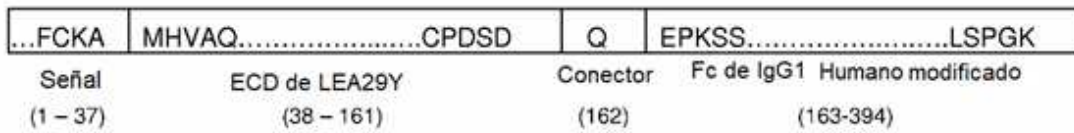
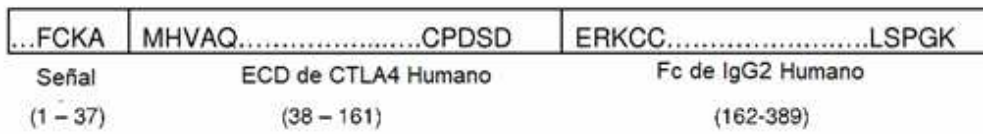


Figura 2D



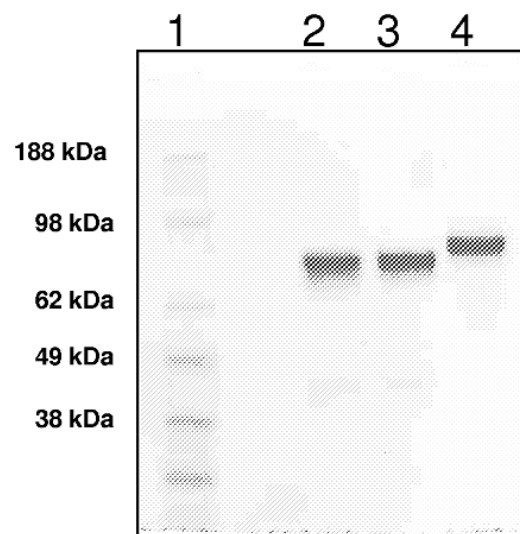


Figura 3

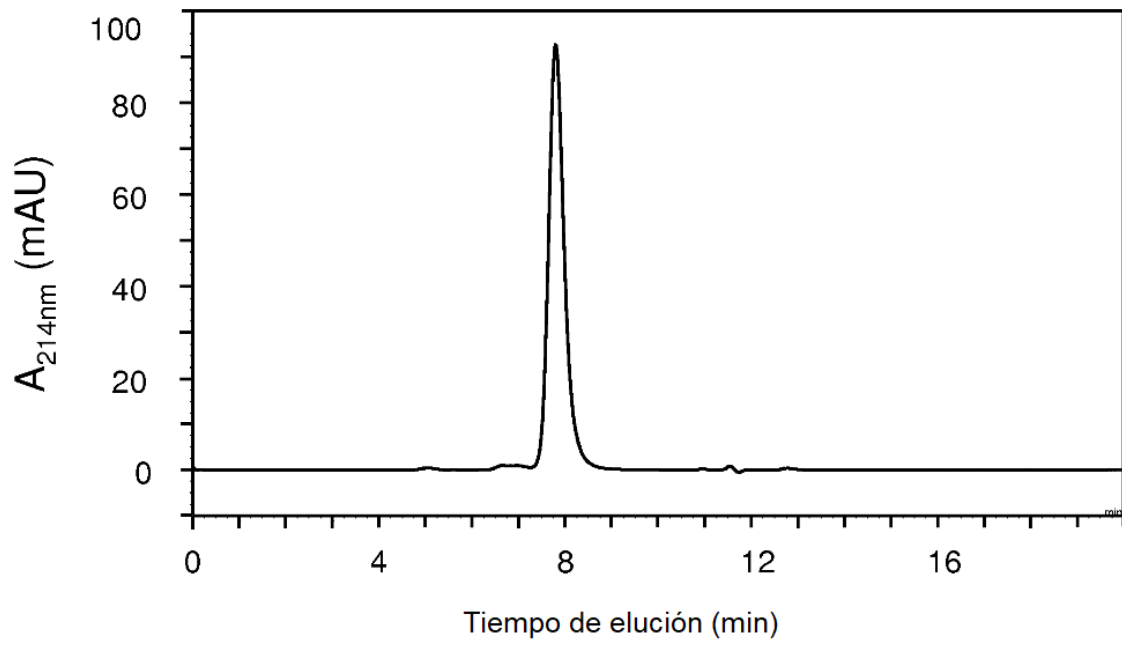


Figura 4

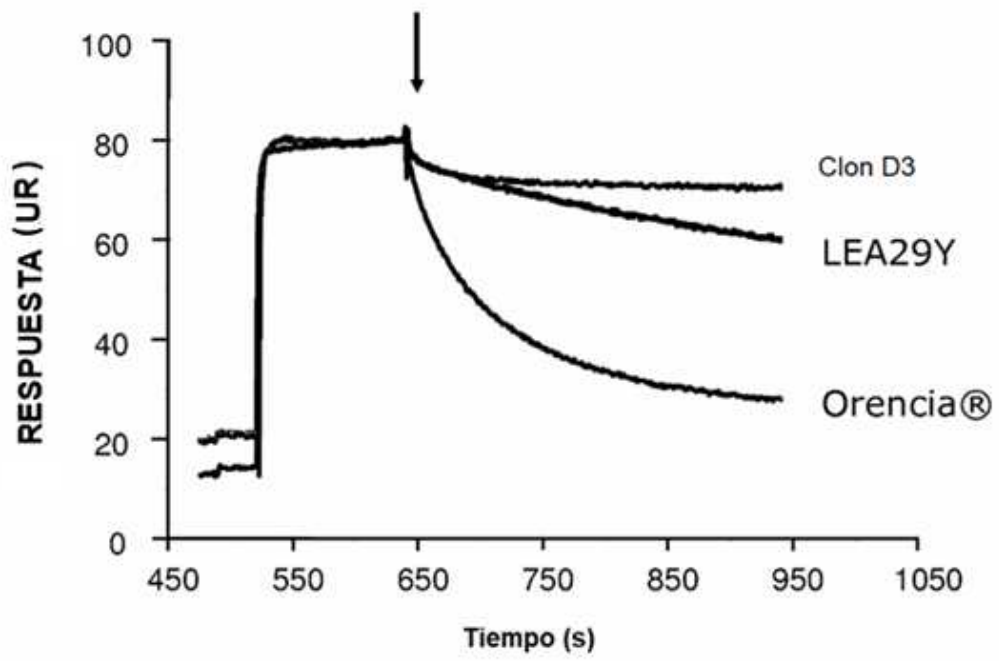


Figura 5

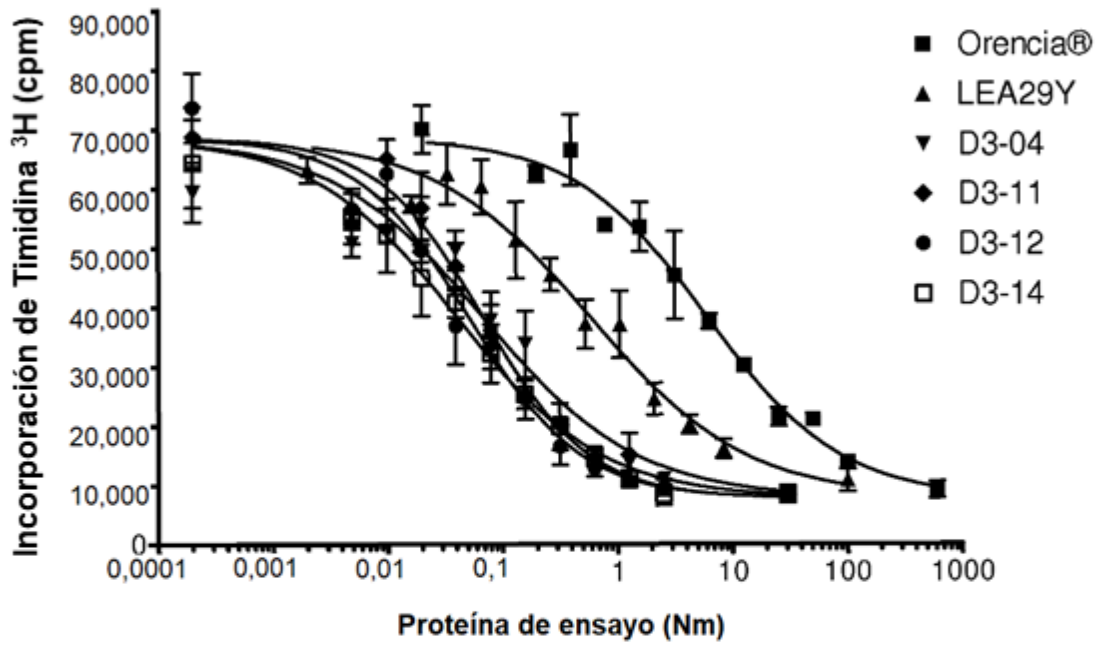


Figura 6

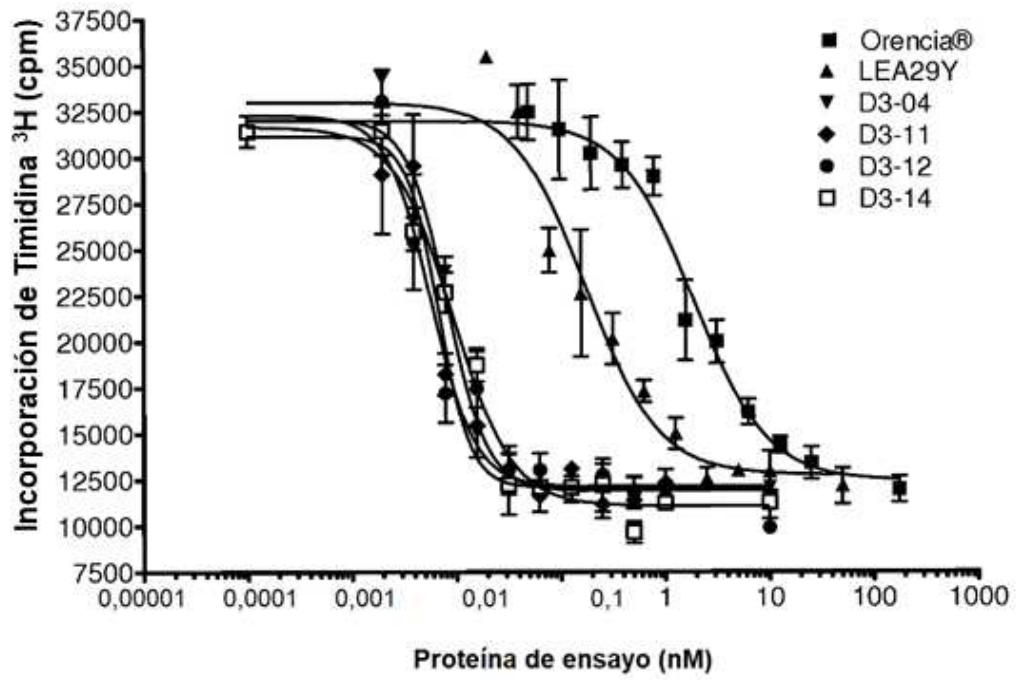


Figura 7

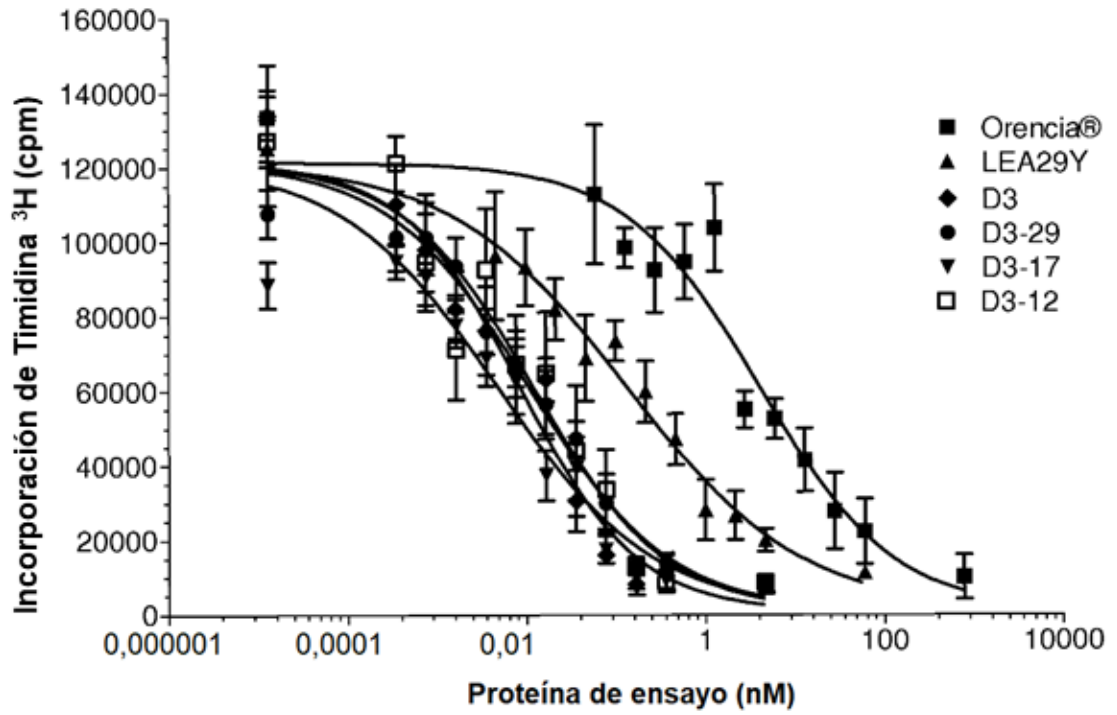


Figura 8

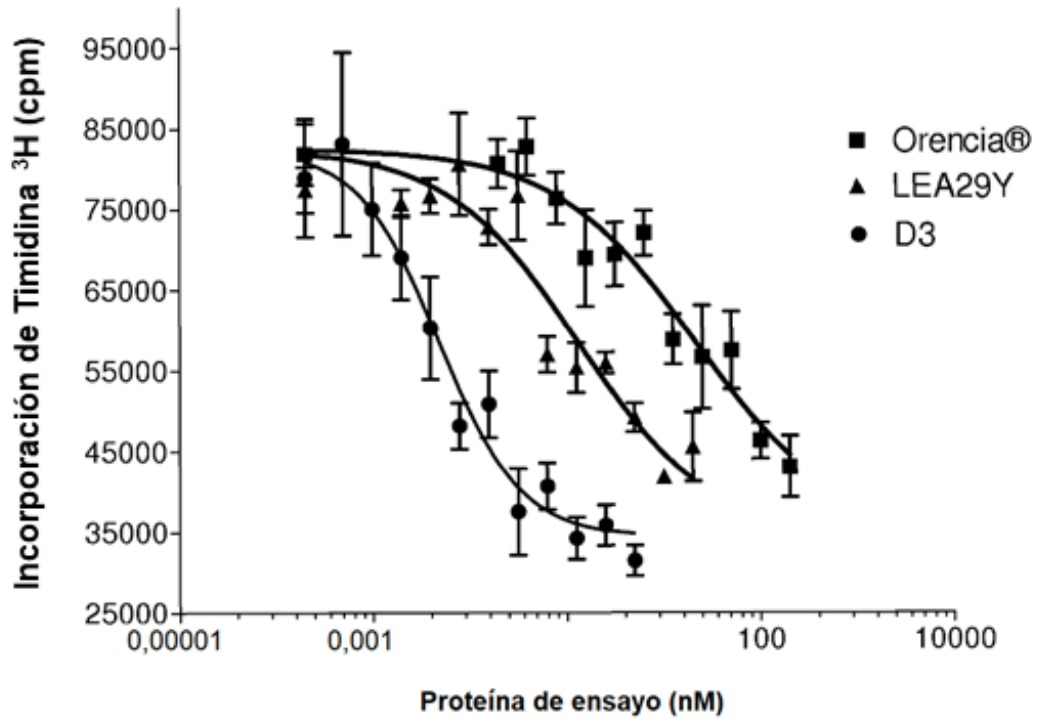


Figura 9

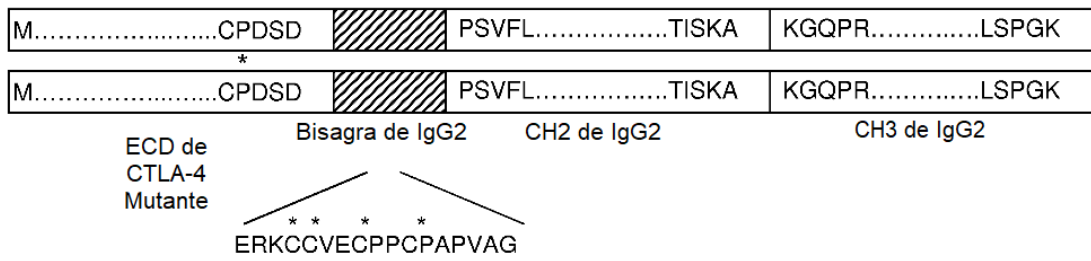


Figura 10

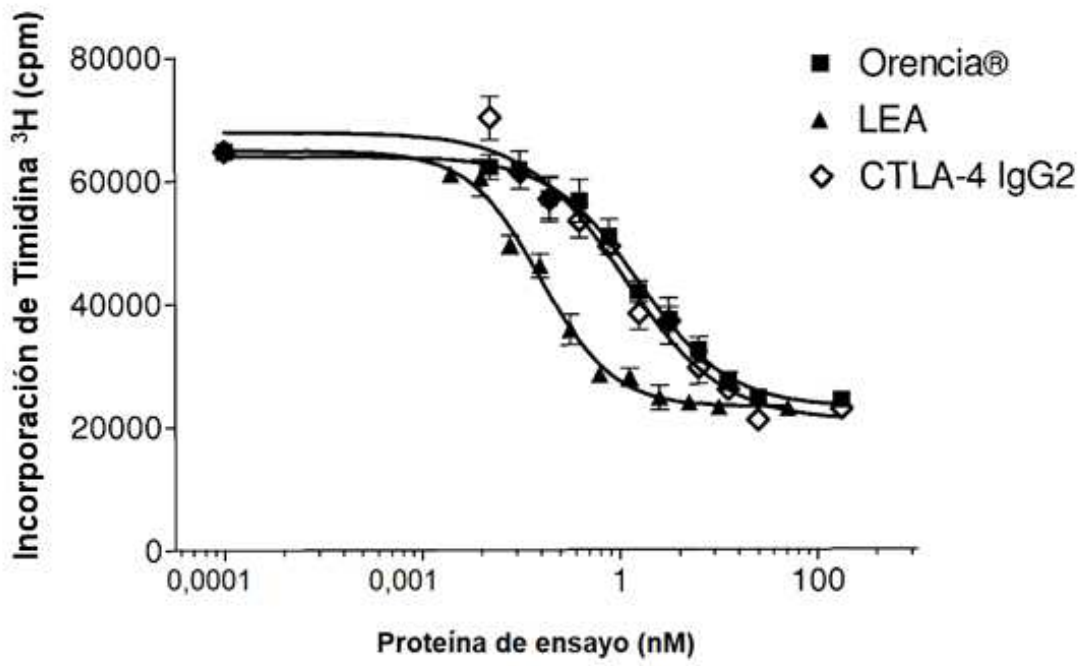


Figura 11

ES 2 688 721 T3

```

                *           20           *           40           *           60
hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLLDDSI : 65
LEA29YECD : .....Y..... : 65
D3-1      : .....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-2      : .....E.....I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-3      : .....E.....N.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-4      : .....E.....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-5      : .....E.....N.I.....G.....K.D.....PS : 65
D3-6      : .....E.....N.I.....G.....M.....D.....PS : 65
D3-7      : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-8      : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....S : 65
D3-9      : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....P : 65
D3-11     : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-12     : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-14     : .....E.....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-15     : .....E.....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-16     : .....E.....N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D3-17     : .....E.....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-19     : .....E.....N.I.....M...K.....PS : 65
D3-20     : .....E.....N.I.....M...K.....PS : 65
D3-21     : .....E.....N.I.....M...K.....PS : 65
D3-22     : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-23     : .....E.....N.I.....M...K.....PS : 65
D3-24     : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-25     : .....E.....N.I.....G.....M...K.....PS : 65
D3-26     : .....E.....N.I.....M...K.....PS : 65
D3-27     : .....E.....N.....M...K.....PS : 65
D3-28     : .....E.....N.I.....M...K.....P : 65
D3-29     : .....E.....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-30     : .....E.....N.I.....M...K.D.....P : 65
D3-31     : .....E.....N.I.....M...KED.....PS : 65

```

Figura 12A

ES 2 688 721 T3

```

          *           20           *           40           *           60
hCTLA4ECD : MHVAQPAVV LASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI : 65
LEA29YECD : .....Y..... : 65
D3-32     : .....E...N.I...K.....M...K.D.....PS : 65
D3-33     : .....E...N.I...K.....M...KED.....PS : 65
D3-34     : .....N.....M...K.....PS : 65
D3-39     : .....E...N.....M...K.....P : 65
D3-50     : .....N.....M...K.D.....P : 65
D3-52     : .....N.I.....M...K.....P : 65
D3-53     : .....E...N.I...G.....M...K.D.....PS : 65
D3-54     : .....N.....M...KE.....P : 65
D3-55     : .....E...N.....M...KE.....P : 65
D3-56     : .....N.....M...KE.....PS : 65
D3-57     : .....N.I.....M...KED.....P : 65
D3-58     : .....N.....M...KED.....PS : 65
D3-59     : .....E...N.I.....M...KE.....P : 65
D3-60     : .....N.I.....M...KE.....PS : 65
D3-61     : .....E...N.I.....M...KE.....PS : 65
D3-62     : .....N.I.....M...KED.....PS : 65
D3-63     : .....N.....KE.....P : 65
D3-64     : .....N.....M...E.....P : 65
D3-65     : .....N.....M...K.....PS : 65
D3-66     : .....N.....M...K.D.....P : 65
D3-68     : .....E...N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-69     : .....E...N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-70     : .....E...N.....M...K.....PS : 65
D3-71     : .....N.I.....M...K.D.....PS : 65
D3-72     : .....E...N.I.....M...K.....PS : 65
D3-73     : .....E...N.....M...K.....P : 65
D3-74     : .....N.I.....M...K.....P : 65
D3-75     : .....E...N.....M...KE.....PS : 65
D3-76     : .....N.....M...KED.....P : 65

```

Figura 12B

ES 2 688 721 T3

```

          *           20           *           40           *           60
hCTLA4ECD : MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI : 65
LEA29YECD : .....Y..... : 65
D1        : .....E.H...I.....N.....M...K.D.....PF : 65
D1T       : .....E.H.N.I.....N.....M...K.D.....PF : 65
D2        : .....E.H.N.I.....N.....M...K.D.....PF : 65
D3        : .....E...N.I.....G.....M...K.D.....PS : 65
D4        : .....S...D.I.....S.....M...E.D.....PT : 65
D5        : ..... : 65
D6        : .....I.....M...D...P... : 65
D20       : .....E.H...I.....M...ED.....P... : 65
D21       : .....SA.HN.D.I.....K.S.....M...EED.....PT : 65
D23       : .....SA.HN.A.I.....K.G.....M...KED.....PS : 65
D24       : .....E...N.I.....K.G.....M...KED.....PS : 65
D26       : .....EA.H.N.....E.G.....M...VED.....PS : 65
D27       : .....E...N.....E.G.....M...VED.....PS : 65
D28       : .....EA.H.N.....G.....M...ED.....PS : 65
D29       : .....EA.H.D.I.....K.....M...ED.....PS : 65
D31       : .....EA.HN.D.I.....G.....M...VED.....K... : 65

```

Figura 12C

ES 2 688 721 T3

	* 80 *	100	* 120	
hCTLA4ECD	: CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGI	GNGTQIYVIDPEPCPDS	D	: 124
LEA29YECD	:	E	:	: 124
D3-1	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-2	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-3	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-4	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-5	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-6	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-7	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-8	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-9	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-11	: ...F.....F.....	:	:	: 124
D3-12	: ...F.....A.....	:	:	: 124
D3-14	: ...F.....A.....	:	:	: 124
D3-15	: ...F.....F.....	:	:	: 124
D3-16	: ...F.....	:	:	: 124
D3-17	: ...F.....	:	:	: 124
D3-19	: ...F.....A.....	:	:	: 124
D3-20	: ...F.....	:	:	: 124
D3-21	: ...F.....F.....	:	:	: 124
D3-22	: ...F.....	:	:	: 124
D3-23	: ...F.....A.....F.....	:	:	: 124
D3-24	: ...F.....F.....	:	:	: 124
D3-25	: ...F.....A.....	:	:	: 124
D3-26	: ...F.....	:	:	: 124
D3-27	: ...F.....	:	:	: 124
D3-28	: ...F.....	:	:	: 124
D3-29	: ...F.....	:	:	: 124
D3-30	: ...F.....	:	:	: 124
D3-31	: ...F.....A.....	:	:	: 124

Figura 12D

ES 2 688 721 T3

	* 80 * 100 * 120		
hCTLA4ECD	: CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLLGIGNGTQIYVIDPEPCPDS	: 124	
LEA29YECD	:E.....	: 124	
D3-32	:F.....A.....	: 124	
D3-33	:F.....A.....	: 124	
D3-34	:F.....	: 124	
D3-39	:F.....	: 124	
D3-50	:F.....	: 124	
D3-52	:F.....	: 124	
D3-53	:F.....A.....E.....	: 124	
D3-54	:F.....	: 124	
D3-55	:F.....	: 124	
D3-56	:F.....	: 124	
D3-57	:F.....	: 124	
D3-58	:F.....	: 124	
D3-59	:F.....	: 124	
D3-60	:F.....	: 124	
D3-61	:F.....	: 124	
D3-62	:F.....	: 124	
D3-63	:F.....	: 124	
D3-64	:F.....	: 124	
D3-65	:F.....E.....	: 124	
D3-66	:F.....E.....	: 124	
D3-68	:F.....A.....E.....	: 124	
D3-69	:F.....E.....	: 124	
D3-70	:F.....E.....	: 124	
D3-71	:F.....E.....	: 124	
D3-72	:F.....E.....	: 124	
D3-73	:F.....E.....	: 124	
D3-74	:F.....E.....	: 124	
D3-75	:F.....	: 124	
D3-76	:F.....	: 124	

Figura 12E

ES 2 688 721 T3

```

          *           80           *           100           *           120
hCTLA4ECD : CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIIGNGTQIYVIDPEPCPDS : 124
LEA29YECD : .....E..... : 124
D1        : ...F.....A..... : 124
D1T       : ...F.....A..... : 124
D2        : ...F.....A.....M..... : 124
D3        : ...F.....A.....F..... : 124
D4        : ...F.....V.....F..... : 124
D5        : ...F..... : 124
D6        : ...F..... : 124
D20       : ...F..... : 124
D21       : ...F.....V.....F..... : 124
D23       : ...F.....A.....L..... : 124
D24       : ...F.....A.....L..... : 124
D26       : ...F.....A.....L..... : 124
D27       : ...F.....A.....L..... : 124
D28       : ...F.....A.....L..... : 124
D29       : ...F.....L..... : 124
D31       : ...F..... : 124

```

Figura 12F

MATRIZ DE SUSTITUCIÓN BLOSUM62

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

Figura 13

ES 2 688 721 T3

A.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 40-54 de D3)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
A	G	S	Q	V	T	E	V	C	A	M	T	Y	M	K
-1	0	0	0	-2	0	-1	-2	-1	0	-1	0	-2	-1	-1

= -12

B.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 41-55 de D3)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
	A	G	S	Q	V	T	E	V	C	A	M	T	Y	M
	4	-1	4	5	4	5	5	4	9	4	-1	5	7	5

= 59

C.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 41-55 de D3, con delección de los aminoácidos 49-50)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
	A	G	S	Q	V	T	E	V	C	T	Y	M	K	
	4	-1	4	5	4	5	5	4	9	0	-2	-1	-2	

= 34

D.

(superior: aminoácidos 39-53 de ECD de hCTLA-4)
 (inferior: aminoácidos 41-55 de D3, con delección de los aminoácidos 49-50)

Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M
	A	G	S	Q	V	T	E	V	C	-	-	T	Y	M
	4	-1	4	5	4	5	5	4	9	-12	-1	5	7	5

= 43

Figura 14

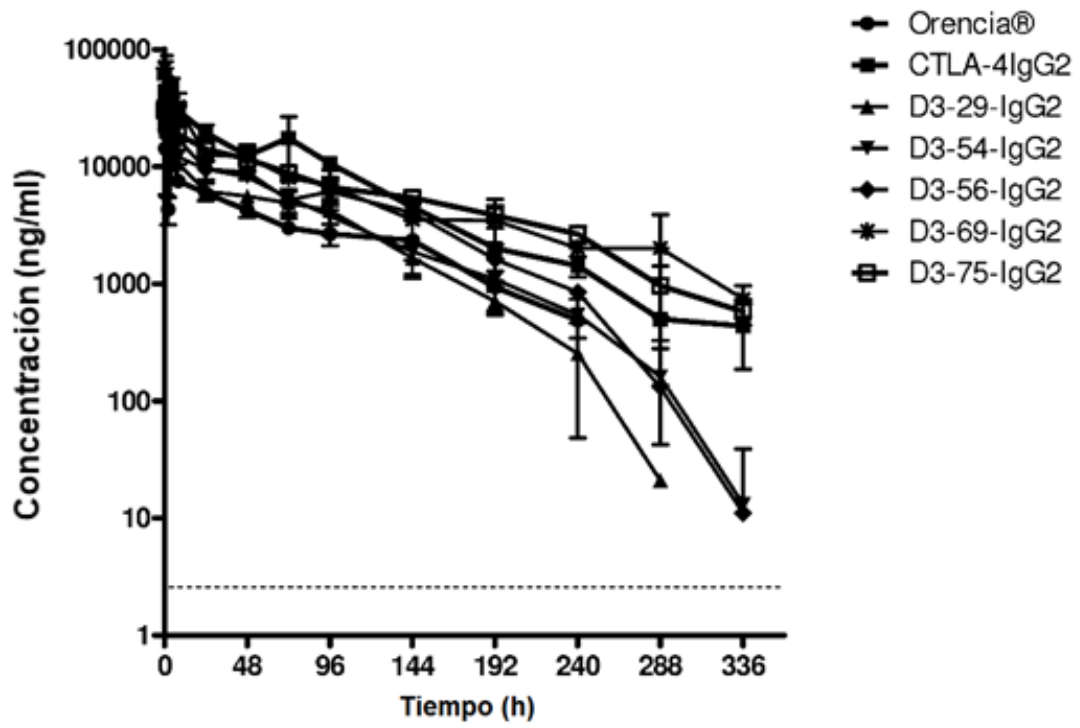


Figura 15A

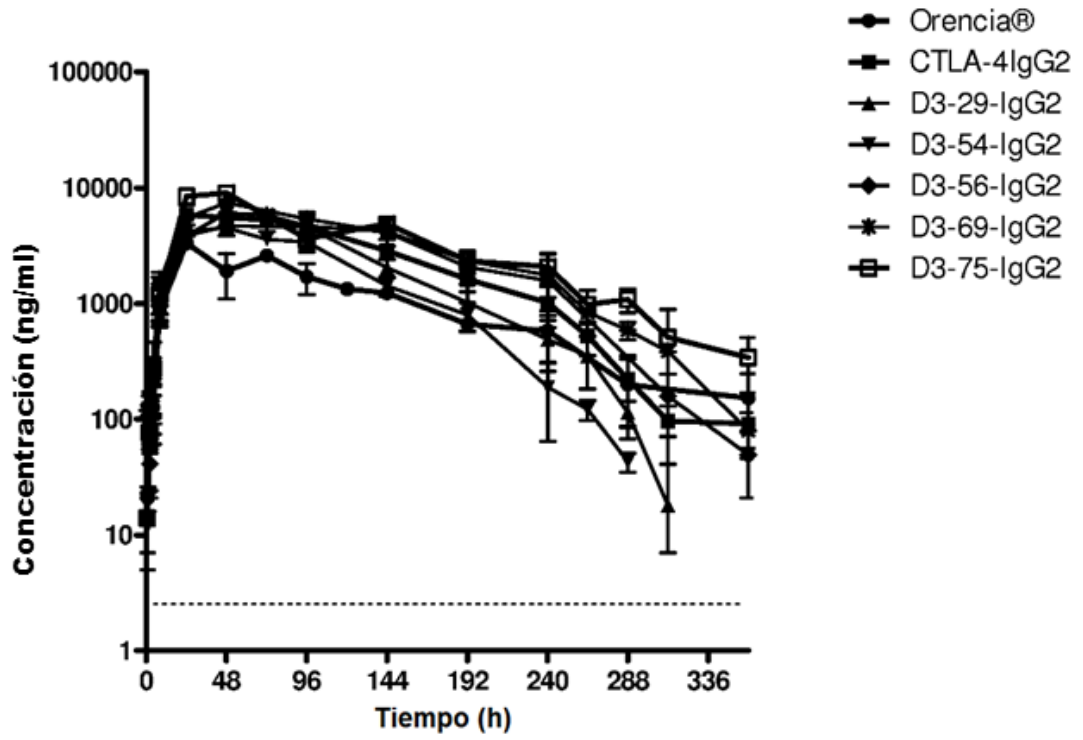


Figura 15B